

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 965**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 35/56</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/54</b>	(2015.01)
<b>A61K 35/60</b>	(2006.01)
<b>A61Q 19/00</b>	(2006.01)
<b>A61Q 19/08</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/02</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/12</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2009 PCT/IB2009/005836**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2009 WO09136291**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2009 E 09742464 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2296676**

54 Título: **Extractos celulares**

30 Prioridad:

**05.12.2008 US 120146 P**  
**09.05.2008 US 51931 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.05.2017**

73 Titular/es:

**REGENICS AS (100.0%)**  
**Norwegian Research Park Gaustadalleen 21**  
**0349 Oslo, NO**

72 Inventor/es:

**GAMMELSAETER, RUNHILD y**  
**REMMEREIT, JAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 613 965 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**

Extractos celulares

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a la producción de extractos celulares, especialmente de huevo de pez y anfibio, y a sus usos.

**Antecedentes de la invención**

10 La piel es la primera barrera que un ser humano tiene frente a las agresiones externas, y realiza defensas tanto físicas como químicas. La vitamina D se produce en la epidermis bajo los efectos de la radiación solar. Esta vitamina es necesaria para que el calcio se absorba en el intestino y luego se fije en los huesos, lo que permite el desarrollo y crecimiento del cuerpo humano. Sin embargo, la exposición excesiva al sol provoca daños en la piel y potencialmente cáncer. Además, las células de la piel pueden resultar dañadas por medios físicos, es decir, heridas o dañadas debido a la edad. Por lo tanto, existe una necesidad de identificar composiciones y procedimientos para administrar y mejorar la salud de la piel e impedir y tratar las afecciones y las enfermedades de la piel, y para mantener un aspecto normal de la piel y restaurar la piel envejecida para un aspecto juvenil.

15 Cuando una herida se cura, una cicatriz toma su lugar. Los tejidos sencillos tales como grasa, tejido conectivo y epitelio se regeneran, pero la piel, siendo un órgano complejo derivado de 2 capas germinales, se cura mediante la formación de un tejido predominantemente fibroso. Si la lesión secciona o destruye la capa papilar del estrato córneo, se formará una cicatriz. En ocasiones, esta cicatriz pasa desapercibida; otras veces, puede ser desfigurante. La preocupación de presentación más común de los pacientes con cicatrices con anomalías es la desfiguración. Sin embargo, algunos pacientes experimentan otros síntomas en asociación con su cicatriz anómala, tales como dolor, prurito y pérdida de movimiento. Estos otros síntomas pueden ser indicaciones para corrección quirúrgica de la cicatriz. Por lo tanto, existe una necesidad de identificar composiciones y procedimientos para gestionar, impedir y tratar cicatrices.

25 Después de daño, cirugía o radiación de tejidos u órganos, se produce una cicatrización y regeneración incompleta del tejido u órgano. Esto provoca dolor y malestar, así como una función comprometida de los tejidos dañados u órganos dañados. Por lo general, los seres humanos adultos son incapaces de cicatrizar y regenerar completamente órganos y tejidos, aunque, por ejemplo, los anfibios pueden regenerar los tejidos incluyendo los miembros perdidos. Por lo tanto, existe una necesidad de identificar composiciones y procedimientos de gestión y tratamiento de las cicatrices en órganos y tejidos internos, aumentando la plasticidad tisular y estimulando la regeneración de tejidos y órganos dañados.

30 El documento FR 2 827 171 A1 desvela un hidrolizado enzimático de huevos de salmón.

El documento WO 01/89540 A1 desvela el uso de una preparación farmacéutica que comprende clara de huevo y fracción de clara de huevo para regeneración tisular.

35 El documento DE 100 01 740 A1 desvela una preparación cosmética en forma de una loción o una crema que comprende un extracto de huevo de pez.

Shimizu E., An external treatment agent composed of egg yolk oil - used for treating skin diseases, partic. atopic dermatitis, burns and wounds, WPI/THOMSON, vol. 1996, n.º 36, 2 de julio de 1996, desvela aceite de yema de huevo para el tratamiento de enfermedades cutáneas, tales como dermatitis, quemaduras y heridas.

40 Deng y col., Forest frog egg fat injection, WPI/THOMSON, vol. 2002, n.º 54, 10 de abril de 2002, desvela aceite y vitaminas y excipientes de huevo de rana.

Petsina y col., Anti-ageing face cream composition - comprises whole, homogenized sea urchin, mussel or salmon gonads, sea buckthorn, aloe and propolis extracts and polyethylene oxide gel, WP1 /THOMSON, vol. 1998, n.º 50, 20 de mayo de 1998, desvela una crema facial que comprende gónadas masculinas o femeninas de salmón, esturión o erizo de mar.

45 Golubkov y col., Cosmetic preparation based upon aqua-homogenate of sturgeon caviar or based upon aqua-homogenate of salmon caviar or based upon complex of sturgeon and salmon caviar homogenates (variants), WPI / THOMSON, vol. 2004, n.º 56, 20 de julio de 2004, desvela una preparación cosmética que comprende un homogenado que comprende de caviar de esturión.

50 DATABASE WPI Week 200410 Thomson Scientific, London, GB; AN 2004-095315 y KR 2003 075 297 A (KWON G S), 26 de septiembre de 2003, desvela una composición cosmética que comprende nanosomas de extracto de caviar para hidratar la piel.

Decisionnewsmedia: "Caviar and crean - new recipe for the skin?", 8 de octubre 2003 (08-10-2003), desvela un producto para el cuidado de la piel basado en extracto de caviar.

"Sturgeon Caviar Extract" 30 de enero de 2008 (2008-01-30), desvela productos cosméticos que comprende en extracto de caviar de esturión.

**Sumario de la invención**

La invención se refiere a la producción de extractos celulares a partir de huevos de pez y anfibio.

5 Se desvelan composiciones que comprenden: un extracto celular de huevo; y un compuesto activo purificado. El compuesto activo purificado se puede seleccionar entre el grupo que consiste en un compuesto farmacéutico de molécula pequeña y una proteína farmacéutica. El extracto celular de huevo se puede seleccionar entre el grupo que  
 10 consiste en un extracto de un huevo de pez activado, un huevo de pez inactivado, un huevo de anfibio activado y un huevo de anfibio inactivado. El extracto de huevo puede ser de un huevo fertilizado. El extracto de huevo, si es de un huevo, se puede seleccionar entre el grupo que consiste en un huevo de anfibio y un huevo de pez. La composición se puede proporcionar en una crema, gel, emulsión, pomada, pulverización, polvo o loción. El extracto de huevo puede ser un extracto citoplasmático.

También se describen procedimientos para aumentar la presentación de un compuesto activo en la piel de un sujeto que puede comprender: a) proporcionar la composición precedente y b) aplicar por vía tópica la composición a la piel  
 15 del sujeto de modo que el compuesto activo se absorba en la piel del sujeto.

También se desvelan procedimientos para aumentar la producción de la proteína colágeno y/o la expresión genética del colágeno por la piel de un sujeto, que comprende: proporcionar una composición que comprende un extracto de huevo; y aplicar el extracto de huevo a la piel del sujeto en condiciones de modo que la producción de la proteína  
 20 colágeno y/o la expresión genética del colágeno aumente en el sitio de la aplicación. La composición se puede aplicar a una herida en la piel del sujeto. El extracto celular de huevo se puede seleccionar entre el grupo que consiste en un extracto de un huevo de pez activado, un huevo de pez inactivado, un huevo de anfibio activado y un huevo de anfibio inactivado. El extracto de huevo puede ser de un huevo fertilizado. El extracto de huevo, si fuera de un huevo, se puede seleccionar entre el grupo que consiste en un huevo de anfibio y un huevo de pez. La composición se puede proporcionar en una crema, gel, emulsión, pomada, pulverización, polvo o loción. El extracto  
 25 de huevo puede ser un extracto citoplasmático.

También se describen procedimientos para aumentar la proliferación celular en la piel de un sujeto que comprenden: proporcionar una composición que comprende un extracto de huevo; y aplicar el extracto de huevo a la piel del sujeto en condiciones de modo que la proliferación celular aumente en el sitio de la aplicación. La composición se puede aplicar en una herida en la piel del sujeto

30 También se desvelan procedimientos para preparar extractos a partir de huevos de anfibio o pez que comprenden: a) proporcionar huevos seleccionados entre el grupo que consiste en huevo de anfibio y pez b) tratar los huevos para impedir el crecimiento de bacterias durante el procesamiento adicional de los huevos. Los huevos se pueden tratar con una composición bactericida o bacteriostática. La composición puede comprender yodo.

La presente invención proporciona procedimientos de fabricación de extractos de huevos de anfibio o pez que comprenden: a) proporcionar huevos seleccionados entre el grupo que consiste en huevos de anfibio y pez; b) procesar los huevos para proporcionar una fracción citoplasmática de los huevos; y c) tratar la fracción  
 35 citoplasmática para impedir el crecimiento de bacterias. En algunas realizaciones, los huevos se seleccionan entre el grupo que consiste en huevos fertilizados y no fertilizados.

El procesamiento comprende la homogeneización de los huevos seguidos por centrifugación para separar los lípidos y los sólidos de la fracción citoplasmática. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende calentar el extracto a una temperatura de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 90 °C durante un periodo de tiempo superior a un  
 40 minuto.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones que comprenden de aproximadamente 100 a 250 mg/ml de proteína de huevo de pez en una solución acuosa; al menos un oligoelemento seleccionado  
 45 entre el grupo que consiste en calcio, fósforo, cinc, cobre e hierro; al menos una vitamina seleccionada entre el grupo que consiste en las vitaminas A, E, riboflavina, niacina, B6, pantotenato cálcico y B12; y una fracción lipídica que comprende de aproximadamente un 60 a un 80 % de ácidos grasos insaturados; en la que la composición tiene una osmolalidad de aproximadamente 330 a 440 mOsm, un pH de aproximadamente 5,0 a 7,7, y una densidad de aproximadamente 0,8 a 1,4 g/ml.

50 También se desvelan procedimientos para aumentar la producción de la proteína colágeno y/o la expresión genética del colágeno por la piel de un sujeto, que comprenden: aplicar una composición que comprende un extracto celular de huevo de pez que comprende de aproximadamente 50 a 500 mg/ml de proteína de huevo de pez, de aproximadamente uno a seis gramos/100 gramos de extracto de lípidos de huevo de pez, una osmolalidad de aproximadamente 330 a 440 mOsm, y un pH de aproximadamente 5,0 a 7,7 a la piel del sujeto en condiciones de modo que la producción de la proteína colágeno y/o la expresión genética del colágeno aumente en el sitio de la  
 55 aplicación. La composición se puede aplicar a una herida en la piel del sujeto. En algunas realizaciones, la composición se proporciona en una crema, gel, emulsión, pomada, pulverización, polvo o loción.

También se describen procedimientos para mejorar un parámetro de cicatrización de una herida en un sujeto, que comprende: aplicar una composición que comprende un extracto celular de huevo de pez que comprende de aproximadamente 50 a 500 mg/ml de proteína de huevo de pez, de aproximadamente uno a seis gramos/100 gramos de extracto de lípidos de huevo de pez, una osmolalidad de aproximadamente 330 a 440 mOsm, y un pH de aproximadamente 5,0 a 7,7 a una herida del sujeto en condiciones de modo que mejore un parámetro de cicatrización de una herida, en los que el parámetro se seleccionan entre el grupo que consiste en secado más rápido, reepitelialización más rápida, reducción de la inflamación, contracción más rápida, remodelación más temprana, mejora de la remodelación, reducción del tejido cicatricial y mejora del aspecto visual de la herida y combinaciones de los mismos. La composición se puede aplicar a una herida en la piel del sujeto. La composición se puede proporcionar en una crema, gel, emulsión, pomada, pulverización, polvo o loción. El extracto de huevo puede ser un extracto citoplasmático.

Se describen procedimientos para aumentar la expresión de un gen en un tejido de un sujeto que comprenden poner en contacto el tejido del sujeto con un extracto de huevo en condiciones de modo que aumente la expresión de un gen, en los que el gen se seleccionan entre el grupo que consiste en colágeno 1, colágeno 3, VEGF-B, VEGF-C, TGFβ2, TGFβ3, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-D, IL-18, y fibronectina. El extracto de huevo puede ser un extracto citoplasmático de huevos de pez o anfibio.

También se describen procedimientos para disminuir la expresión de un gen en un tejido de un sujeto que comprenden poner en contacto el tejido del sujeto con un extracto de huevo en condiciones de modo que disminuya la expresión de un gen, en los que el gen se selecciona entre el grupo que consiste en una metalopeptidasa de matriz, TGFβ1, VEGF-A, elastina, IL 1β, e IL 12. El extracto de huevo puede ser un extracto citoplasmático de huevos de pez o anfibio. La metalopeptidasa de matriz (MMP) se puede seleccionar entre el grupo que consiste en MMP 14, 16, 17, 19, 20, 23, 25 y 28.

Además se describen procedimientos para tratar un sujeto con una afección cutánea que comprenden poner en contacto la piel del sujeto con un extracto de huevo citoplasmático de pez o anfibio en una cantidad eficaz, en el que la afección cutánea se seleccionan entre el grupo que consiste en úlceras, psoriasis, callosidades, verrugas, acné, rosácea, dermatitis, queratosis, carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas. El extracto celular citoplasmático de pez o anfibio se puede proporcionar en una crema, gel, emulsión, pomada, pulverización, polvo o loción.

### **Descripción de las figuras**

La Figura 1 es un gráfico de generaciones con el tiempo.  
 La Figura 2 es un gráfico de minutos/generación con respecto al tiempo.  
 La Figura 3 es un gráfico de curva de crecimiento.  
 La Figura 4 proporciona gráficos de mediciones de heridas y cicatrices en piel de ratones y tasas de cicatrización de heridas. Estos datos muestran que el extracto de cicatrización de heridas tiene un efecto en la cicatrización de dos tipos de heridas (paneles a la izquierda heridas por escisión, paneles a la derecha heridas por incisión) en piel de ratón. Medidas tomadas con una regla y el área de la herida/cicatriz trazada sobre una película transparente el día 1, 5, 9 y 12. Las áreas por escisión y longitud de las heridas por incisión (paneles en la parte superior) muestran una reducción gradual del área de la herida desde el día 1 al 12. La cicatrización comienza más pronto y la reducción de la herida es más rápida en los animales tratados con el extracto, significativa el día 5 y 9 para las heridas por escisión. Las cicatrices formadas se midieron desde el día de la reepitelialización (paneles en la parte media). Una tendencia para los tamaños de herida más pequeños se observa para las heridas tanto por escisión como por incisión. Se revela el día de la cicatrización completa tomada como el día en el que la costra se cae de la herida. El porcentaje de animales con heridas curadas completamente (paneles de la parte inferior) muestra una cicatrización más rápida en los animales tratados para las heridas por incisión.  
 La Figura 5 proporciona un gráfico que demuestra el efecto de LEX en la proliferación de fibroblastos *in vitro*. Diamante - control, cuadrado - LEX6, triángulo - LEX 15.  
 La Figura 6 proporciona un gráfico del número de veces de inducción de los extractos de huevos de trucha, huevos de salmón sin fertilizar (huevas de salmón) y huevos de salmón fertilizados (huevas de salmón).

### **Definiciones**

Los agentes "antiinfecciosos" incluyen, pero no se limitan a, bencilpenicilina, penicilina, penicilina G, 6-fenil acetil penicilina, penicilina V, micronomicina, clavulanato, oxacilina, decualinio, cloxacilina, sulbenicilina, ampicilina, cileral y principeno y combinaciones de los mismos.

"Antiinflamatorio" significa una sustancia que reduce la inflamación. Muchos analgésicos remedian el dolor al reducir la inflamación. Muchos esteroides - de forma específica de los glucocorticoides - reducen la inflamación al unirse a los receptores de Cortisol. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) alivian el dolor al contrarrestar la enzima ciclooxigenasa (COX). Por sí misma, la enzima COX sintetiza las prostaglandinas, creando inflamación. Muchas hierbas tienen cualidades antiinflamatorias, que incluyen, pero no se limitan a, hisopo y corteza de sauce (la última de las cuales contiene ácido salicílico, el principio activo de la aspirina), así como abedul, regaliz, boniato silvestre y ginseng.

"Antioxidantes" significa cualquiera de una diversidad de sustancias que impiden o retardan la degradación de otra sustancia por el oxígeno. Los antioxidantes sintéticos y naturales se usan para retrasar el deterioro de la gasolina y del caucho, y los oxidantes tales como vitamina C (ácido ascórbico), hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA) por lo general se añade a los alimentos para evitar que se vuelvan rancios o se decoloren. Se ha encontrado que los nutrientes tales como el beta-caroteno (un precursor de la vitamina A), la vitamina C, la vitamina E y el selenio actúan como antioxidantes. Actúan neutralizando los radicales libres, moléculas con uno o más electrones desemparejados, que reaccionan rápidamente con otras moléculas, iniciando reacciones en cadena en un proceso llamado oxidación. Los radicales libres son un producto normal del metabolismo; el cuerpo produce sus propios antioxidantes (por ejemplo, la enzima superóxido dismutasa) para mantenerlos en equilibrio. Sin embargo, el estrés, el envejecimiento y las fuentes ambientales como el aire contaminado y el humo de cigarrillo pueden aumentar el número de radicales libres en el cuerpo, creando un desequilibrio. Los radicales libres altamente reactivos pueden dañar el ADN sano y se han relacionado con los cambios que acompañan al envejecimiento (tales como degeneración macular relacionada con la edad, una causa principal de ceguera en las personas de mayor edad) y con los procesos de enfermedad que conducen a cáncer, enfermedades cardíacas y apoplejía.

Un "antiséptico" es una sustancia que elimina o impide el crecimiento y la reproducción de diversos microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, protozoos y virus en las superficies externas del cuerpo. El objetivo de los antisépticos es reducir la posibilidad de sepsis, infección o putrefacción por gérmenes. Los agentes antibacterianos tienen el mismo objetivo, pero solo actúan contra las bacterias. Los antibióticos desempeñan una función similar, impidiendo el crecimiento o la reproducción de las bacterias dentro del cuerpo. Los antisépticos incluyen, pero no se limitan a, alcohol, yodo, peróxido de hidrógeno y ácido bórico. Existe una gran variación en la capacidad de los antisépticos para destruir microorganismos y en su efecto sobre los tejidos vivos. Por ejemplo, el cloruro de mercurio es un antiséptico potente, pero irrita los tejidos delicados. Por el contrario, el nitrato de plata elimina menos gérmenes, pero se puede usar en los tejidos delicados de los ojos y la garganta. También hay una gran diferencia en el tiempo requerido para que los diferentes antisépticos funcionen. El yodo, uno de los antisépticos que actuación más rápida, elimina las bacterias en 30 segundos. Otros antisépticos tienen una acción más lenta, más residual. Dado que existe tanta variabilidad, se han ideado sistemas para medir la acción de un antiséptico frente a ciertos patrones. ciertas normas. La acción bacteriostática de un antiséptico comparada con la del fenol (en las mismas condiciones y frente al mismo microorganismo) se conoce como su coeficiente de fenol.

El "quitosano" es un polímero de glucosamina unido en beta-1,4 que, a diferencia de la quitina, contiene pocos restos de N-acetilo. Se puede obtener a partir de la quitina, un polisacárido que se encuentra en los exoesqueletos de crustáceos tales como gamba, langosta y cangrejos. Los caparazones se pueden moler en un polvo pulverulento. A continuación, este polvo se desacetila, lo que permite que el quitosano absorba lípidos.

"Colágeno" significa cualquiera de una diversidad de sustancias que contiene las cadenas alfa del polipéptido de colágeno con una secuencia que por lo general sigue el patrón Gly-X-Y, en el que Gly se refiere a glicina, X se refiere a prolina, e Y se refiere a prolina o hidroxiprolina. Las proteínas del colágeno también contienen cantidades significativas de glicina y prolina. La hidroxiprolina y la hidroxilisina no se insertan directamente por los ribosomas. Se obtienen a partir de la prolina y la lisina en procesos enzimáticos de modificación después de la traducción, para los cuales se requiere vitamina C. Esto se relaciona con por qué las deficiencias de vitamina C pueden causar escorbuto, una enfermedad que conduce a la pérdida de dientes y fácil capacidad de presentar hematomas debido a una reducción en la fuerza del tejido conectivo debido a, falta de colágeno o colágeno defectuoso. Las células llamadas fibroblastos forman las diversas fibras en el tejido conectivo en el cuerpo incluyendo el colágeno. El colágeno blanco que constituye la matriz de la mayoría del tejido conectivo en los mamíferos consiste en fibras entretreídas del colágeno de la proteína colágeno. Las fibras de colágeno consisten en unidades globulares de la subunidad de colágeno, tropocolágeno. Las subunidades de tropocolágeno se organizan de forma espontánea en condiciones fisiológicas en estructuras de matriz escalonadas estabilizadas por numerosos enlaces de hidrógeno y covalentes. Las subunidades de tropocolágeno son hélices triples hacia el lado izquierdo, en las que cada hebra es, adicionalmente, una hélice hacia el lado derecho por sí misma. Por lo tanto, el tropocolágeno se puede considerar como una bobina superenrollada.

Aunque el colágeno es responsable de la elasticidad de la piel, y su degradación conduce a las arrugas que acompañan al envejecimiento, se produce en otros muchos lugares en todo el cuerpo, y en diferentes formas conocidas como tipos: Colágeno de tipo I - Este es el colágeno más abundante en el cuerpo humano presente en el tejido cicatricial, el producto final cuando el tejido se cura por reparación; Colágeno de tipo II - Cartílago auricular; Colágeno de tipo III - es el colágeno del tejido de granulación, y es producido rápidamente por fibroblastos jóvenes antes de que el colágeno de tipo I más resistente se sintetice; Colágeno de tipo IV - lámina basal; Colágeno de tipo V - la mayor parte tejido intersticial, asociado con el tipo I; Colágeno de tipo VI - la mayor parte tejido intersticial, asociado con el tipo I; Epitelios de colágeno de tipo VII; Colágeno de tipo VIII - algunas células endoteliales; Colágeno de tipo IX - cartílago, asociado con el tipo II; Colágeno de tipo X - cartílago hipertrófico y mineralizante; Colágeno de tipo XI - cartílago; Colágeno de tipo XII - interactúa con los tipos I y III.

En el contexto de ciertas realizaciones, "sustancias moduladoras de colágeno" significa una diversidad de sustancias capaces de facilitar la formación o descomposición de unidades o de cualquier tipo de colágeno.

Un "gel" es un material semisólido formado a partir de una solución coloidal. En peso, los geles son en su mayoría líquidos, sin embargo, se comportan como sólidos. Un ejemplo es la gelatina.

5 "Queratina" es cualquiera de una diversidad de moléculas de proteína fibrosa que sirven como unidades estructurales para diversos tejidos vivos. Las queratinas son los principales componentes proteicos del cabello, lana, uñas, cuernos, pezuñas y cálamos de plumas. Por lo general, estas proteínas contienen grandes cantidades de los aminoácidos que contienen azufre, en particular cisteína. Las moléculas de queratina helicoidales se retuercen unas  
10 sobre las otras para formar hebras alargadas denominadas filamentos intermedios. La formación de un puente disulfuro entre los átomos de azufre de dos cisteínas sobre cadenas polipeptídicas separadas de queratina permite la reticulación de estas cadenas y da como resultado un agregado bastante rígido.

15 "Filagrina" es cualquiera de una diversidad de proteínas asociadas a filamentos que interactúan con filamentos intermedios de queratina de diferenciación terminal de epidermis de mamífero a través de la formación de enlaces disulfuro.

"Inmunomodulador" significa cualquiera de una variedad de sustancias que influyen en el sistema inmunológico. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, citoquinas, interleuquina-2, inmuoestimulantes e inmunosupresores.

20 La expresión "producto natural" significa cualquiera de una diversidad de restos químicos orgánicos cuya disposición molecular se obtiene a partir de transformaciones enzimáticas en un organismo vivo excluyendo aminoácidos, proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos y secuencias y ácidos grasos saturados. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, lípidos (es decir, que no son ácidos grasos saturados), carbohidratos/sacáridos y polisacáridos, los esteroides y sus derivados, los terpenos y sus derivados, vitaminas, carotenoides y medicamentos naturales tales  
25 como taxol, etc. La expresión "producto natural sintético" es un producto natural no obtenido a partir de su fuente natural.

El término "gen", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ADN que comprende secuencias de control y codificantes necesarias para la producción de un polipéptido o precursor de proteína. El polipéptido se puede codificar mediante una secuencia codificante de longitud completa o mediante cualquier  
30 porción de la secuencia codificante, siempre y cuando se retenga la actividad proteica deseada.

"Nucleósido", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que consiste en una base de purina [guanina (G) o adenina (A)] o pirimidina [timina (T), uridina (U) o citidina (C)] unida covalentemente a una pentosa, mientras que "nucleótido" se refiere a un nucleósido fosforilado en uno de sus grupos hidroxilo de pentosa.

35 "Secuencia de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido, y fragmentos o porciones de los mismos, y al ADN o ARN de origen genómico o sintético que puede ser de hebra sencilla o doble y representa la hebra sentido o antisentido. Una "secuencia de aminoácidos", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de péptidos o proteínas.

Un "ácido nucleico peptídico", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula oligomérica en la que los nucleósidos están unidos por enlaces peptídicos, en lugar de fosfodiéster. Estas moléculas pequeñas,  
40 también denominadas agentes anti-gen, detienen la elongación de la transcripción por unión a su hebra complementaria (molde) de ácido nucleico (Nielsen y col., 1993) *Anticancer Drug Des.*, 8: 53-63).

Con respecto a secuencias de aminoácidos, una "variante" se usa para indicar una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más aminoácidos de otro aminoácido, normalmente relacionado. La variante puede tener cambios "conservativos", en los que un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares (por  
45 ejemplo, sustitución de leucina con isoleucina). Más raramente, una variante puede tener cambios "no conservativos", por ejemplo, sustitución de una glicina con un triptófano. Las variaciones menores similares también pueden incluir delecciones o inserciones de aminoácidos (es decir, adiciones), o ambas. Las directrices para determinar qué y cuántos restos de aminoácidos se pueden sustituir, insertados o experimentar delección sin abolir la actividad biológica o inmunológica se pueden encontrar usando programas informáticos bien conocidos en la  
50 técnica, por ejemplo, el software DNASStar.

Como se usa en el presente documento, el término "porción", por referencia a una secuencia de aminoácidos o una proteína (como en "una porción de una secuencia de aminoácidos"), se refiere a fragmentos de esa proteína. Los fragmentos pueden variar de tamaño de cuatro restos de aminoácidos a toda la secuencia de aminoácidos menos un aminoácido.

55 Como se usa en el presente documento, el término "purificado" se refiere a moléculas, que incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácidos nucleicos, ribonucleicos, lípidos o de aminoácidos, que se retiran, se aíslan o se separan de su entorno natural. Por lo tanto, una "secuencia de ácidos nucleicos aislada" es una secuencia de ácidos nucleicos purificada. Las moléculas "sustancialmente purificadas" están libres en al menos un 60 %,

preferentemente libres en al menos un 75 %, y más preferentemente libres en al menos 90 % de otros componentes con los que se asocian de forma natural.

5 "Cáncer" significa cualquiera de las diversas enfermedades celulares con neoplasias malignas caracterizadas por la proliferación de células anaplásicas. No se pretende que las células enfermas deben invadir realmente el tejido circundante y metastatizar a nuevos sitios del cuerpo. El cáncer puede implicar cualquier tejido del cuerpo y tiene muchas formas diferentes en cada área del cuerpo. La mayoría de los cánceres se nombran con respecto al tipo de célula u órgano en el que comienzan.

10 "Célula" significa la unidad estructural más pequeña de la materia viva capaz de funcionar de forma autónoma, que consiste en uno o más núcleos, citoplasma y diversos orgánulos, todos rodeados por una membrana semipermeable. Las células incluyen todas las células somáticas obtenidas o derivadas de un cuerpo de animal vivo o fallecido en cualquier etapa de desarrollo, así como células germinales, incluyendo esperma y huevos (cuerpo reproductor del animal que consiste en un óvulo o embrión junto con envolturas nutritivas y protectoras). Ambas categorías generales de células están incluidas: procariotas y eucariotas. Las células contempladas para uso en la presente invención incluyen todos los tipos de células de todos los organismos en todos los reinos: plantas, animales, protistas, hongos, arqueobacterias y eubacterias. Las células madre son células capaces, por divisiones sucesivas, de producir células especializadas en muchos niveles diferentes. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas producen glóbulos rojos y glóbulos blancos. Desde la concepción hasta la muerte, los seres humanos contienen células madre, pero en los adultos su poder de diferenciarse se reduce.

20 Como se usa en el presente documento, el término "diferenciación" relacionado con células significa el proceso mediante el cual las células se especializan estructural y funcionalmente, lo cual es una limitación progresiva del potencial de desarrollo y un aumento de la especialización de la función que se produce durante el desarrollo del embrión y conduce a oscuras formación de células, tejidos y órganos especializados.

25 El término "desdiferenciación" relacionado con células significa el proceso inverso de diferenciación, en el que las células se vuelven menos estructural y funcionalmente especializadas, lo que aumenta el potencial de desarrollo de la célula.

"Diferenciable" significa la capacidad de una célula para diferenciarse en un tipo celular deseado. Como se usa en el presente documento, el término "diferencia" significa especialización (diferenciación) o retorno a un tipo de célula más primitiva; desdiferenciación).

30 Un "extracto", como se usa en el contexto de "extracto celular" y "extracto de huevo" en la presente invención, significa una preparación de cualquier tipo de célula tal como se ha definido anteriormente obtenida por acción química o mecánica, tal como por presión, destilación, evaporación, etc. Los extractos pueden incluir todos o cualquier componente individual o combinación de componentes de las células, incluyendo preparaciones concentradas de los componentes activos. Tales componentes de los extractos incluyen, pero no se limitan a, ARN, ADN, lípidos, todas las estructuras de base de aminoácidos incluyendo péptidos y proteínas, carbohidratos o combinaciones de los mismos. Los extractos contemplados por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, extractos de huevos de peces, huevos de erizo, huevos de rana, células madre adultas, semillas de plantas y células madre de plantas.

40 Los "medios de crecimiento" son composiciones usadas para cultivar microorganismos o células en cultivo. Hay diferentes tipos de medios para el cultivo de diferentes tipos de células. La diferencia más grande en los medios de cultivo está entre los usados para desarrollar células en cultivo (el cultivo celular usa tipos de células específicas obtenidas a partir de plantas o animales) y los usados para el cultivo de microorganismos (normalmente bacterias o levaduras). Estas diferencias surgen debido al hecho de que las células obtenidas a partir de organismos completos y desarrolladas en cultivo son a menudo incapaces de crecer sin la provisión de ciertos requisitos, tales como hormonas o factores de crecimiento que habitualmente se producen *in vivo*. En el caso de células animales, estos requisitos se proporcionan a menudo mediante la adición de suero sanguíneo al medio. A menudo, estos medios son de color rojo o rosado debido a la inclusión de indicadores de pH. Los medios de crecimiento para las células madre embrionarias contienen preferentemente medio mínimo esencial, es decir, de Eagle: aminoácidos, sales (nitrato férrico nonahidratado, cloruro potásico, sulfato de magnesio, cloruro sódico, dihidrogenofosfato sódico), vitaminas (ácido ascórbico, ácido fólico, nicotinamida, riboflavina, B-12) o de Dulbecco: adicionalmente hierro, glucosa; aminoácidos no esenciales, piruvato sódico, β-mercaptoetanol, L-glutamina, suero bovino fetal y Factor Inhibidor de Leucemia (LIF). En el caso de los microorganismos, no existen tales limitaciones, ya que a menudo son organismos unicelulares. Otra diferencia importante es que las células animales en cultivo a menudo crecen sobre una superficie plana a la que se fijan, y el medio se proporciona en forma líquida, que cubre las células. Las bacterias tales como *Escherichia coli* (*E. coli*, el microbio usado más comúnmente en los laboratorios) se pueden cultivar en medios sólidos o en medios líquidos, el medio líquido nutriente comúnmente se denomina caldo de cultivo de nutrientes. Los medios de cultivo preferentes para microorganismos son caldo de cultivo de nutrientes o medio de Luria-Bertani (medio L-B). Las bacterias desarrolladas en cultivos líquidos a menudo forman suspensiones coloidales. Cuando se añade agar (una sustancia que se introduce en un gel) a un medio líquido, éste se puede verter en placas de Petri en las que se solidifica (éstas son las denominadas placas de agar) y proporciona un medio sólido sobre el cual se pueden cultivar microbios.

En el contexto de ciertas realizaciones, "adherirse a la piel" significa pegar o sujetar con o como si estuviera con cualquiera de diversos adhesivos, tales como, pegamento, pasta o mucílago.

5 Un "lípid" significa cualquiera de un grupo de compuestos orgánicos, incluyendo las grasas, aceites, ceras, esteroides y triglicéridos que son insolubles en agua pero solubles en disolventes orgánicos no polares y son oleosos al tacto. Las clases principales de lípidos incluyen los ácidos grasos, los lípidos derivados de glicerol (incluyendo las grasas y aceites y los fosfolípidos), los lípidos derivados de esfingosina (incluyendo las ceramidas, cerebrósidos, gangliósidos y esfingomielinas), los esteroides y sus derivados, los terpenos y sus derivados, ciertos compuestos aromáticos y alcoholes de cadena larga y ceras. En los organismos vivos, los lípidos sirven como base de las membranas celulares y como forma de almacenamiento de combustible. A menudo los lípidos se encuentran conjugados con proteínas o carbohidratos, y las sustancias resultantes se conocen como lipoproteínas y lipopolisacáridos. Las vitaminas liposolubles se pueden clasificar como lípidos. Los liposomas son vesículas esféricas formadas mezclando lípidos con agua o soluciones acuosas. Se han encontrado aplicaciones en la administración oral de algunos fármacos (por ejemplo, insulina y algunos fármacos contra el cáncer), ya que conservan su integridad hasta que se descomponen por las lipasas en el estómago y el intestino delgado.

15 En el contexto de cierta realización, una "capa de gel nutriente" significa un gel que comprende sustancias contenidas por lo general en un medio de crecimiento.

20 En el contexto de ciertas realizaciones, "célula especializada" de un sujeto significa que la célula tiene marcadores inmunoidentificativos característicos, de tal manera que la diferenciación de estas células y la exposición a tejidos de los sujetos se puede realizar en condiciones tales que el sistema inmunológico no genere anticuerpos para las células diferenciadas. Por ejemplo, cuando los glóbulos rojos que llevan uno o ambos antígenos A o B están expuestos a los anticuerpos correspondientes, se aglutinan; es decir, se agrupan. Las personas normalmente tienen anticuerpos contra esos antígenos de glóbulos rojos de los que carecen. Por lo tanto, los glóbulos rojos especializados del sujeto podrían ser los del tipo sanguíneo apropiado. La causa del rechazo al trasplante es el reconocimiento de antígenos de MHC extraños por parte de los linfocitos T y la activación de esos linfocitos T para convertirse en linfocitos T citotóxicos o auxiliares efectores. La activación de los linfocitos T se produce en el caso de los injertos vascularizados de células nucleadas que expresan alelos de MHC de la Clase I de Emparejamiento de MHC (especialmente HLA-B) y HLA-DR de la Clase II es más importante para el trasplante satisfactorio que el emparejamiento con otros antígenos de MHC; y el emparejamiento con MHC es más importante que el emparejamiento con antígenos de histocompatibilidad menores. Por lo tanto, las células presentadoras de MHC especializadas del sujeto podrían ser aquellas que presenten alelos de MHC coincidentes.

25 El término "gestionar", cuando se usa en relación con una enfermedad o afección, significa proporcionar efectos beneficiosos a un sujeto al que se le está administrando un agente profiláctico o terapéutico, que no da como resultado a una cura de la enfermedad.

35 En ciertas realizaciones, a un sujeto se le administran uno o más agentes profilácticos o terapéuticos para gestionar una enfermedad con el fin de impedir la evolución o empeoramiento de la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, los términos "impedir" y "que impide" incluyen impedir la recurrencia, propagación o inicio. No se pretende que la presente invención se limite a impedir completamente. En algunas realizaciones, el inicio se retrasa, o se reduce la gravedad de la enfermedad.

40 Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" y "que trata" no se limitan al caso en el que el sujeto (por ejemplo, el paciente) se cura y se erradica la enfermedad. En su lugar, la presente invención también contempla un tratamiento que simplemente reduce los síntomas y/o retrasa la evolución de la enfermedad.

En el contexto de ciertas realizaciones, una "capa impermeable" significa un material o tejido que es sustancialmente impermeable al agua o una capa de un agente de sellado con el fin de impedir una penetración sustancial por el agua.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo de transporte" incluye sustancias capaces de ayudar a la penetración de piel intacta o células de la piel u otras células somáticas. La expresión "vehículo de transporte" se usa como sinónimo con la expresión "agentes permeabilizantes". Tales vehículos de transporte incluyen, pero no se limitan a: fosfolípidos, palmitilmiristatos, DMSO, suspensiones o matriz de polímero o de quitosano, liposomas, péptidos Trojan, péptidos Chariot, pequeñas vesículas elásticas, microesferas (vectores funcionalizados obtenidos a partir de materiales derivados naturales como colágeno, glicosaminoglicanos, sulfato de condroitina, quitosano o polisacáridos), nanopartículas (transporta sustancias lipofílicas y aumenta la biodisponibilidad del material encapsulado en la piel), perlas y esponjas esféricas cargadas previamente, vesículas uni y/o multilamelares (estabilizan los contenidos de extractos en la base de crema y ayudan en el transporte en la piel), fluido de película molecular de retinol (película de monocapa uniforme fina que facilita la transferencia de agentes activos a través del estrato córneo), poliacrilonitrilo (polímeros que comprenden un sistema de liberación controlada que sincroniza la liberación de un principio activo junto con una fragancia como un marcador sensorial que expresa la eficacia del producto), beta-glucano (fibra de avena que ayuda en la penetración de la piel, (Redmond, Int. Journ. Cosmetic science 2005), propilenglicol (como vehículo de fármaco, que funciona mejor con una crema/loción basada en aceite

5 mineral, etc), butilenglicol, polietilenglicol, aceite de oliva, dimetilisorbida, dimetilformamida, salicilato de metilo (todos ellos mejoran la absorción a través de la piel), ácidos oleicos de cadena larga (altera la bicapa dentro del estrato córneo, vital para la permeación de composiciones en formulaciones basadas en propilenglicol), sustancias capaces de ajustar el pH, la hidratación y el metabolismo local en la piel. Los agentes que modifican estos factores incluyen un vehículo que contiene un agente hidrófobo activo, desionización de principios activos, aumento de la hidratación de la piel (contenido de agua de la solución/crema/medio de vehículo), ácido láctico (altera el pH).

10 Como se usa en el presente documento, el término "NANOG" se refiere a un gen homeobox. Se cree que el NANOG es necesario para que las células madre se multipliquen sin límite mientras siguen siendo capaces de producir muchos tipos diferentes de células. El gen es un gen maestro potencial que ayuda a que las células madre embrionarias crezcan en el laboratorio, haciendo que las células madre sean inmortales.

Como se usa en el presente documento, el término "OCT4" se refiere a un gen que no es activo en células somáticas, incluyendo células madre adultas, pero que se expresa en células madre y germinales embrionarias. El OCT4 es esencial para mantener la pluripotencia de las células madre embrionarias.

15 Como se usa en el presente documento, el término "SOX2" se refiere al gen codificante de la proteína de caja 2 de la región Y determinante del sexo (SRY). Este gen sin intrón codifica un miembro de la familia de caja de HMG relacionado con SRY (SOX) de factores de transcripción implicados en la regulación del desarrollo embrionario y en la determinación del destino celular. Como se usa en el presente documento, el término "GAPDH" se refiere al gen constitutivo gliceraldehídos-3-fosfato deshidrogenasa. Este gen está implicado en las funciones básicas necesarias para el mantenimiento celular. Los genes constitutivos se expresan de forma constitutiva.

20 **Descripción detallada de la invención**

25 La divulgación se refiere a mejorar la salud y el daño de células y tejidos, preferentemente la piel, y más preferentemente restaurar piel envejecida o dañada a un aspecto joven y saludable. La divulgación se refiere a composiciones de extractos de huevo, y componentes de extracto que pueden inducir diferenciación, que incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácidos nucleicos publicitados o sintéticos, polipéptidos o productos naturales contenidos en dichos extractos. Los extractos pueden ser extractos acuosos. Los extractos son de una fuente no aviar. Las composiciones se pueden usar en un procedimiento que comprende la aplicación de composiciones a la piel y/o heridas después de la eliminación de las capas superficiales exteriores. También se describe un procedimiento de desdiferenciación de células y/o desdiferenciación seguida de rediferenciación, y de gestión, impedimento y tratamiento de enfermedades de la piel.

30 La aplicación de la composición a la superficie deseada puede ser profiláctica, de modo que la composición se aplique a la piel u otra superficie antes de que se produzca la exposición a un agente. La aplicación de la composición puede ser curativa, por ejemplo, para proteger adicionalmente una superficie cutánea comprometida o para proporcionar una superficie protectora durante la cicatrización natural o mediada de una superficie de piel expuesta. La aplicación de la composición puede ser protectora, por ejemplo, para proteger una superficie de la piel en caso de exposición al agente.

35 La presente divulgación se refiere al uso de extractos o componentes de células diferenciadas para aplicación tópica a superficies del cuerpo. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona procedimientos y composiciones para usos cosméticos y terapéuticos.

40 La divulgación también se refiere a la desdiferenciación de células epiteliales/epidérmicas existentes a un estado primordial, en el que las células tienen capacidades de células madre y pueden reformar las células correctas y necesarias para la regeneración de toda la capa de piel (epidermis, dermis y subdermis). Aunque muchas células diferenciadas suelen estar comprometidas con su destino, se pueden producir sucesos de desdiferenciación. Los anfibios urodelos y los peces teleosteos pueden reemplazar las partes anatómicas perdidas por un proceso de migración, desdiferenciación, proliferación y rediferenciación de células epiteliales en el área herida. La reprogramación funcional de núcleos celulares diferenciados también se ha ilustrado mediante la derivación de células madre embrionarias pluripotentes (ESC), y por el nacimiento vivo de animales clonados después del trasplante nuclear en huevos no fertilizados.

50 El término plasticidad, como se usa en el presente documento, significa que una célula de un tejido puede generar los tipos celulares diferenciados de otro tejido. Los huevos de *Xenopus* pueden reprogramar los núcleos somáticos de los mamíferos para expresar el gen Oct4 del factor de transcripción de homeodominio de la familia POU, mediante un proceso que requiere desmetilación de ADN. La desmetilación del ADN también se produce después de la fusión de timocitos de ratón con células germinales embrionarias (EGC), pero curiosamente, solo las células EG son capaces de desmetilar genes impresos. La fusión de células progenitoras neuronales o de células obtenidas a partir de médula ósea con las ESC da como resultado híbridos que expresan marcadores de pluripotencia. A partir de la fusión de fibroblastos humanos con las ESC se obtienen resultados similares. La fusión de células de carcinoma embrionario (ESC) con células de linfoma T también estimula la formación de colonias que expresan transcripciones de células pluripotentes del genoma del linfoma. Los componentes de células pluripotentes EG, ES o EC pueden provocar sucesos de reprogramación en un genoma somático.

La función nuclear somática se puede alterar usando extractos nucleares y citoplásmicos porque los extractos proporcionan los componentes reguladores necesarios. Los extractos de las extremidades de tritón regeneradores estimulan la reentrada del ciclo celular y la regulación negativa de los marcadores miogénicos en los miotubos diferenciados. Los teratocarcinomas son un tipo particular de tumores de células germinales que contienen células madre no diferenciadas y derivados diferenciados que pueden incluir capas germinales de endodermo, mesodermo y ectodermo. Las células de carcinoma no diferenciadas se pueden cultivar para dar lugar a líneas de ECC. Las ECC forman teratocarcinomas malignos cuando se trasplantan a sitios ectópicos; sin embargo, algunas líneas de ECC también pueden contribuir a los tejidos del feto en desarrollo cuando se introducen en un blastocisto.

Las células NCCIT no diferenciadas de teratocarcinoma humano se pueden establecer a partir de un tumor mediastínico mixto de células germinales. La NCCIT está en una etapa intermedia entre un seminoma (un precursor de tumores de células germinales) y un carcinoma embrionario. La NCCIT es una línea celular pluripotente en el desarrollo que se puede diferenciar en derivados de las tres capas germinales embrionarias y de los linajes celulares extraembrionarios, un extracto de células somáticas no diferenciadas puede provocar la desdiferenciación en una línea celular somática. Véase Taranger y col., "Induction of Dedifferentiation, Genome-wide Transcriptional Programming, and Epigenetic Reprogramming by Extracts of Carcinoma and Embryonic Stem Cells" *Mol. Biol. Cell.* (2005).

Las células madre se pueden establecer en el tejido dañado. Véase y col., "Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study" *Lancet*, 366 (9490): 1005-12 (2005); Goldman "Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system" *Nat Biotechnol.* 23 (7): 862-71 (2005); Leri y col., "Repair of the damaged heart" *Kidney Int.* 68(5):1962 (2005); Levy y col., "Embryonic and adult stem cells as a source for cell therapy in Parkinson's disease" *J Mol Neurosci.* 24 (3): 353-86 (2004); Jack y col., "Processed lipoaspirate cells for tissue engineering of the lower urinary tract: implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction" *J Urol.* 174 (5): 2041-5 (2005); Kitmaura y col., Establishment of renal stem/progenitor-like cell line from S3 segment of proximal tubules in adult rat kidney, *Kidney Int.* 68 (5): 1966 (2005).

La divulgación se refiere a extractos que son capaces de estimular el sistema inmunitario para ayudar en la cicatrización. Por ejemplo, los extractos pueden contener fibrógeno y proteínas de choque térmico. Estos componentes celulares endógenos son señales de alarma expresadas por lo general en células con dificultades o heridas. Se unen a los receptores de tipo Toll (TLR) en células presentadoras de antígenos (APC) y ponen al sistema inmunológico en alerta de un área dañada. Véase Matzinger "The Danger Model: A Renewed Sense of Self" *Science* 296: 301-305 (2002).

La divulgación se refiere a la estimulación de células madre existentes en la piel, tales como las células madre que se encuentran en y alrededor de los folículos pilosos para duplicarse y/o diferenciarse en células epiteliales o neuronas. La nestina, un marcador de las células progenitoras neurales, se expresa en las células de la protuberancia del folículo piloso y se comportan como células madre, diferenciándose para formar gran parte del folículo piloso durante cada ciclo de crecimiento del cabello. El folículo piloso es dinámico, entre ciclos de crecimiento (anágeno), regresión (catágeno) y reposo (telógeno) a lo largo de la vida. Las células madre localizadas en el área del bulbo del folículo piloso dan lugar a las estructuras del folículo durante cada fase anágena. Las células madre localizadas en la protuberancia folículo piloso pueden generar todos los tipos de células epiteliales dentro del folículo intacto y el pelo durante el ciclo normal del folículo piloso. Las células de la protuberancia del folículo piloso se diferencian en células de la matriz del folículo piloso, células basales de la glándula sebácea y epidermis. Como respuesta a la formación de heridas, algunas células madre salen de la protuberancia, migran y proliferan para repoblar el infundíbulo y la epidermis. Las células madre pluripotentes adultas de la dermis cutánea, denominadas precursores derivados de la piel (SKP), pueden proliferar y diferenciarse para producir neuronas, glía, células del músculo liso y adipocitos. Las células madre pluripotentes de la cresta neuronal están presentes en las papilas dérmicas de los folículos pilosos de los mamíferos adultos. Véase Amoh y col., " Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 12; 102 (15): 5530-4 (2005).

La médula ósea contiene tres poblaciones de células madre: células madre hematopoyéticas, células del estroma y células progenitoras endoteliales. Las células madre de la médula ósea, las células madre hematopoyéticas (HSC), son responsables de la formación de todos los tipos de células sanguíneas en el cuerpo. En ocasiones, las células obtenidas de la médula ósea se clasifican usando un panel de marcadores de superficie en poblaciones de células madre hematopoyéticas o células del estroma de la médula ósea. Las HSC pueden estar altamente purificadas o parcialmente purificadas, dependiendo de las condiciones usadas. Otra forma de separar la población de células de médula ósea es por fraccionamiento para producir células que se adhieren a un sustrato de crecimiento (células del estroma) o no se adhieren (células hematopoyéticas). Las células madre mesenquimales de la médula ósea también dan origen a estos tejidos y constituyen la misma población de células que las células del estroma de la médula ósea. Las células progenitoras que se diferencian en células endoteliales, un tipo de célula que alinea los vasos sanguíneos, se pueden aislar de la sangre circulante. Los pericitos están relacionados con las células del estroma de la médula ósea.

Las combinaciones de marcadores de superficie se usan para identificar, aislar y purificar las HSC obtenidas a partir de médula ósea y sangre. Las HSC no diferenciadas y las células progenitoras hematopoyéticas expresan c-kit,

CD34 y H-2K. Estas células normalmente carecen del linaje Lin, o lo expresan a niveles muy bajos (Lin-/bajo). Las células del estroma BM tienen varias características que las distinguen de las HSC. Los dos tipos de células se pueden separar *in vitro*. Cuando la médula ósea se disocia, la mezcla de células que contiene se siembra a baja densidad, las células del estroma se adhieren a la superficie de la placa de cultivo y las HSC no lo hacen. Dadas las condiciones *in vitro* específicas, las células del estroma BM forman colonias de una sola célula denominada unidad F formadora de colonias (CFU-F). A continuación, estas colonias se pueden diferenciar como adipocitos o estroma de mielo soporte, un ensayo clonal que indica la naturaleza de célula madre de las células del estroma. A diferencia de las HSC, que no se dividen *in vitro* (o solo proliferan en un grado limitado), las células del estroma BM pueden proliferar hasta 35 duplicaciones de población *in vitro*. Las células madre endoteliales son CD34+ (un marcador para las HSC), y expresan el factor de transcripción GAT A-2 véase Kocher, y col., "Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function", Nat. Med. 7, 430-436 (2001).

La presente divulgación contempla el uso de cualquier tipo de célula incluyendo células madre de cualquier organismo pluricelular en cualquier reino de especies, tanto eucariotas incluyendo animales, plantas, protistas, hongos como procariotas incluyendo los reinos arqueobacterias y eubacterias. Los organismos pluricelulares contienen células madre totipotentes, multipotentes, pluripotentes y unipotentes capaces de dividir y reponer tejidos y células que componen el organismo. Las células madre están bien documentadas en animales mamíferos, pero están presentes en todos los animales, por ejemplo, insectos. Las moscas de la fruta adultas tienen las mismas células madre que controlan la regulación de la célula en su intestino al igual que los seres humanos. Los sistemas digestivos de vertebrados e invertebrados muestran amplias similitudes en su desarrollo, composición celular y control genético. El intestino medio de *Drosophila* es típico: los enterocitos constituyen la mayor parte de la monocapa del epitelio intestinal, pero se entremezclan con células enteroendocrinas productoras de hormonas. Las células intestinales humanas (y de ratón) son repuestas continuamente por las células madre, cuya mala regulación puede ser la base de algunas enfermedades digestivas comunes y cáncer. Por el contrario, las células madre no se han descrito en los intestinos de las moscas, y se ha pensado que las células intestinales de *Drosophila* son relativamente estables. Mediante el etiquetado de linaje se ha mostrado que las células del intestino delgado posterior de *Drosophila* adultas se reponen continuamente por una población distintiva de células madre intestinales (ISC). (Benjamin Ohlstein y Allan Spradling, The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells, Nature Online, 7 de diciembre de 2005).

Además de las células madre de animales, las plantas también contienen células madre. Las células madre en los tallos de las plantas y los meristemas de las raíces se mantienen a lo largo de la vida de la planta y producen células hijas somáticas que forman el cuerpo de la planta. Las células madre de plantas también se pueden obtener a partir de células somáticas *in vivo* e *in vitro*. (Plants stem cells: divergent pathways and common themes in shoots and roots. Byrne ME, Kidner CA, Martienssen RA. Curr Opin Genet Dev. Octubre de 2003;13 (5): 551-7.) Las células de los animales y organismos se mueven, realizan divisiones celulares que sirven para regenerar y mantener tejidos y poblaciones de células circulantes, crecen de manera simultáneamente repetitiva, contienen una línea germinal reservada que se interrumpe momentáneamente en la embriogénesis, tienen una tolerancia baja a las anomalías genéticas, producen embriones complejos e incompletos y esencialmente no presentan propagación sexual y no tienen pared celular. Las plantas responden por ajuste fisiológico, sus divisiones celulares contribuyen a la formación *de novo* de órganos en todo momento hasta la senescencia, el crecimiento de la planta es en serio, repetitivo y plástico, las plantas no tienen línea germinal reservada, son más tolerantes a las anomalías genéticas, sus embriones son sencillos y completos y las células de las plantas son totipotentes. Se contemplan células madre de plantas y semillas (gametos de plantas) para su uso en la presente invención. Contrariamente a la rareza de las células totipotentes en los animales, casi todas las células formadas por un hongo pueden funcionar como una "célula madre". Los cuerpos fructíferos multicelulares de los hongos basidiomicetos consisten en el mismo tipo de hifas filamentosas que forman la fase de alimentación, o micelio, del organismo, y la diferenciación celular visible es casi inexistente (Money NP. Mushroom stem cells. Bioessays. Octubre de 2002; 24 (10): 949-52).

La descripción se organiza en las siguientes secciones: B. Extractos de células madre adultas; C. Extractos de células sanguíneas del cordón umbilical; D. Extractos de células, huevos y embriones no mamíferos; E. Procedimientos para preparar extractos; F. Inhibidores epigenéticos; G. Mayo se inicia de procedimientos de administración tópica; H. Otros procedimientos de administración; I. Componentes adicionales para extractos; J. Perfiles de composición; K. Aplicación tópica; L. Usos terapéuticos; M. Aplicaciones de células completas; N. Terapia *ex vivo* e *in vivo*.

## B. Extractos de células madre adultas

Se describen composiciones que comprenden células madre adultas o extractos preparados a partir de células madre adultas. Las células o extractos se formulan para aplicación tópica como se describe con más detalle a continuación. La célula madre adulta es una célula no diferenciada (no especializada) que se encuentra en un tejido diferenciado (especializado); se puede renovar y llegar a especializarse especializado para producir tipos de células especializadas del tejido a partir del que se originó. Estas células precursoras existen dentro de los tejidos diferenciados del adulto de todos los organismos pluricelulares en los reinos animal, vegetal, protista y hongos como una comunidad de células dispersadas a través del tejido. Las células precursoras obtenidas a partir de adultos se pueden dividir en tres categorías basándose en su potencial de diferenciación. Estas tres categorías de células

5 precursoras son células madre similares a epiblastos, células madre de linaje de capa germinal y células progenitoras. Se han aislado células precursoras de una amplia diversidad de tejidos, que incluyen, pero no se limitan a, músculo esquelético, dermis, grasa, músculo cardíaco, tejido de granulación, periostio, pericondrio, cerebro, meninges, vainas nerviosas, ligamentos, médula ósea, tráquea, pulmones, esófago, estómago, hígado, intestinos, bazo, páncreas, riñón, vejiga urinaria y testículos. Las células precursoras se pueden liberar desde los compartimentos del tejido conectivo a través del cuerpo por interrupción mecánica y/o digestión enzimática y se han aislado a partir de, pero no limitándose a, ratones, ratas y seres humanos recién nacidos, adolescentes y geriátricos y conejos, perros, cabras, ovejas y cerdos adultos.

10 La primera categoría de células precursoras, células madre similares a epiblastos (ELSC), consiste en una célula madre que formará células de los tres linajes de la capa germinal embrionaria. Las células madre de ratas adultas y células madre de humanos adultos se pueden liberar de los compartimentos de tejido conectivo en todo el cuerpo por interrupción mecánica y/o digestión enzimática. Las células madre de cualquiera de ratas adultas o seres humanos adultos se pueden congelar preferentemente de forma lenta y almacenar a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  usando un 7,5 % de dimetilsulfóxido ultrapuro. La descongelación rápida de las células madre de ambas especies desde el estado congelado a temperatura ambiente proporcionar tasas de recuperación que superan un 98 %. Estas células en el estado no diferenciado expresan el gen Oct-3/4 que es característico de las células madre embrionarias. Las ELSC no se diferencian de forma espontánea en un medio sin suero que carece de agentes de progresión, agentes de proliferación, agentes de inducción de linaje y/o factores inhibidores, tales como factor inhibidor de la leucemia humana recombinante (LIF), factor de inhibición de la leucemia murina recombinante (ESGRO), o factor anti-diferenciación humano recombinante (ADF). Las células madre embrionarias se diferencian de forma espontánea en estas condiciones. Por el contrario, las ELSC obtenidas a partir de ambas especies permanecen quiescentes a menos que actúen sobre agentes proliferativos y/o inductores y/o entorno específicos.

25 Las ELSC proliferan para formar múltiples capas confluentes de células *in vitro* en presencia de agentes de proliferación tales como factores de crecimiento obtenidos a partir de plaquetas y responden a agentes de inducción de linaje. Las ELSC responden al factor de crecimiento de hepatocitos formando células que pertenecen al linaje endodérmico. Las líneas celulares han expresado marcadores fenotípicos para muchos tipos separados de células de origen ectodérmico, mesodérmico y endodérmico cuando se exponen a agentes de inducción generales y específicos.

30 La segunda categoría de células precursoras consiste en tres células madre separadas. Cada una de las células forma células de un linaje específico de la capa germinal embrionaria (células madre ectodérmicas, células madre mesodérmicas y células madre endodérmicas). Cuando se exponen a agentes inductivos generales y específicos, las células madre ectodérmicas de linaje de capa germinal se pueden diferenciar, por ejemplo, en células progenitoras neuronales, neuronas, ganglios, oligodendrocitos, astrocitos, vesículas sinápticas, células gliales radiales y queratinocitos.

35 La tercera categoría de células precursoras presentes en tejidos adultos está compuesta por una multitud de células progenitoras pluripotentes, tripotentes, bipotentes y unipotentes. En los tejidos sólidos estas células se encuentran cerca de sus respectivos tipos de células diferenciadas. Por lo general, las células progenitoras no muestran marcadores de expresión fenotípica para las ELSC pluripotentes, tales como antígeno 4 embrionario específico de estadio, antígeno 1 embrionario específico de estadio, o antígeno 1 embrionario específico de estadio o molécula 1 de adhesión celular al antígeno carcinoembrionario. De forma similar, las células progenitoras por lo general no presentan marcadores de expresión fenotípica para células madre de linaje de la capa germinal, tales como nestina para células del linaje ectodérmico o fetoproteína para células del linaje endodérmico.

45 Una célula progenitora puede ser multipotente, teniendo la capacidad de formar múltiples tipos celulares. Una célula precursora de origen ectodérmico que reside en la adenohipofisis y denominada célula progenitora adenohipofisaria es un ejemplo de una célula progenitora multipotente. Esta célula formará gonadótrofes, somatótrofes, tirótrofes, corticotróficos y mamótrofes. Las células progenitoras para linajes celulares particulares tienen perfiles únicos de grupo de superficie celular de marcadores de diferenciación (CD) y perfiles únicos de marcadores de expresión de diferenciación fenotípica. Por lo general, las células progenitoras no se diferencian de forma espontánea en medio definido sin suero en ausencia de un agente de diferenciación, tal como LIF o ADF. Por lo tanto, a diferencia de las células madre embrionarias que se diferencian de forma espontánea en estas condiciones, las células progenitoras permanecen quiescentes a menos que actúen sobre agentes proliferativos (tales como el factor de crecimiento obtenido de plaquetas) y/o agentes progresivos (tales como insulina, factor I de crecimiento de tipo insulínico o factor II de crecimiento de tipo insulínico).

55 Las células progenitoras pueden regular su comportamiento de acuerdo con las demandas cambiantes, de modo que después del trasplante se activan desde la quiescencia hasta la proliferación y generan tanto nuevas células satélite como cantidades sustanciales de nuevas células diferenciadas. Por ejemplo, las unidades contráctiles del músculo son miofibras, células sincitiales alargadas que contienen cada una muchos cientos de mionúcleos postmitóticos. Las células satélite residen por debajo de la lámina basal de miofibras y funcionan como precursores miogénicos durante la regeneración muscular. Como respuesta a la lesión muscular, las células satélite se activan, proliferan y se diferencian, durante lo cual se fusionan en conjunto para reparar o reemplazar las miofibras dañadas. Cuando las células satélite se eliminan de sus miofibras mediante un procedimiento de valoración física no

enzimática, conservan su capacidad para generar cantidades sustanciales de nuevo músculo después del injerto que no pueden alcanzar mediante digestión enzimática. Las técnicas convencionales de desagregación enzimática alteran el potencial miogénico. Collins y Partridge "Self-Renewal of the Adult Skeletal Muscle Satellite Cell" Cell Cycle 4: 10, 1338-1341 (2005).

5 En consecuencia, la presente divulgación también contempla el uso de células madre no embrionarias, tales como las descritas anteriormente. En algunas realizaciones, las células madre mesenquimales (MSC) se pueden obtener a partir de médula, periostio, dermis y otros tejidos de origen mesodérmico (véanse, por ejemplo, los documentos de patente de Estados Unidos n.ºs 5.591.625 y 5.486.359). Las MSC son los blastocitos pluripotenciales formativos que se diferencian en los tipos específicos de tejido conectivo (es decir, los tejidos del cuerpo que soportan los elementos especializados, en particular el tejido adiposo, areolar, óseo, cartilaginoso, elástico, estroma de la médula, músculo y tejidos conectivos fibrosos) dependiendo de diversas influencias ambientales *in vivo* o *in vitro*. Aunque estas células están normalmente presentes a frecuencias muy bajas en la médula ósea, se han descrito diversos procedimientos para aislar, purificar y replicar las células madre mesenquimales obtenidas a partir de la médula en cultivo, es decir, *in vitro* (véanse también los documentos de patente de Estados Unidos n.ºs 5.197.985 y 5.226.914 y la Publicación PCT de N.º WO 92/22584).

También se han descrito también diversos procedimientos para el aislamiento de células madre hematopoyéticas (véanse, por ejemplo, los documentos de patente de Estados Unidos n.ºs 5.061.620, 5.750.397, 5.716.827). Se contempla que los procedimientos de la presente divulgación se pueden usar para producir células linfoides, mieloides y eritroides a partir de células madre hematopoyéticas. El linaje linfoide, que comprende linfocitos B y linfocitos T, proporciona la producción de anticuerpos, la regulación del sistema inmunológico celular, la detección de agentes extraños en la sangre, la detección de células extrañas para el hospedador y similares. El linaje mieloides, que incluye monocitos, granulocitos, megacariocitos, así como otras células, controla la presencia de cuerpos extraños en el torrente sanguíneo, proporciona protección contra células neoplásicas, neutraliza materiales extraños en el torrente sanguíneo, produce plaquetas y similares. El linaje eritroide proporciona los glóbulos rojos, que actúan como vehículos de oxígeno.

En consecuencia, la presente divulgación también contempla el uso de células madre neuronales, que por lo general se aíslan de fetos en desarrollo. El aislamiento, el cultivo y el uso de células madre neuronales se describen en los documentos de patente de Estados Unidos n.ºs 5.654.183; 5.672.499; 5.750.376; 5.849.553; y 5.968.829. Se contempla que los procedimientos de la presente divulgación pueden usar células madre neuronales para producir neuronas, glía, melanocitos, cartílago y tejido conectivo de cabeza y cuello, estroma de diversas glándulas secretoras y células en el tracto de flujo de salida del corazón.

Los extractos se pueden preparar a partir de las células madre embrionarias de mamíferos. En algunas realizaciones, las células se lavan en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y en tampón de lisis celular (HEPES 100 mM, pH 8,2, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ditiotreitól 1 mM e inhibidores de proteasa), se sedimentan a 400 g, se vuelven a suspender en 1 volumen de tampón de lisis celular frío y se incuban durante 30-45 minutos en hielo para permitir la hinchazón. Las células se sonicán sobre hielo en alícuotas de 200 µl usando un sonicador de pulso Labsonic-M equipado con una sonda de 3 mm de diámetro (B. Braun Biotech, Melsungen, Alemania) hasta que todas las células y núcleos se lisan. El lisado se sedimenta a 15.000 g durante 15 min a 4 °C para sedimentar el material ordinario. Se toman alícuotas del sobrenadante, se congela en nitrógeno líquido y se puede almacenar hasta 9 meses a -80 °C. Si fuera necesario, los extractos se pueden diluir con H<sub>2</sub>O antes de su uso para ajustar la osmolalidad a -300 mOsm (es decir, isotonicidad).

Los extractos de células madre adultas se pueden usar como tal, mientras que en otros casos, los extractos se formulan ya sea solos o con otros componentes como se describe con más detalle a continuación.

### C. Extractos de glóbulos rojos del cordón umbilical

45 Se describen composiciones que comprenden células sanguíneas del cordón umbilical o extractos preparados a partir de células sanguíneas del cordón umbilical. Las células o extractos se pueden formular para aplicación tópica como se describe con más detalle a continuación. El trasplante de sangre del cordón umbilical se ha realizado con éxito para tratar individuos con enfermedades sanguíneas; los donantes usados fueron los hermanos recién nacidos que son emparejamientos perfectos de HLA para el hermano afectado. Las ventajas de la sangre del cordón umbilical como fuente de células madre hematopoyéticas para el trasplante son claras. En primer lugar, la capacidad proliferativa de las células madre hematopoyéticas en la sangre del cordón umbilical es superior a la de las células en la médula o la sangre de los adultos. Dado que proliferan rápidamente, las células madre en una sola unidad de sangre del cordón umbilical pueden reconstituir todo el sistema hematopoyético. En segundo lugar, el uso de sangre del cordón umbilical reduce el riesgo de enfermedad de injerto contra huésped, el principal obstáculo para el éxito del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas. La enfermedad de injerto contra huésped está causada por una reacción de los linfocitos T en el injerto a antígenos de HLA en el receptor; La inmadurez de los linfocitos en la sangre del cordón umbilical amortigua esa reacción. Un estudio europeo conjunto mostró que los receptores de sangre del cordón umbilical de hermanos con HLA idéntico tenían un menor riesgo de enfermedad de injerto contra huésped aguda o crónica que los receptores de médula de hermanos con HLA idéntico. Los niños con leucemia aguda que recibieron sangre de cordón umbilical con HLA no coincidente de un donante no relacionado también

presentada un menor riesgo de enfermedad de injerto contra huésped que los receptores de médula con HLA no coincidente de un donante no relacionado (Hematopoietic stem-cell transplants using umbilical-cord blood, New England Journal of Medicine, 2001, 344(24): 1860-1861, editorial).

5 Las células sanguíneas del cordón umbilical de hermanos o niños con HLA coincidente se podrían usar para hacer extractos o se podrían aplicar para el uso que se contempla en la presente divulgación.

**D. Extractos de células, huevos y embriones no mamíferos**

Las composiciones de la presente divulgación usan extractos de células, huevos y embriones de vertebrados, que incluyen, pero no se limitan a, Superclase Gnathostomata (vertebrados de mandíbula), Euteleostomi (vertebrados óseos), Clase Actinopterygii (peces con aletas rayadas), Clase Sarcopterygii (peces de aletas lobuladas y vertebrados terrestres), Tetrapoda (tetrápodos), Amniota (amniotas), Synapsida (sinápsidos), Clase Mammalia (mamíferos), Early Therapsida (terápsidos tempranos), Clase Reptilia (reptiles), Anapsida (tortugas terrestres y tortugas acuáticas), Orden Testudines (tortugas terrestres y tortugas acuáticas), Diapsida (aves, cocodrilos, lagartos, serpientes y similares), Archosauria (aves y cocodrilos), Orden Crocodilia (caimanes, cocodrilos y similares), Lepidosauria (anfisbenios, lagartos, serpientes y tuátaras), Orden Rhynchocephalia (tuátaras), Orden Squamata (anfisbenios, lagartos, y serpientes), Clase Amphibia (anfibios), Subclase Dipnoi (peces pulmonados), Actinistia, Orden Coelacanthiformes (celacantos), Clase Chondrichthyes (rayas, tiburones y similares), Placodermi (ostracodermos y placodermos), Clase Cephalaspidomorphi, más preferentemente huevos o embriones de pez, gamba, erizo de mar o anfibio. Se pueden usar huevos de pez, gamba, erizo de mar o anfibio no fertilizados pero activados. La presente divulgación no se limita al uso de ningún tipo de huevos en particular. De hecho, se contempla el uso de una diversidad de huevos, que incluyen, pero no se limitan a, huevos de Xenopus, gamba, erizo de mar, salmón, trucha o pez cebra. En algunas realizaciones, los huevos se recogen de hembras maduras y se activan de forma espontánea tras el contacto con agua. Los huevos se pueden lavar en solución salina de Ringer. En algunos casos, los huevos no son de una especie aviar.

**E. Preparación y estabilización de extractos y fracciones**

25 Los extractos de la presente divulgación se preparan a partir de cualquiera de las fuentes que se describen en la sección A-D. Los extractos pueden ser extractos celulares. Los extractos celulares de la presente divulgación pueden ser composiciones de células alteradas tales como células madre u huevos. Las células se pueden alterar mediante una diversidad de procedimientos, que incluyen, pero no se limitan a, cizallamiento o mezcla mecánicos, sonicación o lisis osmótica. Preferentemente, los extractos celulares se pueden procesar adicionalmente para producir una composición que esté sustancialmente libre de lípidos asociados naturalmente con las células, tales como componentes de la membrana celular. Sustancialmente libre de lípidos significa que el extracto celular comprende menos de aproximadamente un 1 %, preferentemente menos de aproximadamente un 0,5 %, y preferentemente menos de aproximadamente un 0,1 % de lípidos que están asociados de forma natural con las células usadas para preparar el extracto celular. Los extractos pueden comprender menos de aproximadamente un 35 1 % y preferentemente menos de un 0,1 % de colesterol u ovoalbúmina. En consecuencia, en algunos casos, el extracto celular comprende carbohidratos, proteínas, proteínas glicosiladas o modificadas de otro modo, péptidos, aminoácidos, ARN (ARNm, ARNs, ARNm, ARNr), ADN, agua, etc., y combinaciones de los mismos. En algunos casos, los extractos celulares pueden comprender pequeñas cantidades de lípidos asociados de forma natural con las células, así como componentes nucleares tales como cromosomas, ácidos nucleicos y proteínas nucleares. En algunos casos, el extracto celular es preferentemente un extracto o fracción citoplásmicos preparados eliminando la membrana nuclear, la membrana celular y otros materiales insolubles en agua asociados de forma natural con las células. En algunos casos, estos componentes se eliminan por centrifugación o fraccionamiento de las células alteradas. En algunas realizaciones, el extracto celular es preferentemente un extracto o fracción acuosos que comprenden componentes celulares solubles en agua tales como proteínas, ARNm, y carbohidratos.

45 Para preparar extractos se puede usar una diversidad de procedimientos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los huevos se colocan "secos" en un tubo de centrifuga de 15 ml de vidrio, y se trituran mediante sedimentación a 15.000 g durante 15 min. Esto produce tres capas: una fracción superior lipídica, que se recoge, se toman alícuotas y se congela; una fracción celular o citoplasmática media, que también se recoge, se toman alícuotas y se congela; y una fracción de sedimento, que se desecha. En algunas realizaciones, la fracción o extracto celular comprende principalmente contenidos del citoplasma. La fracción celular se usa como extracto. En algunas realizaciones, la fracción celular se puede usar en combinación con una fracción lipídica. La fracción citoplasmática se puede eliminar adicionalmente por sedimentación a 50.000, 100.000 o 200.000 g para proporcionar un extracto celular adicional que es principalmente una fracción de extracto soluble en agua. Independientemente de la fracción usada, el extracto se puede diluir a aproximadamente 300 mOsm con tampón de lisis celular (véase anteriormente), si fuera necesario. En consecuencia, en algunas realizaciones preferentes se usa un extracto soluble en agua preparado a partir de huevos o embriones.

60 En otros casos, los huevos se suspenden en 0,5 volúmenes de tampón de lisis celular y se sonicen en hielo hasta que todos los huevos se lisan. El material en partículas se sedimenta a 15.000 g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante constituye el extracto. Como se ha mencionado anteriormente, la osmolaridad se puede ajustar a 300 mOsm si fuera necesario. El extracto también se puede eliminar como se ha indicado anteriormente.

Además, en otros casos, los huevos se suspenden en tampón de lisis celular como se ha descrito anteriormente. Los huevos se lisan por homogeneización usando un mortero y mano de vidrio Dounce (Kontes, tipo A o B). El lisado se sedimenta y se trata como se ha descrito anteriormente.

5 Se proporcionan composiciones, preparadas a partir de fuentes naturales como las que se han descrito anteriormente o a partir de materiales de fuente artificial, o una combinación de los mismos. En algunos casos, los extractos se caracterizan por tener una osmolaridad de aproximadamente 330 a 440, preferentemente de aproximadamente 350 mOsm. En algunos casos, los extractos tienen un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,7, preferentemente un pH de aproximadamente 6,5 - 7,0. En algunos casos, los extractos tienen un contenido de proteína de aproximadamente 100 a 250 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 160 a 190 mg/ml, y lo más preferentemente aproximadamente 120 mg/ml. En algunos casos, las composiciones tienen un contenido de agua de aproximadamente un 20 a un 90 tanto por ciento en peso/peso (p/p) de agua, preferentemente de aproximadamente un 37 a un 79 % en p/p de agua. En algunos casos, los extractos tienen una densidad de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,4 g/ml, preferentemente de aproximadamente 1,1 g/ml. En algunos casos, las composiciones comprenden oligoelementos que incluyen, pero no se limitan a, calcio, fósforo, cinc, cobre y hierro. En algunos casos, las composiciones comprenden vitaminas, que incluyen, pero no se limitan a, vitaminas A, E, riboflavina, niacina, B6, pantotenato cálcico y B12. En algunos casos, la presente divulgación proporciona una composición de huevos frescas que comprende: de un 2,7 a un 3,4 % de proteína; de un 3 a un 5 % de carbohidratos; de un 1,0 a un 1,7 % de grasas en forma de fosfolípidos, y de un 0,01 a un 0,05 % de minerales en huevos frescas, deberían ser menos grasas y proteínas totales más elevadas en el extracto), de un 37 a un 79 por ciento en peso de agua. En algunos casos, los extractos comprenden además una fracción lipídica. En algunos casos, la fracción lipídica comprende de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 80 % de ácidos grasos insaturados. En otros casos, las composiciones comprenden fosfolípidos, incluyendo fosfatidil colinas (lecitinas) o fosfatidil etanolamina (cefalinas), y en menor grado fosfatos de inositol, cerebrosidos y esfingomielinas. En algunos casos, la fracción lipídica es de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 % o un 5 % de la composición total, mientras que en otros casos, las composiciones están sustancialmente libres o libres de lípidos.

En algunos casos, los extractos artificiales se complementan con 1) agua, 2) cualquier tipo de proteína (BSA, albúmina, vitelogenina, mezclas de aminoácidos, etc.), 3) vitaminas y minerales como se ha descrito anteriormente, 4) sales u osmoles para crear una osmolaridad de aproximadamente 350 mOsm, 5) glicerol u otros agentes para aumentar la viscosidad, 6) 6) lípidos tales como lecitinas, cefalinas y otros fosfolípidos, 7) carbohidratos, 8) factores de crecimiento tales como FGF, EGF e IGF, 9) y quimioattractores tales como SLC/6Ckine/Exodus2/TCA4 y CKbeta-11/MIP-3beta/ELC, 10) ácido o base para ajustar el pH a 6,2 - 7,2, y 11) conservantes tales como metil parabeno, propil parabeno, BHA o BHT.

En algunos casos, los huevos o extractos se tratan para impedir el crecimiento bacteriano. Se contempla el uso de una diversidad de procedimientos. En algunos casos, se combinan los siguientes procedimientos. En algunos casos, los huevos no fertilizados o fertilizados (por ejemplo, huevos de peces o anfibios) se tratan antes de la homogeneización con un agente bactericida o bacteriostático. Los agentes preferentes incluyen, pero no se limitan a, agentes que contienen yodo tales como betadine, bufodine y povidona yodada, y otros agentes tales como novasán, hipoclorito sódico, bacitracina, sulfato de polimixina B, compuestos que contienen plata, tales como sulfadiazina de plata y nitrato de plata, acetato de mafenida, nistatina, gentamicina, neomicina. En otros casos, los extractos se tratan después de la homogeneización para evitar el crecimiento bacteriano. En algunos casos, los extractos, tales como los extractos celulares o la fracción citoplasmática, se tratan por calentamiento. En algunos casos, los extractos se calientan a aproximadamente 37, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 grados Celsius durante aproximadamente 30 segundos o 1, 2, 5, 10, 20, 30, 60 o 120 minutos.

En algunos casos, los huevos o extractos se filtran, preferentemente a través de filtros de 0,22 o 0,45  $\mu\text{m}$  para eliminar las bacterias. En algunos casos, antes o después del filtrado, los extractos se tratan mediante centrifugación adicional (15 min - 2 horas) después de calentar el extracto a 56 °C para centrifugar cualquier bacteria presente.

En otros casos, los huevos se lavan en un agente que contiene azufre (por ejemplo, polisulfuro cálcico o tiosulfato cálcico (azufre de cal) antes de su preparación. En algunos casos, se añade azufre a los extractos para eliminar las bacterias. En otros casos, se añade peróxido de benzoílo a los extractos. En algunos casos, los huevos se lavan en un 0,001 % a aproximadamente un 0,2 % en peso de un clorito metálico y ácido suficiente para ajustar el pH de la solución de aproximadamente 2,2 a aproximadamente 4,5 para eliminar las bacterias. En otros casos, los huevos y/o extracto se colocan en un tambor de vacío y se mezclan con una solución natural que contiene sal, vitamina C o ácido cítrico y agua para eliminar las bacterias. En algunas realizaciones, los huevos y/o el extracto se agitan, se somete una agitación vorticial, se sonicen, se agitan o se remueven con agua salada o tampón líquido para desplazar las bacterias y el filtro de vacío del líquido para eliminar las bacterias. Será posible comprobar el contenido bacteriano en el líquido y en los huevos tratados para el control de calidad. En algunos casos, la electroforesis de los huevos y/o extracto se usa para eliminar las bacterias. Se contempla que tales procedimientos usen las influencias de la doble capa eléctrica, intensidad del campo eléctrico, gradiente de densidad eléctrica, pH de la solución tampón, fuerza iónica de la solución tampón, etapa de crecimiento de las bacterias y agente tensioactivo aniónico después de movilidad electroforética de algunas especies de bacterias.

En algunos casos, los lípidos se eliminan mediante tratamientos con el homogenado antes de la centrifugación o con el extracto después de la centrifugación. Se contempla el uso de una diversidad de procedimientos. En algunos casos, los lípidos se eliminan por filtración a través de papel o filtro absorbente de grasa aplicando un sistema de succión al vacío a un recipiente con un filtro en el fondo, en el que el extracto se coloca en el recipiente y se aspira a través del filtro. En algunos casos, los lípidos se eliminan usando un material absorbente y un recipiente de contención externo. El extracto se introduce en un recipiente lleno de material absorbente a través de una bomba y después se recupera aplicando un vacío. En algunos casos, los lípidos se eliminan con sistemas de contracción de fibras huecas y/o disolventes de extracción para eliminar los lípidos de los fluidos viscosos, en los que un fluido se pone en contacto con un disolvente de extracción, que hace que los lípidos en el fluido se separen del fluido o a que los lípidos en los organismos que contienen lípidos se separen del organismo que contiene lípidos, usando al menos un elemento de contacto de fibra hueca.

En algunos casos, los homogenados y extractos se pueden estabilizar mediante la adición de uno o más agentes estabilizantes, tales como un agente estabilizante de lípidos, o mediante envasado en un envase diseñado para evitar la oxidación. En algunos casos, algunos antioxidantes tales como vitamina E se añaden al extracto para reducir la velocidad de oxidación de los lípidos. En algunos casos, los extractos se envasan en un recipiente en una atmósfera inerte. En algunos casos, el extracto se envasa para reducir la tasa de oxidación de lípidos en envases libres de aire, tales como bolsas revestidas de aluminio (menos de 10 kg por bolsa para la eliminación eficaz de oxígeno) o envases llenos de nitrógeno para eliminar el oxígeno. En otros casos, los extractos se envasan en recipientes envasados al vacío con un sistema de suministro con bomba.

En algunos casos, los extractos de células madre se preparan de manera similar. En estos casos, las células madre se alteran primero y a continuación se centrifugan como se ha mencionado anteriormente para eliminar los residuos celulares insolubles. Por lo general, las células madre comprenden mucho menos material lipídico, de modo que la centrifugación inicial produce dos fracciones principales, un sedimento y fracciones celulares que contienen principalmente componentes citoplásmicos. En algunos casos, las células, ya sea una placa de células o células recogidas a partir de matraces o fermentadores, se lavan en PBS enfriado con hielo. Cuando se usa una placa de células, las células se raspan y se transfieren a un tubo de centrifugación enfriado con hielo, tal como un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. En algunos casos, las células se sedimentan y el sobrenadante se elimina. A continuación, las células se alteran. En algunos casos, se añade una solución hipotónica a las células en un volumen de aproximadamente 1,5:1 a 3,0:1 en comparación con el sedimento celular. Una solución hipotónica adecuada comprende HEPES 10 mM a pH 7,9, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 10 mM 3,33, DTT 0,5 mM, y PMSF 0,2 mM. En algunos casos, a continuación se añade una solución al 10 % de Triton X (volumen de aproximadamente 1/20) al sedimento y el sedimento se vuelve a suspender el gránulo mediante agitación vorticial. En algunos casos, las células se homogeneizan después, por ejemplo con un homogeneizador Dounce o se sonicán para alterar aún más las células. En algunos casos, los residuos celulares se sedimentan a continuación por centrifugación, por ejemplo, 6000 RPM a 4 °C durante 30 segundos. El sobrenadante se recoge a continuación como el extracto celular.

En algunos casos, los extractos celulares descritos anteriormente, y más preferentemente las fracciones intermedias, se fraccionan adicionalmente. Se puede usar una variedad de procedimientos, que incluyen, pero no se limitan a, gradientes de FICOL, centrifugación en gradiente, precipitación de proteínas, liofilización, cromatografía en columna, tal como cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía por afinidad, separación en gel, cromatografía líquida a alta presión, CHIP, e inmunoprecipitación. Se reconocerá que estas etapas de fraccionamiento producen fracciones correspondientes tales como fracciones liofilizadas, fracciones de cromatografía por afinidad, fracciones precipitadas, etc.

En algunos casos, las fracciones se combinan a continuación o se vuelven a solubilizar con componentes adecuados para preparar composiciones para administración tópica como se describe con más detalle a continuación.

## F. Inhibidores Epigenéticos

Las composiciones de la presente divulgación comprenden adicionalmente inhibidores epigenéticos. En casos preferentes, uno o más inhibidores epigenéticos se combinan con uno o más de los extractos celulares que se describen en las Secciones A-E. La presente divulgación no se limita al uso de ningún inhibidor epigenético en particular. De hecho, se contempla el uso de una variedad de inhibidores epigenéticos, que incluyen, pero no se limitan a, inhibidores epigenéticos sintéticos e inhibidores epigenéticos aislados obtenidos a partir de fuentes naturales. Los ejemplos de inhibidores epigenéticos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de histona desacetilasa, inhibidores de ADN metiltransferasa y algunas vitaminas.

En algunos casos, los inhibidores epigenéticos comprenden un extracto natural que contiene butirato o ácido butírico preparados a partir de alimentos naturales tales como mantequilla de grasas animales o leche (por ejemplo, leche de vaca o queso), aceites vegetales (por ejemplo, *Heracleum giganteum* (pastinaca de vaca) y *Pastinaca sativa* (pastinaca)), o té Kombucha (incluye ácido butírico como resultado de la fermentación que contiene butirato). La preparación del extracto puede incluir la fermentación por bacterias anaeróbicas obligadas (por ejemplo, *Clostridium butyricum*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium pasteurianum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Eubacterium limosum*). Los extractos de grasa animal o de aceite vegetal se pueden preparar mediante

procedimientos químicos o físicos que inducen la liberación de ácido butírico a partir del glicérido por hidrólisis. El extracto también se podría preparar por fermentación de azúcar o almidón en los alimentos naturales mediante la adición de *Bacillus subtilis*, añadiendo carbonato cálcico para neutralizar los ácidos formados.

5 En otros casos, los inhibidores epigenéticos comprenden un extracto natural de uvas tintas que contienen la fitoalexina resveratrol, incluyendo un extracto de zumo o zumo fermentado (vino) de uvas tintas. Los extractos se podrían preparar mediante la creación mecánica de las uvas, separación de la piel de la carne y las semillas y extraer la fitoalexina por procedimientos químicos o mecánicos, o se podrían preparar a partir de zumo de uva recién preparado o fermentado mediante procedimientos químicos o físicos como ebullición, fraccionamiento, cromatografía por afinidad, liofilización o separación en gel.

10 En otros casos, los inhibidores epigenéticos comprenden un extracto natural que contiene cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) preparado a partir de organismos que contienen las enzimas necesarias para la síntesis de B<sub>12</sub> tales como bacterias y arqueas, o productos naturales que albergan tales bacterias productoras de B<sub>12</sub> incluyendo carne (especialmente hígado y marisco), huevos y productos lácteos. Los extractos se pueden preparar mediante procedimientos químicos o físicos tales como homogeneización seguida de fraccionamiento, cromatografía por  
15 afinidad, liofilización o separación en gel.

En otros casos, los inhibidores epigenéticos comprenden un extracto natural que contiene una o varias variantes de la vitamina B, preparados a partir de cualquiera de patatas, plátanos, lentejas, guindillas, tempeh, hígado, pavo, atún, levadura nutricional (o levadura de cerveza, cerveza o levadura Marmite. Los extractos se pueden preparar mediante procedimientos químicos o físicos tales como homogeneización seguida por ejemplo, por fraccionamiento, cromatografía por afinidad, liofilización o separación en gel.  
20

En otros casos, los inhibidores epigenéticos comprenden un extracto natural que contiene retinoides o precursores de retinoides, preparados a partir de fuentes animales (por ejemplo, leche y huevos) que contienen ésteres de retinilo, o de plantas (por ejemplo, zanahorias, espinaca) que contienen carotenoides pro-vitamina A. El extracto se puede modificar mediante hidrólisis (fuentes animales) de ésteres de retinilo para dar lugar a retinol, mientras que los extractos de plantas que contienen carotenoides pro-vitamina A se pueden escindir para producir retinal (retinaldehído), que se puede reducir adicionalmente de forma reversible para producir retinol o se puede oxidar de forma irreversible para producir ácido retinoico. Los metabolitos de retinoides activos mejor descritos son 11-cis-retinal y los isómeros all-trans y 9-cis del ácido retinoico, que se pueden añadir a este extracto.  
25

Los ejemplos de otros inhibidores de ADN metiltransferasa incluyen, pero no se limitan a, 5-Azacidina, 5-Aza-20-desoxicitidina, Arabinosil-5-azacidina, 5-6-Dihidro-5-azacidina, 5-Fluoro-20-desoxicitidina, EGX30P, Epigallocatequin-3-galato, Polifenol de té verde, Hidralazina, MG98, Procainamida, Procaína y Zebularina. Los ejemplos de otros inhibidores de histona desacetilasa incluyen, pero no se limitan a, apicidina, butiratos, fenilbutirato, bishidroxamida del ácido m-carboxinámico (CBHA), péptido 1 que contiene ácido hidroxámico cíclico (CHAP1), TSA-trapoxina híbrida, epóxido de depudecina, Depsipéptido FR901228, Benzamidina, LAQ824, Oxamfiatina, MGCD0103, PXD101, Piroxamida, Ácido Subérico Bishidroxámico (SBHA), Ácido Suberoilánilida Hidroxámico (SAHA), Tricostatina A (TSA), Trapoxina A y Ácido valproico.  
30  
35

#### G. Procedimientos de administración tópica

Los extractos descritos anteriormente (o componentes de los extractos) se pueden formular para administración tópica. Las formulaciones generales para administración tópica se describen en Pharmaceutical Sciences de Remington, 18ª Edición, Mack Publishing, pág. 1288-1300 [1990]. En consecuencia, en algunos casos, los extractos se formulan como un gel o pasta de base acuosa de agua, pomada, crema (anhidra o hidratada), loción (anhidra o hidratada), emulsión, pulverización, solución, aerosol, barrita (crema sólida), tirita líquida, polvo, pulverización por inhalación, aerosol nasal, gotas basales, gotas para las mejillas, gotas sublinguales, gotas o aerosoles para los ojos, gotas o aerosoles para los oídos y parches transdérmicos.  
40

#### 45 H. Otros procedimientos de administración

Los extractos descritos anteriormente (o componentes de los extractos) se pueden formular para su administración mediante una diversidad de procedimientos. En algunos casos, los extractos descritos anteriormente se formulan para su administración a la piel, tracto gastrointestinal, depósitos de grasa, cartílago, hueso, tejido conectivo, músculo u órganos internos. En algunos casos, los extractos o componentes de los mismos se formulan para administración oral con o sin vehículos adecuados tales como almidón, sacarosa o lactosa en comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, soluciones, líquidos, pastas, suspensiones y emulsiones. En algunos casos, el vehículo de administración oral comprende un revestimiento entérico. En otros casos, los extractos o componentes de los mismos se formulan para administración rectal como una cápsula, crema, supositorio o líquido. En algunos casos, los extractos o componentes de los mismos se inyectan mediante jeringuilla en la cavidad peritoneal o en órganos o tejidos internos. En algunas realizaciones, los extractos o componentes de los mismos se formulan para su administración mediante una bomba osmótica.  
50  
55

También se describen casos en los que los extractos o componentes de los mismos se suministran por microinyección, preferentemente mediante bombardeo de partículas (es decir, con una pistola genética). En la

técnica se conoce en procedimientos de transferencia de genes mediados por partículas, están disponibles en el mercado e incluyen, pero no se limitan a, el instrumento de suministro de genes accionado por gas que se describe en McCabe, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.584.807. Este procedimiento implica revestir la secuencia de ácido nucleico de interés sobre partículas de metal pesado y acelerar las partículas revestidas bajo la presión de gas comprimido para su suministro al tejido diana. También están disponibles otros procedimientos de bombardeo de partículas. Por lo general, estos procedimientos implican la deposición del extracto o componentes del mismo sobre la superficie de partículas pequeñas y densas de un material tal como oro, platino o tungsteno. A continuación, las partículas se revisten por sí mismas sobre una superficie rígida, tal como una placa metálica, o sobre una lámina de vehículo preparada a partir de un material frágil tal como tereftalato de polietileno. A continuación, la lámina revestida se acelera hacia el tejido biológico diana. El uso de la lámina plana genera una dispersión uniforme de partículas aceleradas que maximiza el número de células que reciben partículas en condiciones uniformes, dando como resultado la introducción de la muestra de ácido nucleico en el tejido diana. Esta divulgación contempla el uso descrito de pistola genética para suministrar extractos o componentes de extractos como se ha definido anteriormente.

Además, en otros casos, los extractos o componentes de células madre adultas o de huevo están microencapsulados (por ejemplo, con colágeno o glicosaminoglicanos), se forman en nanopartículas (por ejemplo, lecitina encapsulada en un núcleo de aceite), liposomas, microemulsiones o nanoemulsiones, cuerpos oleosos, películas de fluido molecular de retinol, vesículas unilamelares, vesículas multilamelares, perlas o esponjas esféricas cargadas previamente, vesículas elásticas, etc.

## I. Perfiles de composición

Se describe una composición para aplicación tópica y/o interna como una combinación de extractos con lípidos y/o agua y/o carbohidratos y/o ácidos nucleicos y/o proteínas y/o sustancias de señalización. En algunos casos, el extracto descrito está formado por células completas o una combinación de lípidos y/o carbohidratos y/o ácidos nucleicos y/o proteínas y/o sustancias de señalización de las células de las que se extrae el extracto, o de compuestos sintéticos y/o inversiones naturales de lípidos y/o carbohidratos y/o ácidos nucleicos y/o proteínas y/o sustancias de señalización. Los perfiles de señalización incluyen combinaciones de sustancias activas liberadas de células que están contenidas en extractos de células e incluyen versiones sintéticas y/o naturales de estas sustancias de señalización añadidas a extractos. Las sustancias de señalización contempladas incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento, endorfinas, hormonas, transmisores de aminoácidos, citoquinas inmunorreguladoras y otros factores asociados al sistema inmunológico.

El factor  $\beta 1$  de crecimiento transformante organiza la biología del tejido irradiado como un sensor de nivel tisular de estrés oxidativo, y es parte integrante de la respuesta al daño al ADN celular. El factor  $\beta 5$  de crecimiento transformante (TGF- $\beta 5$ ), un miembro de esta familia de factores de señalización encontrado en anfibios, se expresa en la regeneración de blastemas formadas bajo la regeneración de miembros (King y col., 2003), y todas las isoformas de TGF- $\beta$  en mamíferos se liberan por vía local a partir de diversas células en sitios de lesión y son importantes en el control de la fibrosis y cicatrización durante la reparación de tejidos de mamíferos. La manipulación de isoformas específicas de TGF- $\beta$  es capaz de producir una cicatrización de heridas sin cicatrices en ratones (Ferguson y O'Kane, 2004). El TGF- $\beta 1$  es una citoquina inmunorreguladora potente implicada en la supresión de la inflamación y la actividad reguladora de los linfocitos T, dando como resultado una tolerancia inmunológica (Chen y Wahl, 2003). Los estudios sobre cicatrización de heridas e inmunosupresión en mamíferos indican que la actividad diferencial de TGF- $\beta$  en la regeneración de los muñones de miembros de anfibios puede implicar la supresión de fibrosis y el establecimiento de condiciones que permiten la formación de blastema.

El factor alfa de crecimiento transformante (TGF- $\alpha$ ) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) secretados *in vitro* a partir de células madre pluripotentes humanas obtenidas a partir de células germinales embrionarias, denominadas células obtenidas del cuerpo embrionario (EBD), tienen la capacidad de restablecer la función neurológica en los animales mediante la protección de las neuronas del huésped de la muerte y facilitar la reaferentación de los cuerpos de las neuronas motoras (Kerr DA, y col., .Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. J Neurosci. 15 de junio de 2003; 23 (12): 5131-40).

Se ha demostrado que los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) tales como FGF-10 tienen importancia en el resurgimiento de miembros en ranas (Christen y Slack, 1997; Yokoyama y col., 2000).

El precursor de pro-opiomelanocortina (POMC) para la hormona  $\alpha$  estimulante de melanocitos ( $\alpha$ -MSH), endorfinas y varias otras hormonas peptídicas se expresa en la regeneración de blastemas (King y col., 2003), tanto en la piel como en el cerebro, pituitaria y otros órganos. El POMC tiene una importancia fundamental en la modulación de la actividad inmunológica dentro de la piel, debido principalmente a la actividad de  $\alpha$ -MSH (Luger y col., 1999). La liberación paracrina de péptidos de  $\alpha$ -MSH ejerce un potente efecto inmunomodulador sobre las células inmunológicas. La  $\alpha$ -MSH inhibe todas las formas de inflamación frente a las que se ha probado (Lipton y col., 1997) y la producción localizada de  $\alpha$ -MSH ayuda a mantener una respuesta inmunitaria óptima en sitios específicos de la piel (Paus y col., 2003). Se podría esperar que la expresión de células  $\alpha$ -MSH de un blastoma confiriera un efecto antiinflamatorio potencialmente importante para inhibir la fibrosis y la regeneración necesarias para el resurgimiento de miembros o tejidos.

La timosina-β4 es un factor de maduración tímica que también ha demostrado que estimula la angiogénesis, la migración de queratinocitos y la cicatrización de heridas (Malinda y col., 1999). La timosina-β4 ejerce una potente actividad antiinflamatoria y es secretada por macrófagos y linfocitos T de la piel, intestino y otros órganos además del timo (Young y col., 1999; Girardi y col., 2003). La tirosina-β4 está regulada en pseudoblastemas de rana (King y col., 2003) y blastemas regenera antes y las actividades de la timosina-β4 en los tejidos de las extremidades amputadas pueden incluir la inmunomodulación de la respuesta inflamatoria además de la estimulación de la migración epitelial y otros aspectos de regeneración.

#### J. Componentes adicionales

También se describen casos en los que los extractos o componentes de los mismos descritos anteriormente se combinan con componentes adicionales. En algunos casos, estos componentes adicionales aumentan la absorción, biodisponibilidad o penetración de los componentes del extracto. En los casos preferentes, los componentes del extracto pueden contener componentes naturales o una mezcla de componentes sintéticos. Los componentes pueden ser parcial o totalmente sintéticos. En algunos casos, la célula o extracto o componentes sintéticos preparados a partir de sustancias identificadas en los extractos se mezclan con una composición que comprende agua, lípidos sebáceos y epidérmicos y extractos celulares, proteínas y componentes de los mismos, comprende preferentemente aproximadamente una fracción lipídica al 10 % en peso, una fracción de proteína de aproximadamente un 10 % en peso, y una fracción volátil de aproximadamente un 80 % en peso.

El vérnix caseoso (vérnix) es un protector de la piel de origen natural. El vérnix es una sustancia rica en lípidos formada por sebo, lípidos epidérmicos y células epiteliales descamadas que cubren progresivamente la piel del feto en desarrollo, completamente rodeada de líquido amniótico, durante el último trimestre del embarazo. Se describen composiciones en las que la fracción lipídica comprende preferentemente componentes en el vérnix, es decir, lecitina y otros fosfolípidos, escualeno, ceras, ésteres de cera, ésteres de esteroides, ésteres de dioles, triglicéridos, esteroides libres y cuatro clases de ácidos grasos con una longitud de cadena de C<sub>12</sub> a C<sub>26</sub> (cadena lineal saturada, cadena lineal insaturada, cadena ramificada saturada, y cadena ramificada insaturada). En las realizaciones preferentes, los componentes lipídicos del vérnix son los siguientes, con los porcentajes relativos indicados, escualeno (9 %), ceras alifáticas (12 %), ésteres de esteroles (33 %), diésteres (7 %), triglicéridos (26 %), esteroides libres (9 %), otros lípidos (4 %). En realizaciones adicionales, la composición lipídica está formada por lípidos de huevo y/o huevos de pez con propiedades curativas de heridas, de las cuales un 30 % son lípidos de barrera (matriz proteolipídica); colesterol (1,1 %, 52,8 % de barrera), ácidos grasos libres (0,6 %, 27,7 % de barrera), fosfolípidos (0,4 %), ceramidas (0,7 %, 20,1 % de barrera). En otra realización preferente, la fracción proteica contiene los componentes proteicos del vérnix, es decir, queratina, filagrina, proteínas reguladoras (por ejemplo, EGF) y glutamina.

Los ácidos grasos dentro de las ceras alifáticas pueden ser ramificados y los ácidos grasos ramificados pueden ser metilados. La fracción proteica consiste en proteínas obtenidas de forma epidérmica, principalmente queratina y filagrina. La fracción proteica también contiene cantidades traza en el intervalo de concentraciones de aproximadamente micromolares a milimolares de proteínas reguladoras tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF), y cantidades traza de concentraciones de aproximadamente nanomolares a micromolares de la proteína tensioactiva tales como Tensioactivo A y Tensioactivo B. La fracción volátil es principalmente agua. La velocidad de evaporación de los componentes volátiles es relativamente lenta, supuestamente debido a un aumento de los requisitos de energía para la disociación de enlaces de hidrógeno y para la difusión desde el componente celular a través del componente lipídico para cambiar el agua del estado líquido al gaseoso. En realizaciones adicionales preferentes, la composición contiene ARNm contenido en extractos celulares, preferentemente extractos de células madre.

En algunos casos, las células madre embrionarias, células madre adultas o extractos o componentes de huevo se combinan con fosfolípidos u otras sustancias lipófilas, palmitilmiristratos, dimetilsulfóxido (DMSO), quitosano, polímeros orgánicos de cadena larga tales como polisacáridos, disolventes no acuosos, beta-glucano, componentes de ajuste del pH, agentes de inhibición del metabolismo de la piel, propilenglicol, butilenglicol, polietilenglicol, aceite de oliva u otros aceites naturales, dimetil isosorbida, dimetilformamida, salicilato de metilo, ácido oleico de cadena larga, mucopolisacáridos y otros agentes.

En algunos casos, los agentes adicionales incluyen, pero no se limitan a, ubiquitina, agentes antimicrobianos (alfa-defensinas, LL37, beta-defensinas, etc.), proteínas tensioactivas de la familia de la colectina (proteína A y D asociadas a colectina), nicotinamida y psoriacina.

En algunos casos, los agentes adicionales incluyen, pero no se limitan a, vitaminas, antioxidantes, minerales, extractos y compuestos químicos tales como alfa-tocoferol (vitamina E), melanina, vitamina C, provitamina A, propionato de retinilo, ácido retinoico, Vitamina D3, Nicotinamida (vitamina B), Niacinamida (Vitamina B3, exfolia la piel superficial), d-pantenol (ayuda en la reparación del daño cutáneo), vitamina A, ácido hialurónico, ceramidas, algas marinas (algas), aceite mineral (parafina líquida), Vaselina Glicerina Isohexadecano extracto de *Cirrus aurantifolia* (lima) Cera microcristalina (cera microcristalina), Alcohol de lanolina, aceite de semilla de *Seamum indicium* (sésamo), aceite de hoja de *Eucalyptus globulus* (eucalipto), sulfato de magnesio, semillas de *Sesamum indicum* (sésamo), semillas de *Medicago satvia* (alfalfa), semillas de *Helianthus annuus* (girasol), semillas de *Prunus*

5 *dulcis* (almendras en polvo), Sodio, Potasio, Cobre, Calcio, Magnesio, gluconato de cinc, Parafina, succinato de Vitamina E, Niacina, Beta-caroteno, oleato de decilo, diestearato de aluminio, octilundodecanol, ácido cítrico, cianocobalamina, Estearato de magnesio, Pantenol, Limoneno, Geraniol, Linalool, Hidroxicitronelal, Citronelol, Salicilato de bencilo, Citral, Metilcloroisotiazolina, Metilisotiazolinona, Alcohol desnat., Fragancia (perfume),

10 Butilenglicol, *Byrospermum parkii* (manteca de karité), extracto de cartílago de pez (peces), Polietileno, Poliisobuteno hidrogenado, Ciclopentasiloxano, ésteres de Cetilo, alcohol Cetearílico, Malaquita, neopentanoato de Isoestearilo, Polibuteno, Sacarosa, Sílice, Tocotrienol, extracto del fruto de *Cucumis sativus* (pepino), extracto de *Centella asiatica* (hidrocotilo), semillas de *Seamum indicium* (sésamo), aceite de hoja de *Eucalyptus globulus* (eucalipto),

15 semillas de *Medicago sativa* (alfalfa), semillas de *Helianthus annuus* (girasol), semillas de *Prunus dulcis* (almendras en polvo), Potasio, Cobre, Calcio, Magnesio, Cafeína, hialuronato sódico, ácido Linoleico, glutamato de Colesterilo/behenilo/octildodecil lauroilo, sesquiestearato de metilo y glucosa, Colesterol, Dimeticona, *Ocimum basilicum* (albahaca), *Mentha arvensis* (menta silvestre), crospolímero de Acrilatos/acrilato de alquilo C10-30, diestearato de Glicerilo, Cetearil glucósido, Steareth-10, Carbomer, Aminometil propanol, Limoneno, Linalool, salicilato de bencilo, EDTA Disódico, BHT, deshidroacetato sódico, fenoxietanol, metilparabeno, dióxido de titanio (CI 77891), éster de PEG-8 del ácido C12-20, aceite vegetal hidrogenado, vaselina, butilenglicol, glicerina, lanolina acetilada, glicoproteínas, Panax, extracto de raíz de Ginseng, Extracto de *Equisetum Arvense* (cola de caballo),

20 carbómero sódico, cera de abejas (cera alba), fosfato de cetilo, polifluorometilisopropil éter, alcohol bencilico, Linalool, hidroxicitronelal, alfa-isometil ionona, amil cinamal, hexil cinamal, extracto de *Verenia furfuracea* (musgo de árbol), Geraniol, Benzoato de benzilo, Butilfenol metilpropional, Eugenol, salicilato de bencilo, clorofenesina, fenoxietanol y metilparabeno.

25 En algunos casos, las composiciones de la presente divulgación son útiles para facilitar la administración de compuestos activos a través de la piel. En algunos casos precedentes, uno o más agentes activos, tales como una proteína, un compuesto orgánico pequeño o uno de los agentes identificados anteriormente, se combinan con la fracción citoplasmática de, por ejemplo, huevos de anfibio o pez fertilizados o no fertilizados. Las fracciones citoplásmicas y el procedimiento para preparar dichas fracciones se describen en otras partes de la solicitud en detalle. Por consiguiente, en algunos casos, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden una fracción citoplasmática de huevos de anfibio o pez y uno o más agentes activos. En algunos casos, la presente invención proporciona procedimientos para facilitar la penetración de uno o más agentes activos en la piel, que comprende proporcionar una composición que comprende un extracto citoplásmico de huevos de anfibio y/o pez y uno o más agentes activos y poner en contacto la piel de un sujeto con la composición. Como se ha descrito anteriormente, la composición puede ser preferentemente una emulsión, ungüento, crema, gel, pulverización, aerosol, líquido, etc.

35 Las proteínas a modo de ejemplo que pueden ser agentes activos incluyen, pero no se limitan a, péptido amiloide de Alzheimer (Ap), SOD1, presenilina 1 y 2, renina,  $\alpha$ -sinucleína, amiloide A, amiloide P, activina, anti-HER-2, bombesina, encefalina, inhibidores de proteasa, enzimas terapéuticas,  $\alpha$ 1-antitripsina, inhibidor de tripsina de mamífero, inhibidor de tripsina pancreática de mamífero, calcitonina, factor de hipertrofia cardiaca, cardiotrofinas (tales como cardiotrofina-1), proteínas CD (tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19), CFTR, CTNF, DNasa, gonadotropina coriónica humana, péptido asociado a gonadotropina de ratón, citoquinas, transtiretina, amilina, lipoproteínas, linfoquinas, lisozima, hormona de crecimiento (incluyendo la hormona de crecimiento humano),

40 hormona de crecimiento bovina, factor de liberación de la hormona del crecimiento, hormona paratiroidea, hormona estimulante del tiroides, factores de crecimiento, factor de crecimiento neurotrófico obtenido del cerebro, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (tales como  $\alpha$  FGF y  $\beta$  FGF), factor I y II de crecimiento de tipo insulínico, des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro), proteínas de unión a factor de crecimiento de tipo insulínico, factor de crecimiento nervioso (tal como NGF- $\beta$ ), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF),

45 factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptores de hormonas de crecimiento o factores de crecimiento, factor de crecimiento transformante (TGF) (tal como TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 o TGF- $\beta$ 5), factores neurotróficos (tales como neurotrofina-3, -4, -5, o -6), gelsolina, glucagón, calcitreínas, sustancia inhibidora mulleriana, factores neurotróficos, p53, proteína A o D, prorrelaxina, cadena A de relaxina, cadena B de relaxina, factores reumatoides, rodopsina, una albúmina de suero (tal como albúmina de suero humano), inhibina, insulina,

50 cadenas de insulina, la cadena A de insulina, cadena  $\beta$  de insulina, receptor de insulina, proinsulina, hormona luteinizante, integrina, interleuquinas (IL) (tales como IL-1 a IL-10, IL12, IL-13), eritropoyetina, trombopoyetina, fibrilina, hormona estimulante del folículo, factores de coagulación (tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrand, factores de anticoagulación (tales como proteína C, factor natriurético auricular, tensoactivo pulmonar), un activador de plasminógeno (tal como activador del plasminógeno de tejido humano o uroquinasa),

55 trombina, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  o  $\beta$ ,  $\alpha$ -cetoácido deshidrogenasa, adresinas, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), colágeno, factores estimulantes de colonias (CSF) (tales como M-CSF, GM-CSF y G-CSF), factor de aceleración de desintegración, receptores de buscador, interferones (tales como interferón-  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), queratina, factores osteoinductores, PRNP, proteínas reguladoras, superóxido dismutasa, proteínas de membrana de superficie, proteínas de transporte, receptores de linfocitos T, antígenos virales tales como una porción de la envoltura de SIDA, cadena ligera de inmunoglobulina, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo (tales como fragmento Fv monocatenario (scFv), anticuerpo monocatenario (scAb), fragmento de anticuerpo FAB, diacuerpo, triacuerpo,

60 fluoro-cuerpo), antígenos tales como inmunotoxinas gp120(IIIb), péptido natriurético auricular, proteína exocrina de la vesícula seminal,  $\beta$ 2-microglobulina, PrP, precalcitonina, ataxina 1, ataxina 2, ataxina 3, ataxina 6, ataxina 7, huntingtina, receptor de andrógenos, proteína de unión a CREB, gp120, p300, CREB, AP1, ras, NFAT, jun, fos,

proteína asociada a atrofia dentatorrubro palidoluisiana, una proteína microbiana (por ejemplo, proteína de unión a maltosa, transportador de ABC, glutatión S transferasa, tiorredoxina,  $\beta$ -lactamasa), proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja o derivados o fragmentos activos o variantes genéticas de cualquiera de los péptidos enumerados anteriormente.

- 5 Los ejemplos de compuestos orgánicos pequeños incluyen, pero no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (el AINE se puede seleccionar, por ejemplo, entre las siguientes categorías: (por ejemplo, derivados del ácido propiónico, derivados del ácido acético, derivados del ácido fenámico, derivados del ácido bifenilcarboxílico y oxicams)); fármacos antiinflamatorios esteroideos, incluyendo hidrocortisona y similares; fármacos antihistamínicos (por ejemplo, clorfeniramina, triprolidina); fármacos antitusivos (por ejemplo, dextrometorfano, codeína, carmifeno y carbetapentano); fármacos antipruriginosos (por ejemplo, metilidizina y trimeprizina); fármacos anticolinérgicos (por ejemplo, escopolamina, atropina, homatropina, levodopa); fármacos antieméticos y antináuseas (por ejemplo, ciclizina, meclizina, clorpromazina, buclizina); fármacos anorexígenos (por ejemplo, benfetamina, fentermina, clorfentermina, fenfluramina); fármacos estimulantes del sistema central (por ejemplo, amfetamina, metanfetamina, dextroamfetamina y metilfenidato); minoxidil; fármacos antiarrítmicos (por ejemplo, propanolol, procainamida, disopirramina, quinidina, encainida); fármacos bloqueadores P-adrenérgicos (por ejemplo, metoprolol, acebutolol, betaxolol, labetalol y timolol); fármacos cardiotónicos (por ejemplo, milrinona, amrinona y dobutamina); fármacos antihipertensivos (por ejemplo, enalapril, clonidina, hidralazina, minoxidil, guanadrel, guanetidina); fármacos diuréticos (por ejemplo, amilorida e hidroclorotiazida); fármacos vasodilatadores (por ejemplo, diltazem, amiodarona, isosuprina, nilidrina, tolazolina y verapamilo); fármacos vasoconstrictores (por ejemplo, dihidroergotamina, ergotamina y metilsergida); fármacos antiulcerosos (por ejemplo, ranitidina y cimetidina); fármacos anestésicos (por ejemplo, lidocaína, bupivacaína, clorprocaína, dibucaína); fármacos antidepresivos (por ejemplo, imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina); inhibidores de PDE5 tales como Viagra® o Cialis®; fármacos tranquilizantes y sedantes (por ejemplo, clordiazepóxido, benacitizina, benzquinamida, flurazepam, hidroxizina, loxapina y promazina); fármacos antipsicóticos (por ejemplo, clorproxiceno, flufenazina, haloperidol, molindona, tioridazina y trifluoperazina); fármacos antimicrobianos (fármacos antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoarios y antivirales).

Los fármacos antimicrobianos que son preferentes para su incorporación en la presente composición incluyen, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables de fármacos de  $\beta$ -lactama, fármacos de quinolona, ciprofloxacina, norfloxacina, tetraciclina, eritromicina, amikacina, triclosán, doxiciclina, capreomicina, clorhexidina, clortetraciclina, oxitetraciclina, clindamicina, etambutol, isotionato de hexamidina, metronidazol; pentamidina, gentamicina, kanamicina, lineomicina, metaciclina, metenamina, minociclina, neomicina, netilmicina, paromomicina, estreptomycin, tobramicina, miconazol, y amfanadina.

Otros restos de fármaco de uso en la práctica de la presente divulgación incluyen fármacos antineoplásicos (por ejemplo, antiandrógenos (por ejemplo, leuprolida o flutamida), agentes citocidas (por ejemplo, adriamicina, doxorubicina, taxol, ciclofosfamida, busulfán, cis-platino,  $\alpha$ -2-interferón), antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno), antimetabolitos (por ejemplo, fluorouracilo, metotrexato, mercaptopurina, tioguanina).

Las composiciones también pueden comprender hormonas (por ejemplo, medroxiprogesterona, estradiol, leuprolida, megestrol, octreótido o somatostatina); fármacos relajantes musculares (por ejemplo, cinamidina, ciclobenzaprina, flavoxato, orfenadrina, papaverina, mebeverina, idaverina, ritodrina, desfenoxilato, dantroleno y azumoleno); fármacos antiespasmódicos; fármacos activos en los huesos (por ejemplo, compuestos de fármaco de difosfonato y fosfonoalquilfosfinato); fármacos moduladores endocrinos (por ejemplo, anticonceptivos (por ejemplo, etinodiol, etinil estradiol, noretindrona, mestranol, desogestrel, medroxiprogesterona), moduladores de la diabetes (por ejemplo, gliburida o clorpropamida), anabolizantes, tales como testolcatona o estanozolol, andrógenos (por ejemplo, metil-testosterona, testosterona o fluoximesterona), antihipertensivos (por ejemplo, desmopresina) y calcitoninas).

45 En la presente divulgación también se usan estrógenos (por ejemplo, dietilestilbestrol), glucocorticoides (por ejemplo, triamcinolona, betametasona, etc.) y progestógenos, tales como la noretindrona, etinodiol, noretindrona, levonorgestrel; agentes tiroideos (por ejemplo, liotironina o levotiroxina) o agentes anti-tiroideos (por ejemplo, metimazol); fármacos antihiperprolactinémicos (por ejemplo, cabergolina); supresores hormonales (por ejemplo, danazol o goserelina), oxitócicos (por ejemplo, metilergonovina u oxitocina) y también se pueden usar prostaglandinas, tales como mioprostol, alprostadil o dinoprostona.

Otros compuestos activos útiles incluyen fármacos inmunomoduladores (por ejemplo, antihistamínicos, estabilizantes de mastocitos, tales como lodoxamida y/o cromolina, esteroides (por ejemplo, triamcinolona, beclometazona, cortisona, dexametasona, prednisolona, metilprednisolona, beclometazona, o clobetasol), antagonistas de la histamina H<sub>2</sub> (por ejemplo, famotidina, cimetidina, ranitidina), inmunosupresores (por ejemplo, azatioprina, ciclosporina), etc. También se usan grupos con actividad antiinflamatoria, tales como sulindac, etodolac, ketoprofeno y ketorolac. Otros fármacos de uso en conjunto con la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia.

En algunos casos, los componentes del extracto pueden actuar como quimiotaxantes. Las células madre mesenquimales y los fibrocitos circulan en el torrente sanguíneo y en caso de herida en la piel penetran en el área de la herida en la que se pueden diferenciar a células de la piel tales como fibroblastos, queratinocitos, pericitos,

células adiposas y endoteliales. Los quimiotoxantes en el extracto pueden actuar como ligandos para el CCR7 implicado en células inmunitarias de atracción y células dendríticas y pueden incluir SLC/6CKine/Exodus2/TCA4 y CKbeta-11/MIP-3beta/ELC

#### K. Aplicación tópica

- 5 Se contempla que las composiciones para aplicación tópica descritas anteriormente encuentren uso tanto para fines cosméticos como terapéuticos. Los usos terapéuticos se describen con más detalle en la Sección J. En algunos casos, se contempla que las composiciones descritas anteriormente se apliquen directamente a la piel u otras superficies epiteliales o epidérmicas del cuerpo. Las composiciones se pueden aplicar una, dos, tres o más veces cada día si fuera apropiado para la indicación. Por lo general, la cantidad aplicada no es importante, pero por lo
- 10 general se puede aplicar una composición que comprende de aproximadamente 0,001 µg a 10 gramos del extracto (o componentes del mismo) a una superficie dada del cuerpo. Como se ha descrito anteriormente, la composición puede comprender otros componentes tales como adyuvantes, vehículos, otros principios activos, etc.

En algunos casos, la divulgación se refiere a composiciones que incluyen conservantes y antioxidantes (incluyendo vitaminas) para impedir el deterioro del producto, preferentemente edetato trisódico y tetrasódico (EDTA) y tocoferol (vitamina E). En otros casos, la composición contiene agentes antimicrobianos para combatir bacterias, preferentemente butil, propilo, etil y metilparabenos, DMDM hidantoína, metilisotiazolinona fenoxietanol (también componente aromático de éter de rosa), quaternium-15. En otros casos, la composición contiene agentes espesantes y ceras usados en productos de barra tales como barras de labios y colorete es, preferentemente ceras de candelilla, carnaúba, y microcristalinas y espesantes de carbómero y polietileno. En otros casos, la composición

20 contiene disolventes para diluir preferentemente butilenglicol y propilenglicol, ciclometicona (silicona volátil), etanol (alcohol) y glicerina. En otras realizaciones, la composición contiene agentes emulgentes para separar y refinar preferentemente monoestearato de glicerilo (también agente perléscente), lauramida DEA (también reforzador de espuma) y polisorbatos. En algunos casos, las composiciones contienen aditivos de color -- colores orgánicos sintéticos obtenidos a partir de fuentes de carbón y petróleo preferentemente Rojo D & C N.º 7 Laca de calcio (y otros colorantes que no se disuelven en agua), óxidos de hierro, mica (iridiscente) y aminofenoles. En otros casos,

25 las composiciones contienen ajustadores del pH para estabilizar o ajustar ácidos y bases, preferentemente hidróxido de amonio -- en exfoliación de piel y ondulación y alisamiento de del cabello, ajustadores del pH ácido cítrico, y trietanolamina -- ajustador del pH usado principalmente en jabón transparente. En otros casos, las composiciones contienen agentes preferentemente absorbente de silicato de aluminio y magnesio, agente antiaglomerante, sílice (dióxido de silicio) -- absorbente, antiaglomerante, abrasivo, laurilsulfato sódico - detergente, ácido esteárico - limpiador, emulgente, talco (silicatos de magnesio en polvo) - absorbente, antiaglomerante y estearato de cinc -- usado en polvo para mejorar la textura, lubricante.

La composición incluye los componentes mencionados y combinaciones de los mismos en una cantidad total de aproximadamente 0,5 a 50 gramos por litro, preferentemente de aproximadamente 3 a 10 gramos por litro, aunque

35 se pueden permitir concentraciones más altas o más bajas. Dichas composiciones están en forma de una emulsión, crema, bálsamo o similares, mezclándose los materiales activos con agua, alquilenglicoles, diversos aceites naturales y sintéticos, vaselina, conservantes, agentes colorantes, perfumes e ingredientes similares convencionales en las técnicas de cosmética.

La composición se puede aplicar a la cara, párpados u otras partes del cuerpo en una cantidad que varía con el individuo. Se ha encontrado que de aproximadamente 0,1 a 1, de forma ventajosa de aproximadamente 0,02 a 0,75 y preferentemente de aproximadamente 0,3 a 0,5 gramos por cm<sup>2</sup> es útil, pero se puede usar una cantidad superior o inferior. La aplicación se puede realizar una vez a la semana o más a menudo, incluso varias veces al día.

De acuerdo con las composiciones y el procedimiento de la presente divulgación, los extractos de huevo de la presente invención se pueden administrar en forma de una composición farmacéutica que comprende

45 adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un experto en la materia observará que los procedimientos adecuados para administrar las composiciones de extracto a un animal, tal como un mamífero, están disponibles y, aunque se puede usar más de un procedimiento para administrar una composición en particular, un procedimiento y dosificación en particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más efectiva que otras. Los expertos en la materia también conocen bien los vehículos farmacéuticamente aceptables. La elección del

50 vehículo se determinará, en parte, tanto por la composición en particular como por el procedimiento en particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación.

En algunos casos preferentes, las formulaciones de la presente divulgación están diseñadas para administración tópica. Los ungüentos, cremas y geles son habituales en tales formulaciones.

55 Las pomadas se preparan por lo general usando cualquiera de (1) una base oleaginosa, es decir, una que consiste en aceites o hidrocarburos no volátiles, tales como vaselina blanca o aceite mineral, o (2) una base absorbente, es decir, una que consiste en una sustancia o sustancias anhidras que pueden absorber agua, por ejemplo, lanolina anhidra. De forma habitual, después de la formación de la base, ya sea oleaginosa o absorbente, el principio activo (por ejemplo, extracto de huevo de salmón o extracto de células madre) se añade en una cantidad que proporciona

la concentración deseada.

Las cremas son emulsiones de aceite/agua. Éstas consisten en una fase oleosa (fase interna), que por lo general comprende aceites no volátiles, hidrocarburos y similares, tales como ceras, vaselina, aceite mineral y similares, y una fase acuosa (fase continua), que comprende agua y cualquier sustancia soluble en agua, tales como sales añadidas. Las dos fases se estabilizan mediante el uso de un agente emulgente, por ejemplo, un agente tensioactivo, tal como laurilsulfato sódico; coloides hidrófilos, tales como arcillas coloidales de goma arábiga, veegum y similares. Después de la formación de la emulsión, el principio activo (por ejemplo, extracto de huevo de salmón o extracto de células madre) se añade de forma habitual en una cantidad para conseguir la concentración deseada.

Los geles comprenden una base seleccionada entre una base oleaginosa, agua o una base de suspensión-emulsión. A la base se le añade un agente gelificante que forma una matriz en la base, aumentando su viscosidad. Los ejemplos de agentes gelificantes son hidroxipropil celulosa, polímeros de ácido acrílico y similares. De forma habitual, el principio activo (IGF-II) se añade a la formulación a la concentración deseada en un punto anterior a la adición del agente gelificante.

La cantidad de extracto incorporada en la formulación de la presente divulgación no es crítica; la concentración solamente debería estar en un intervalo suficiente como para permitir la aplicación rápida de la formulación a la zona de la herida en una cantidad que proporcione la cantidad deseada de extracto.

La cantidad habitual de formulación a aplicar dependerá de la concentración del principio activo en la formulación. En algunos casos, se determina la cantidad de proteína en el extracto. A continuación, una cantidad específica del extracto se incluye en el vehículo farmacéuticamente aceptable basándose en la cantidad de proteína. Por lo general, la formulación se aplicará a la herida en una cantidad que proporcione de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 µg de proteína por cm<sup>2</sup> de piel. Preferentemente, la cantidad aplicada de proteína estará en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 300 µg/cm<sup>2</sup>, más preferentemente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 µg/cm<sup>2</sup>. En otras realizaciones, se añade un volumen específico de extracto al vehículo farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, en algunos casos, las composiciones de la presente divulgación comprenden, en una base volumen/volumen (volumen de extracto y volumen de vehículo farmacéuticamente aceptable), por ejemplo, de aproximadamente un 0,001 a un 50 % de extracto, de aproximadamente un 0,01 a un 50 % de extracto, de aproximadamente un 0,1 a un 50 % de extracto, de aproximadamente un 0,001 a un 10 % de extracto, de aproximadamente un 0,01 a un 10 % de extracto, de aproximadamente un 0,1 a un 10 % de extracto, de aproximadamente un 0,001 a un 5 % de extracto, de aproximadamente un 0,01 a un 5 % de extracto, de aproximadamente un 0,1 a un 5 % de extracto, de aproximadamente un 0,001 a un 4 % de extracto, de aproximadamente un 0,01 a un 4 % de extracto, de aproximadamente un 0,1 a un 4 % de extracto, de aproximadamente un 0,001 a un 2 % de extracto, de aproximadamente un 0,01 a un 2 % de extracto, de aproximadamente un 0,1 a un 2 % de extracto, de aproximadamente un 0,001 a un 1 % de extracto, de aproximadamente un 0,01 a un 1 % de extracto.

Si fuera necesario se puede formular con aditivos usados comúnmente en las ciencias farmacéuticas, tales como tensioactivos, aceites y grasas, alcoholes polihídricos, alcoholes inferiores, agentes espesantes, absorbentes de UV, agentes dispersantes de luz, conservantes, antioxidantes, antibióticos, agentes quelantes, reguladores de pH, agentes aromatizantes, pigmentos y agua.

Los ejemplos de tensioactivos incluyen polioxietileno (denominados en lo sucesivo en el presente documento éteres de alquilo ramificado-POE tales como POE-alcohol octildodecílico y POE 2-alcohol deciltetradecílico, alquil éteres-POE, tales como éter de POE-alcohol oleílico y éter de POE-alcohol cetílico, ésteres de sorbitán tales como monooleato de sorbitán, monoisoestearato de sorbitán y monolaurato de sorbitán, ésteres de POE-sorbitán, tales como POE-monooleato de sorbitán, POE-monoisoestearato de sorbitán y POE-monolaurato de sorbitán, ésteres de ácidos grasos de glicerol tales como monooleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo y monomiristato de glicerilo, ésteres de POE-ácido graso de glicerol tales como POE-monooleato de glicerilo, POE-monoestearato de glicerilo y POE-monomiristato de glicerilo, éster de POE-dihidrocolesterol, POE-aceite de ricino endurecido, ésteres de POE-ácido graso de aceite de ricino endurecido tales como, éteres de POE-alquilarilo tales como éter de POE-octilfenol, ésteres de glicerol tales como monoisoestearato de glicerol y monomiristato de glicerol, éteres de POE-glicerol tales como POE-monoisoestearato de glicerol y POE-monomiristato de glicerol, ésteres de ácidos grasos de poliglicerol tales como monoestearato de diglicerilo, decaestearato de decaglicerilo, decaisoestearato de decaglicerilo y diisoestearato de diglicerilo y otros tensioactivos no iónicos; sales de potasio, sales de sodio, sales de dietanolamina, sales de trietanolamina, sales de aminoácidos y otras sales de ácidos grasos superiores tales como ácido mirístico, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido behénico, ácido isoesteárico y ácido oleico, las sales alcalinas superiores de ácidos éter carboxílicos, sales de N-acilaminoácidos, N- acilsaltonatos, alquilsulfonatos superiores y otros tensioactivos aniónicos; sales de alquilamina, poliamina, ácidos grasos de aminoalcohol, resina de silicona orgánica, sales de amonio cuaternario y alquilo y otros tensioactivos catiónicos; y lecitina, derivados de betaína y otros tensioactivos anfóteros.

Los ejemplos de aceites y grasas incluyen aceites y grasas vegetales tales como aceite de ricino, aceite de oliva, aceite de cacao, aceite de camelia, aceite de coco, cera de madera, aceite de yoyoba, aceite de semilla de uva y

5 aceite de aguacate; aceites y grasas animales tales como aceite de visón y aceite de yema de huevo; ceras tales como cera de abejas, cera de ballena, lanolina, cera de carnaúba y cera de candelilla; hidrocarburos tales como parafina líquida, escualeno, cera microcristalina, cera de ceresina, cera de parafina y vaselina; ácidos grasos naturales o sintéticos tales como ácido láurico, ácido mirístico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido isoesteárico y ácido behénico; alcoholes naturales o superiores tales como cetanol, alcohol estearílico, hexildecanol, octildecanol y alcohol laurílico; y ésteres tales como miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, miristato de octildodecilo, oleato de octildodecilo y oleato de colesterol.

10 Los ejemplos de alcoholes polihídricos incluyen etilenglicol, polietilenglicol, propilenglicol, 1,3-butirenglicol, 1,4-butirenglicol, dipropilenglicol, glicerol, diglicerol, triglicerol, tetraglicerol y otros poligliceroles, glucosa, maltosa, maltitosa, sacarosa, fructosa, xilitosa, sorbitol, maltotriosa, treitol y eritritol.

15 Los ejemplos de agentes espesantes incluyen sustancias de alto peso molecular de origen natural tales como alginato sódico, goma de xantano, silicato de aluminio, extracto de semilla de membrillo, goma de tragacanto, almidón, colágeno e hialuronato sódico; sustancias de alto peso molecular semisintéticas tales como metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, almidón soluble y celulosa cationizada; y sustancias sintéticas de alto peso molecular tales como polímero de carboxivinilo y alcohol polivinílico.

20 Los ejemplos de absorbentes de UV incluyen ácido p-aminobenzoico, p-metoxicinamato de 2-etoxietilo, p-metoxicinamato de isopropilo, butilmetoxibenzoilmetano, gliceril-mono-2-etilhexanoil-di-p-metoxibenzofenona, trioleato de digaloiolo, 2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona, 4-bishidroxipropilaminobenzoato de etilo, 2-ciano-3,3'-difenilacrilato de 2-etilhexilo, p-metoxicinamato de etilhexilo, salicilato de 2-etilhexilo, p-aminobenzoato de glicerilo, salicilato de homometilo, o-aminobenzoato de metilo, 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, p-dimetilaminobenzoato de amilo, ácido 2-fenilbenzoimidazol-5-sulfónico y ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfónico.

Los ejemplos de conservantes incluyen benzoatos, salicilatos, sorbatos, deshidroacetatos, p-oxibenzoatos, 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil éter, 3,4,4'-triclorocarbanilida, cloruro de benzalconio, hinoquitilol, resorcinol y etanol.

25 Los ejemplos de antioxidantes incluyen tocoferol, ácido ascórbico, butilhidroxianisol, dibutilhidroxitolueno, ácido nordihidroguayarático y galato de propilo.

Los ejemplos de agentes quelantes incluyen edetato sódico y citrato sódico.

Los ejemplos de antibióticos incluyen penicilina, neomicina, cefalotina, permanganato potásico, sulfuro de selenio, eritromicina, bacitracina, tetraciclina, cloranfenicol, vancomicina, nitrofurantoina, acrisorcina, clorodontoina y flucitosina.

30 Algunos de estos aditivos funcionan para aumentar la eficacia de la composición aumentando la estabilidad o la capacidad de absorción percutánea de los componentes esenciales de la presente divulgación.

Además, cualquier forma de dosificación es aceptable, ya sea en solución, emulsión, dispersión en polvo u otros. La aplicabilidad es amplia, incluyendo formas de dosificación fundamentales tales como lociones, emulsiones, cremas y geles.

35 Además de los mencionados anteriormente, los vehículos, excipientes y adyuvantes adecuados incluyen agua, vaselina, petrolato, aceite mineral, aceite vegetal, aceite animal, ceras orgánicas e inorgánicas, polímeros tales como xantanos, gelatina, celulosa, colágeno, almidón, caolín, carragenano, goma arábiga, polímeros sintéticos, alcoholes, polioles y similares. El vehículo también puede incluir un vehículo de liberación sostenida, tales como liposomas, microesponjas, microesferas o microcápsulas, pomadas de base acuosa, emulsiones de agua en aceite o aceite en agua, geles o similares.

40 La dosis administrada a un animal, en particular a un ser humano, en el contexto de la presente invención debería ser suficiente para efectuar una respuesta terapéutica durante un periodo de tiempo razonable. La dosis se determinará por la resistencia de las composiciones usadas en particular y el estado de la persona. La concentración de la dosis y la frecuencia de aplicación también se determinarán por la existencia, naturaleza y alcance de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar la administración de una composición en particular.

#### L. Usos terapéuticos

50 En algunos casos, las composiciones del extracto son útiles para hidratación (es decir, para tratar la deshidratación intravascular y el edema en las heridas), impermeabilización (es decir, compensar la hipovolemia en las heridas), protección frente a la infección (es decir, protección de heridas frente a infecciones), protección frente a la oxidación (es decir, impedir la producción de radicales libres de oxígeno durante las reacciones inflamatorias del tejido isquémico), cicatrización de heridas (es decir, aumento del metabolismo para ayudar en condiciones hipóxicas, especialmente de piel quemada o células en el metabolismo anaeróbico). En algunos casos preferentes, las composiciones son inodoras (es decir, se caracterizan por una ausencia de compuestos volátiles que contienen carbono o nitrógeno).

En algunos casos, la divulgación se refiere a procedimientos para usar una pluralidad de composiciones. En los casos preferentes, se usa una primera crema para ablandar y/o disolver las costras mediante agentes o ácidos que disuelven el colágeno. Una segunda crema con extractos o componentes de las mismas, así como otras sustancias curativas de heridas como se describe en el presente documento. En otro caso preferente, se usa un láser, un peeling químico, maquinilla de afeitar, ácido, congelación, agente exfoliante y/o abrasivo para eliminar cicatrices o arrugas, seguido por la aplicación de una crema con extractos o componentes de las mismas, así como otras sustancias curativas de heridas como se describe en el presente documento.

En algunos casos, la divulgación se refiere a una primera composición, preferentemente una crema que ralentiza la cicatrización de heridas, reduce la inflamación y/o reduce la formación de costras. Esta composición se aplica durante varios días. En los casos preferentes, la composición comprende una combinación de uno o más de agentes antiinflamatorios, antihistamínicos, un componente o componentes de extracto capaces de amortiguar la migración y/o proliferación de neutrófilos, un componente o componentes de extracto que estimulan macrófagos, fosfolipasas, ácido araquidónico. En otros casos, hay un contenido de agua, lípidos, proteínas que proporciona propiedades de vérnix en la composición. En otros casos, los componentes de la composición reducen la actividad de citoquinas de fibrógeno. Preferentemente, la primera composición se aplica de aproximadamente 1 a 3 días.

En otro caso, la divulgación se refiere a una segunda composición, preferentemente una crema que cura las heridas por estimulación de las células necesarias. Preferentemente, esta composición se aplica a un sujeto después de aplicar la primera composición. Preferentemente, la segunda composición se aplica de aproximadamente 3 a 14 días. Esta segunda composición contiene componentes de células y extractos celulares que regulan las colagenasas, activan las plasminogenasas para la disolución del coágulo, estimulan la epitelialización (migración, proliferación, desdiferenciación, rediferenciación), activan la fibronectina y factores de crecimiento de fibroblastos, estimulan la angiogénesis, reducen la actividad de citoquinas fibrogénicas y regulan genes tales como TP53.

En otro caso, la divulgación se refiere a una tercera composición, preferentemente una crema. Preferentemente, esta composición se aplica a un sujeto después de la aplicación de la segunda composición. Esta tercera composición funciona para controlar el remodelado del colágeno por síntesis de colágeno y destrucción preferentemente por colagenasas y metaloproteínas y preferentemente el colágeno I y para inactivar fibronectina, ácido hialurónico y glicosaminoglicanos, e hinchamiento deshidratado. La tercera composición se aplica preferentemente de aproximadamente una a seis semanas, después de la aplicación de la primera y segunda composiciones. En algunos casos, se proporciona una matriz, tal como una matriz de quitosano, matriz de polímero biodegradable, matriz de colágeno o tira líquida.

En algunos casos, la composición del extracto se dispersa en un líquido biocompatible que se aplica a una estructura de soporte fisiológicamente aceptable en un estado líquido para formar una película. En el presente documento, una película se define como una superficie y/o cubierta interfacial, en un estado líquido o sólido, con propiedades dependientes de la temperatura. Las técnicas de formación de película incluyen, pero no se limitan a, pulverización, extrusión, soplado, vertido, evaporación, revestimiento y pintura. La dispersión se presenta como gotitas que se unen para formar una película al encontrarse con el soporte.

En un caso alternativo, una película formada previamente se aplica a un soporte. La estructura de soporte fisiológicamente aceptable es una que puede soportar la esterilización, preferentemente mediante técnicas de esterilización convencionales conocidas por un experto en la materia tales como exposición a radiación gamma, uso de autoclave, etc. La estructura de soporte no está limitada a una composición o configuración en particular y, dependiendo de su uso, puede estar o no esterilizada y puede adoptar diversas formas.

En otro caso, la película se usa para mejorar la maduración de las células cutáneas y se puede aplicar a estructuras tales como filtros, membranas, perlas, partículas, etc. De manera similar, la estructura de soporte no está limitada a un estado de materia en particular y puede ser un sólido, un semisólido, un gel, etc.. En un caso, el soporte consiste en un material de superficie interposicional de monofilamento de nailon, tal como almohadillas de Interfaces (Winfield Laboratories, Inc., Dallas Tex.), Biobrane II™. (Sterling Drug Inc., Nueva York, N.Y.) o filtros de nailon circulares de porosidad adecuada (Micron Separations Inc., Westboro, Mass.). Sin embargo, también se podrían usar otros materiales de soporte.

En otro caso, la película se usa para tratar o impedir lesiones debido a la exposición a sustancias o traumatismos, y se puede aplicar a diversos materiales para su colocación en contacto directo o contacto indirecto con un sitio de piel expuesto. El sitio de la piel puede estar intacto (por ejemplo, piel normal) o puede estar comprometido, definido como piel dañada o que carece al menos de parte del estrato córneo (por ejemplo, piel dañada por la exposición al agente en cuestión, otro agente, la presencia de un estado patológico tal como una erupción cutánea o dermatitis por contacto, un traumatismo físico tal como un corte, herida o abrasión, una piel subdesarrollada tal como ocurre en un recién nacido prematuro, afecciones en las que se expone toda o parte de la epidermis, afecciones en las que se ha eliminado parte de la dermis, tales como las heridas de grosor parcial que se encuentran en los procedimientos de rejuvenecimiento, tales como exfoliaciones químicas, dermoabrasiones y rejuvenecimiento con láser, etc.).

La estructura de soporte puede ser permeable a agentes físicos y/o químicos y puede adoptar diversas formas, dependiendo de su finalidad y de la extensión del área que requiera apósito o tratamiento. La película se puede

5 aplicar a diversos materiales sintéticos tales como películas termoplásticas, películas sopladas y películas transpirables, y diversas composiciones de tejidos naturales y sintéticos tales como telas tejidas, no tejidas, hiladas y cosidas. La divulgación se puede usar en una diversidad de productos, ejemplos de los cuales incluyen apósitos y revestimientos para heridas tales como vendas, cintas, gasa, productos adhesivos aplicados a corto o a largo plazo a la piel, productos de cuidado de ostomía, almohadillas hospitalarias tales como almohadillas de incontinencia, almohadillas absorbentes y almohadillas de examen, pañales desechables y de tela, y productos de higiene femenina tales como dispositivos intralabiales.

10 En algunos casos, la divulgación se refiere a la regeneración de la función de la piel con un aspecto cosmético deseado y a impedir el daño cutáneo. En otros casos, la formación temprana de cicatrices se evita mediante la aplicación de una composición para impedir cicatrices cuando se forma la herida. En otros casos, la estimulación del rejuvenecimiento y la regeneración de la piel estresada y envejecida impiden la formación de arrugas. En otros casos, el producto se aplica de forma intermitente para retrasar el proceso de daño continuo que se produce a medida que la piel envejece.

15 La piel tiene dos capas principales, la epidermis y la dermis. Por debajo hay una capa de grasa subcutánea ('debajo de la piel'). La superficie exterior de la piel es la epidermis, que en sí misma contiene varias capas, la capa de células basales, la capa espinosa, la capa de células granulares y el estrato córneo. La capa más profunda de la epidermis es la capa de células basales. Aquí, las células se dividen continuamente para producir nuevas células de piel engrosadas. Estas células se mueven hacia la superficie de la piel, empujadas hacia arriba por las células que se dividen debajo de ellas. Los vasos sanguíneos en la dermis, que está por debajo de la capa de células basales, suministran nutrientes para apoyar este crecimiento activo de nuevas células de la piel. A medida que las células basales se mueven hacia arriba y se alejan de su suministro de sangre, su contenido celular y su forma cambian. Las células por encima de la capa de células basales llegan a presentar una forma más irregular y forman la capa espinosa. Por encima de esta, las células se mueven en la capa granular. Al estar alejadas del suministro de sangre en la dermis, las células comienzan a morir y acumular una sustancia llamada queratina.

25 El estrato córneo ('capa córnea') es la capa superior de la epidermis - es la capa de la piel que vemos desde el exterior. Las células tienen una forma planas y similar a escamas ('escamosas'). Estas células están muertas, contienen una gran cantidad de queratina y se colocan en capas superpuestas que imparten un carácter resistente e impermeable a la superficie de la piel. Las células muertas de la piel se desprenden continuamente de la superficie de la piel. Esto se equilibra con las células que se dividen en la capa de células basales, produciendo de ese modo un estado de renovación constante. También en la capa de células basales se encuentran las células que producen melanina. La melanina es un pigmento que se absorbe en las células de la piel que se dividen para ayudar a protegerlas contra los daños causados por la luz solar (luz ultravioleta). La cantidad de melanina en la piel está determinada por la constitución genética y la exposición a la luz solar. Cuanto más pigmento de melanina esté presente, más oscuro es el color de tu piel.

35 Por debajo de la epidermis se encuentra la capa denominada dermis. La capa superior de la dermis, la que se encuentra directamente por debajo de la epidermis, tiene muchas crestas llamadas papilas. En las yemas de los dedos, la superficie de la piel sigue este patrón de crestas para crear nuestras huellas dactilares individuales. La dermis contiene una cantidad variable de grasa, y también colágeno y fibras de elastina que proporcionan fuerza y flexibilidad a la piel. En una persona de edad avanzada, el fragmento de fibras de elastina y gran parte de la cualidad elástica de la piel se pierde. Esto, junto con la pérdida de grasa subcutánea, da como resultado las arrugas. Los vasos sanguíneos suministran nutrientes a las células que se dividen en la capa basal y eliminan cualquier producto de desecho. También ayudan a mantener la temperatura corporal dilatando y transportando más sangre cuando el cuerpo necesita perder calor de su superficie; se estrechan y transportan menos sangre cuando el cuerpo necesita para limitar la cantidad de calor perdido en su superficie. La piel también contiene una serie de nervios y glándulas.

45 La calidad y el aspecto general de la piel se pueden ver afectados por una diversidad de trastornos, incluyendo envejecimiento, fotoenvejecimiento, acné, poros dilatados y cicatrices. El proceso intrínseco de envejecimiento cronológico resulta del adelgazamiento de la epidermis y la dermis y la pérdida de elasticidad. Este proceso afecta a todas las capas de la cara, incluyendo el tejido subcutáneo, el sistema músculo-fascial, el sistema musculoesquelético superficial y el esqueleto facial. El resultado es resorción ósea, atrofia de grasa subcutánea, 50 atenuación del sistema músculo-fibroso y alteraciones de la superficie cutánea. La unión dérmico-epidérmica se aplana, lo que da como resultado la pérdida de crestas de Rete y un aspecto más delgado a la epidermis. La dermis también se vuelve delgada, con una disminución de las fibras elásticas, producción de colágeno, vascularidad y la sustancia fundamental. Las alteraciones bioquímicas en colágeno y elastina dan como resultado una dermis más laxa pero menos elástica y resistente. De forma colectiva, estos cambios dan lugar a arrugas finas de la piel y 55 flacidez de los tejidos que cubren el esqueleto facial.

En algunos casos, la divulgación se refiere a una composición que comprende extractos que pueden estimular las células cutáneas para que se regeneren de forma espontánea. En casos adicionales, las células con telómeros alargados hechos *in situ* a partir de las propias células del sujeto se vuelven a introducir en el sujeto.

60 Muchas modalidades pueden reaparecer en la piel para mejorar la calidad de la piel, reducir las manchas de la edad, suavizar las líneas finas y tratar el acné u otras cicatrices. Las modalidades incluyen dermoabrasión tradicional,

peeling químico, rejuvenecimiento con láser y microdermabrasión. Las técnicas intentan eliminar las capas externas de la piel con la idea de que la estimulación de un nuevo crecimiento mejorará la apariencia. Por lo general, la evaluación inicial de la condición de la piel se realiza usando la escala de Fitzpatrick de tipos de piel reactivas al sol, que indica las reacciones de los pacientes a la radiación ultravioleta y un grado de pigmentación existente. Los pacientes de tipo I siempre se queman y nunca se broncean. Los pacientes de tipo II sebáceas solamente con dificultades y por lo general se queman. Los pacientes de tipo III se broncean pero en ocasiones se queman. Los pacientes de tipo IV raramente se queman y se broncean con facilidad. Los pacientes de tipo V se broncean muy fácilmente y muy raramente se queman. Los pacientes de tipo VI se broncean muy fácilmente y nunca se queman.

El peeling químico es la eliminación química de capas de piel para mejorar defectos dermatológicos. El mecanismo de acción de los agentes de peeling es relativamente sencillo. Los agentes más fuertes tales como fenol (con diversos aditivos como el aceite de croton y glicerina) y el ácido tricloroacético (TCA) producen una necrosis química de la piel a profundidades variables, dependiendo de una serie de variables controladas e incontroladas. Los agentes más débiles cambian el pH lo suficiente como para causar un choque superficial a las células y, dependiendo de muchas variables, la lesión celular o la muerte. Cuando se usa con una crema hidratante, el ácido actúa simplemente para causar inflamación y engrosamiento celular e intercelular, dando lugar a un aumento transitorio en el tamaño de la célula y la matriz y disminución de las líneas finas y rípidos. Los tratamientos secuenciales conducen a exfoliación y a una tez más lisa. La irritación continua puede conducir a muchos de los mismos efectos del tratamiento con tretinoína o retinoides (es decir, aumento del espesor de la dermis, aumento del flujo sanguíneo a la piel). El exfoliante de fenol "La fórmula de Baker" es 3 cm<sup>3</sup> de fenol de USP al 88 % 49 %; 2 cm<sup>3</sup> de agua destilada al 44 %; 3 gotas de aceite de croton al 2,1 %; y 8 gotas de Septisol al 4,5 %.

La técnica de microdermabrasión abrasiona la piel con un flujo de cristales a alta presión. La microdermabrasión es más eficaz con las condiciones superficiales de la piel porque produce una profundidad de lesión superficial. Las afecciones cutáneas superficiales incluyen fotoenvejecimiento temprano, líneas finas y cicatrización superficial. La microdermabrasión se consigue colocando la piel bajo tensión para conseguir un vacío eficaz. Por lo general, el estiramiento de la zona de tratamiento con la mano no dominante y usando la mano dominante para guiar la pieza de mano es el procedimiento usado para conseguir este efecto. Cuando se trata el cuello, el cuello se coloca en extensión para ayudar en la tensión de la piel. La pieza de mano se mueve sobre la zona de tratamiento en un sola y suave trazo, que se puede repetir a continuación. La presión de la corriente de cristal se controla con un pedal. Una piel más gruesa, como la de la frente, el mentón y la nariz, se puede tratar de forma más agresiva (es decir, ajustando la velocidad del movimiento de la pieza de mano o el número de pasadas). Disminuir la presión al tratar la piel más delgada de los párpados inferiores y mejilla superior. Orientar de forma vertical todos los trazos cuando se trata el cuello.

La reparación de la piel con láser (LSR) se puede realizar como un procedimiento aislado o como un complemento a procedimientos tales como blefaroplastia transconjuntival (TCB), estiramiento facial y levantamiento endoscópico de las cejas. El láser permite un control preciso de la profundidad de ablación, y permite al cirujano variar estas profundidades según sea necesario. Además de una precisión de este tipo precisión, la LSR provoca un calentamiento favorable de la dermis, que tensa las fibras de colágeno y estimula la secreción del neocolágeno por los fibroblastos. Son preferentes dos longitudes de onda láser para la reparación de la piel facial: dióxido de carbono pulsado y erbio:ytrio-aluminio-granate (Er:YAG). Cada pulso de Er:YAG elimina solamente 25-30 micrómetros de tejido en comparación con el dióxido de carbono pulsado, que elimina 50-100 micrómetros. El Er:YAG produce menos energía dérmica colateral porque la conducción térmica es de aproximadamente 5 micrómetros; el dióxido de carbono pulsado es de 30-50 micrómetros. La salida de láser de Er:YAG es absorbida directamente por las proteínas colágeno y dérmicas, mientras que el láser de dióxido de carbono vaporiza el agua extracelular en la dermis. Cada pasada de Er:YAG genera la misma cantidad de ablación, mientras que el dióxido de carbono pulsado genera una profundidad de vaporización disminuida con cada pasada.

La composición de la presente divulgación también encuentra uso en la cicatrización de heridas. Una herida es una rotura en la piel (la capa externa de la piel se llama epidermis). Por lo general, las heridas están causadas por cortes o raspaduras. La cicatrización es una respuesta a la lesión que pone en movimiento una secuencia de sucesos. Con la excepción del hueso, todos los tejidos se curan con cierta cicatrización. El objeto de un cuidado adecuado es minimizar la posibilidad de infección y cicatrización.

Las úlceras por presión son heridas crónicas causadas por una presión no aliviada que da como resultado daño tisular. Las úlceras se clasifican de I a IV, de acuerdo con el nivel de daño tisular observado. Las úlceras por presión son más comunes en pacientes hospitalizados, pacientes en residencias de mayores y los pacientes con lesiones de la médula espinal. El patrón de atención para las úlceras por presión incluye cambios de apósito, alivio de la presión, recolocación, fortalecimiento físico, soporte nutricional y gestión de infecciones. Si la herida se vuelve grave, las intervenciones quirúrgicas incluyen desbridamiento de la herida y reconstrucción de colgajo cutáneo, colgajo muscular o colgajo libre.

La presente divulgación también encuentra uso para el tratamiento de diversos trastornos de la piel. La piel desigual, la decoloración y los crecimientos pueden estar causados por una diversidad de factores que incluyen genética, exposición al sol y/o uso de medicamentos. La formación de callos (Clavos) es un engrosamiento de la piel debido a la presión intermitente y las fuerzas de fricción. La forma de las manos y los pies son importantes en la formación de

clavos. De forma específica, las prominencias óseas de las articulaciones metacarpofalángicas y metatarsofalángicas a menudo están conformadas de un modo tal que inducen la fricción superficial de la piel. A medida que se produce la formación de clavos, es probable que la fricción contra el calzado perpetúe la hiperqueratosis. La deformidad de los dedos de los pies, incluyendo contracturas y dedos en garra, martillo y forma de mazo, puede contribuir a la patogénesis. Los juanetes de sastre, es decir, las callosidades sobre la cabeza del quinto metatarsiano lateral, pueden estar asociados a síntomas neuríticos debido a la compresión de los nervios digitales laterales subyacentes. Además, el dedo del pie de Morton, en el que el segundo dedo del pie es más largo que el primer dedo del pie, se produce en un 25 % de la población; éste puede ser uno de los factores patogénicos más importantes en un callo de la cabeza del segundo metatarsiano común, es decir, una queratosis plantar intratable.

Los lunares (nevus) son nidos de melanocitos que están en contacto entre sí. Normalmente comienzan la formación durante la primera infancia. Se ha sugerido que se forman como respuesta a la exposición al sol. Sin embargo, un factor genético está claramente involucrado en los nevus. Algunos parentescos expresan una afección autosómica dominante en la que los miembros tienen un gran número de nevus grandes, a veces más de 150 nevus dispersos sobre el integumento. Se ha observado que los nevus se desarrollan rápidamente después de episodios de formación de ampollas, tales como quemaduras térmicas o quemaduras solares de segundo grado; necrólisis epidérmica toxica; y en personas con enfermedades ampollosas genéticas, tales como epidermolisis bullosa. Se ha sugerido que los factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento de fibroblastos básico, se liberan por la proliferación de queratinocitos y para estimular la proliferación de melanocitos. Los nevus melanocíticos son neoplasias benignas o hamartomas formados principalmente por melanocitos, las células productoras de pigmento que colonizan la epidermis. Los melanocitos se obtienen a partir de la cresta neural y migran durante el desarrollo embriológico a sitios ectodérmicos seleccionados (principalmente la piel y el SNC), pero también a los ojos y las orejas. Se han identificado melanocitos ectópicos en la autopsia en los tractos gastrointestinal y genitourinario. Se cree que los nevus melanocíticos congénitos representan una anomalía en la embriogénesis y, como tal, se podrían considerar una malformación o un hamartoma. Por el contrario, se considera que la mayoría de los nevus melanocíticos adquiridos son proliferaciones neoplásicas benignas.

Los lunares/nevus displásicos atípicos son lesiones melanocíticas adquiridas de la piel cuyas definiciones clínicas e histológicas todavía están evolucionando. Los lunares atípicos se diferencian de los nevus melanocíticos adquiridos comunes en varios aspectos, que incluyen el diámetro y la falta de uniformidad del pigmento.

Las marcas de nacimiento (hemangiomas capilares) son uno de los tumores orbitales benignos más comunes de la infancia. Son neoplasias benignas de células endoteliales que por lo general están ausentes en el momento del nacimiento y de forma característica tienen un rápido crecimiento en la infancia con una involución espontánea más tarde en la vida. Esto contrasta con otro grupo conocido de anomalías vasculares infantiles, las malformaciones vasculares. Las malformaciones vasculares, tales como linfangiomas y malformaciones arteriovenosas, están presentes al nacer y se caracterizan por un crecimiento muy lento con persistencia en la vida adulta.

En las estrías por distensión (marcas de estiramiento) afectan a la piel sometida a estiramientos continuos y progresivos; el aumento de la tensión se coloca en el tejido conectivo debido al aumento del tamaño de las diversas partes del cuerpo. Se produce en el abdomen y los senos de las mujeres embarazadas, en los hombros de los culturistas, en los adolescentes que experimentan su brote de crecimiento, y en los individuos que tienen sobrepeso. La distensión de la piel conduce, aparentemente, a una desgranulación excesiva de los mastocitos con el consiguiente daño de colágeno y elastina. El uso prolongado de corticosteroides orales o tópicos o el síndrome de Cushing (aumento de la actividad cortical suprarrenal) conduce al desarrollo de estrías.

La manifestación del acné se define por la distribución de las glándulas pilosebáceas. La adolescencia provoca la maduración endocrina de los elementos anexiales, dando como resultado una acumulación de productos celulares dentro de los sistemas ductiles. Además de los productos celulares se encuentran los microorganismos coexistentes, más comúnmente *Propionibacterium acnés* y *Staphylococcus epidermidis*.

La rosácea es una afección común caracterizada por síntomas de rubor facial y un espectro de signos clínicos, incluyendo eritema, telangiectasia, aspereza de la piel, y una erupción inflamatoria papulopustular que se parece al acné. La rosácea se define por eritema persistente de la porción central de la cara que dura por lo menos 3 meses. Los criterios de soporte incluyen rubor, pápulas, pústulas y telangiectasias en las superficies convexas. Las características secundarias son ardor y escozor, edema, placas, apariencia seca, manifestaciones oculares y cambios fimáticos. La dermatitis perioral (POD) es una dermatitis facial papulopustular crónica. Se produce principalmente en mujeres jóvenes. Las características clínicas e histológicas de las lesiones se asemejan a las de la rosácea.

Las verrugas son proliferaciones benignas de piel y mucosa causadas por el virus del papiloma humano (VPH). En la actualidad, se han identificado más de 100 tipos de HPV. Ciertos tipos de HPV tienden a producirse en sitios anatómicos particulares; si en embargo, las verrugas de cualquier tipo de HPV se pueden producir en cualquier sitio. Las manifestaciones clínicas primarias de la infección por HPV incluyen verrugas comunes, verrugas genitales, verrugas planas y verrugas palmoplantares profundas (mirmecia). Las manifestaciones menos comunes de la infección por HPV incluyen hiperplasia epitelial focal (enfermedad de Heck), epidermodisplasia verruciforme y

quistes plantares. Las verrugas se transmiten por contacto directo o indirecto, y los factores de predisposición incluyen la interrupción de la barrera epitelial normal. El tratamiento puede ser difícil, con fracasos y recurrencias frecuentes.

5 Las verrugas genitales son el resultado de la infección por el virus del papiloma humano (HPV) adquirida por inoculación del virus en la epidermis a través de defectos en el epitelio (por ejemplo, maceración de la piel). La autoinoculación del virus en lesiones opuestas es común. La propagación de la infección por HPV se suele producir a través del virus asociado a la piel y no de la infección transmitida por la sangre.

10 La papulosis bowenoide (BP) se produce en los genitales de ambos sexos en personas sexualmente activas. La BP se manifiesta como pápulas que son inducidas de forma vírica por el virus del papiloma humano (HPV) y demuestran una histopatología distintiva (displasia bowenoide).

La psoriasis se caracteriza por una sustitución excesivamente rápida de la piel y aparece como una lesión crónica similar a placas eritematosas, bilateralmente simétricas, con una cobertura de escamas plateadas. Las lesiones clásicamente se localizan sobre las superficies extensoras, incluyendo los codos, rodillas, espalda y cuero cabelludo. También se pueden producir lesiones generalizadas confluentes.

15 En la enfermedad de Von Recklinghausen, aparecen múltiples tumores neuronales en el cuerpo. Se producen numerosas lesiones cutáneas pigmentadas. Predominan las clásicas manchas de café con leche. Adicionalmente, son comunes los hamartomas de iris pigmentados (es decir, nódulos de Lisch). Se pueden identificar lesiones óseas y lesiones y síntomas intracraneales y GI.

20 La necrobiosis lipóidica diabetorum es una lesión amarilla, atrófica deprimida, similar a placas, encontrada habitualmente en pacientes con diabetes. Tiene una fuerte asociación con la diabetes y en realidad puede ser un pródromo clínico de la aparición de la enfermedad de forma sistémica. Rara vez se encuentra en lugares distintos de las extremidades inferiores y en raras ocasiones se encuentra en ausencia de diabetes. La lesión tiende a evolucionar desde una zona similar a placas rojas a una con atrofia que en ocasiones puede ulcerar.

25 La dermatitis seborreica es un trastorno papuloescamoso que sigue patrones en las zonas ricas en sebo del cuero cabelludo, cara y tronco. Además del sebo, esta dermatitis está relacionada con la *Malassezia*, anomalías inmunológicas y activación del complemento.

30 La queratosis seborreica (también conocida como verruga seborreica, verruga senil y papiloma de células basales) es un tumor benigno frecuente en personas de edades avanzadas y de mediana edad. Por lo general se trata de una lesión papular elevada de color variable de marrón claro a marrón oscuro. La queratosis seborreica puede ser lisa o similar a una verruga con picaduras visibles. Los sitios comunes incluyen la cara, tronco y extremidades. La lesión también puede ser pedunculada o sésil. Una variante conocida como dermatosis papulosa nigra se produce sobre la frente y regiones malares de individuos con piel de color negro.

35 Los acrocordones (también conocidos como pólipo cutáneo, pólipo fibroepitelial, fibroma suave y papiloma fibroepitelial) en ocasiones se asocian con embarazo, diabetes mellitus y síndromes de poliposis intestinal. Tienden a situarse en las zonas intertriginosas de la axila, ingle y regiones inframamarias, así como en el área cervical baja a lo largo de la línea del cuello. Son pápulas carnudas suaves y usualmente, aunque no necesariamente, pedunculadas.

40 La queratosis actínica es el crecimiento más común relacionado con el sol. Las queratosis actínicas se encuentran principalmente en las áreas de la cara expuestas al sol, orejas, antebrazos y el dorso de las manos. Sin embargo, se pueden producir en cualquier zona que esté expuesta al sol de forma crónica o repetida, como la espalda, el pecho y las piernas. Normalmente aparecen como múltiples lesiones queratósicas verrugosas discretas, planas o elevadas. Por lo general, las lesiones suelen tener una base eritematosa cubierta por escamas (hiperqueratosis). Por lo general tienen un diámetro de de 3-10 mm y se agrandan de forma gradual en lesiones más amplias y más elevadas. Con el tiempo, la queratosis actínica se puede convertir en cuernos cutáneos invasivos o cáncer de piel.

45 Histológicamente, los cambios epidérmicos se caracterizan por acantosis, paraqueratosis y disqueratosis. La atipia celular está presente y los queratinocitos varían en tamaño y forma. Las figuras mitóticas son comunes.

50 La enfermedad de Bowen también se conoce como carcinoma *in situ* y neoplasia intraepidermoide escamosa. Las lesiones implican predominantemente piel no expuesta al sol (es decir, protegida). Clásicamente, la enfermedad de Bowen afecta a los genitales. El picor es una queja común. Con la afectación vulvar, los labios mayores tienden a estar más involucrados que los labios menores. Las lesiones son placas escamosas, con costra, eritematosas.

Las hiperplasias pseudocarcinomatosas son lesiones causadas por un proceso de reparación caracterizado por lenguas de epitelio escamoso que crecen hacia abajo en la dermis.

55 El nevus sebáceo de Jadassohn es una lesión hamartomatosa que expresa elementos de glándulas sebáceas y apocrinas, folículos pilosos defectuosos, acantosis y papilomatosis. Es una lesión congénita, normalmente presente en el cuero cabelludo y la cara. La lesión tiende a aumentar con el tiempo.

El lupus eritematoso (LE) es una enfermedad heterogénea del tejido conectivo asociada con activación de linfocitos B policlonales.

5 El adenoma sebáceo es una lesión nodular y lobulada con células generativas periféricas y diferenciaciones sebáceas variables a medida que se alcanza el centro de la lesión. No está tan organizado como los patrones de la hiperplasia sebácea. Esta lesión es distinta de la variedad hamartomatosa encontrada en la cara de pacientes con síndrome de esclerosis tuberosa.

10 Se cree que la queratosis folicular invertida es una variante inflamatoria de la queratosis seborreica. Normalmente se encuentra en las caras y las áreas expuestas al sol de los pacientes de edad avanzada. Por lo general, esta lesión se localiza en el párpado superior. Anatómicamente, representa un proceso negativo en aumento o endofítico dentro del epitelio de un folículo pilosebáceo. Las lesiones tienden a ser individuales y se presentan como una pápula o nódulo.

15 El tricoepitelioma es una lesión benigna poco común. Por lo general es de color rosa a color carne. Con frecuencia es múltiple y no ulcerativa. Estas lesiones tienden a ser recapitulaciones de los folículos pilosos. Inicialmente, aparecen durante la adolescencia. Las áreas habituales para esta lesión son la cara y el cuero cabelludo y, menos comúnmente, el tronco y el cuello.

El triquilemoma es un tumor benigno con un patrón de células claras globulares ricas en glucógeno. En ocasiones, la queratinización en el centro se identifica claramente.

El molusco sebáceo es un tumor de piel autocurable. La lesión es clásicamente un montículo en forma de cúpula con un cráter central de queratina.

20 El carcinoma de células basales es una neoplasia epitelial que aparece como úlceras insidiosas, indoloras o nódulos en las partes del cuerpo expuestas al sol. La ubicación más común en la cabeza es la nariz, específicamente la punta y las aletas nasales. El riesgo está relacionado con el tipo de piel y el grado de exposición a la luz solar, en particular a la radiación UV-B. Los tumores son más frecuentes en individuos con tez clara.

25 La mayoría de los carcinomas de células escamosas aparecen en las regiones del cuerpo expuestas al sol. El carcinoma de células escamosas (SCC) surge de la transformación maligna y la proliferación de queratinocitos en la epidermis. El SCC puede surgir de queratosis actínica, leucoplasia, queratosis o dermatitis por radiación, cicatrices, úlceras crónicas o sinusitis crónica. Las personas con queratosis actínica tienen células escamosas atípicas en un tercio a la mitad de la epidermis. Los pacientes con enfermedad de Bowen o SCC *in situ*, tienen queratinocitos atípicos en toda la epidermis. El SCC invasivo involucra la epidermis e invade la dermis. Los tumores aparecen inicialmente como parches cutáneos, placas y nódulos que se agrandan y desarrollan áreas centrales de inflamación, endurecimiento y, posteriormente, necrosis y exudación. Los SCC se metastatizan por extensión directa, linfática y hematogena.

30

35 El melanoma es un tumor que se desarrolla como resultado de la transformación maligna de los melanocitos. Estas células se obtienen a partir de la cresta neuronal. Por lo general, los melanomas se producen en la piel pero pueden surgir en otros lugares en los que las células de la cresta neuronal migran, tales como en el tracto gastrointestinal o en el cerebro.

Se contempla que las composiciones de la presente divulgación encuentran uso en el tratamiento de todas las afecciones y trastornos cutáneos mencionados anteriormente.

40 Las composiciones de la presente divulgación también encuentran uso en el tratamiento de quemaduras. La quemadura solar es una reacción inflamatoria cutánea aguda que sigue a la exposición excesiva de la piel a la radiación ultravioleta (UVR). La exposición a la radiación solar tiene los efectos beneficiosos de estimular la síntesis cutánea de la vitamina D y proporcionar calor radiante. Desafortunadamente, cuando la piel se somete a una radiación excesiva en el intervalo ultravioleta (longitud de onda < 400 nm), se pueden producir efectos perjudiciales. La más común es la quemadura solar aguda o eritema solar. Los ojos, en particular la córnea (la ventana clara de tejido en el frente del globo ocular), se pueden dañar fácilmente por la exposición a la radiación ultravioleta del sol y de otras fuentes de luz ultravioleta, tales como un arco de soldador, una lámpara reflectora de fotógrafo, una lámpara sorda o incluso una lámpara halógena de escritorio.

45

50 Las quemaduras graves dan como resultado la destrucción de la barrera cutánea que puede conducir a pérdidas de líquidos y electrolitos y la infección de la piel que dan como resultado una infección sistémica. Las quemaduras se clasifican en el grado de lesión al tejido. Las quemaduras de primer grado implican daño a la capa superior de la piel (epidermis), y las quemaduras de segundo grado implican la epidermis y la capa subyacente de la piel (dermis). Las quemaduras de primer y segundo grado también se pueden denominar quemaduras de grosor parcial. Las quemaduras de tercer grado afectan la epidermis, dermis e hipodermis, causando carbonización de la piel o un color blanco translúcido, con los vasos coagulados visibles justo debajo de la superficie de la piel. También se denominan quemaduras de espesor total.

55

5 El tratamiento de pacientes gravemente quemados incluye limpieza temprana y desbridamiento de la herida, fluidos intravenosos (IV) que contienen electrolitos, antibióticos sistémicos, antibióticos tópicos, apoyo nutricional y medicamentos para controlar el dolor. Se puede requerir injerto de piel, por lo general con piel extraída de sitios donantes del paciente, para conseguir el cierre del área herida. En quemaduras grandes, la piel de autoinjerto puede no estar disponible en cantidades suficientes para cerrar completamente la herida. En este caso, se aplican autoinjertos expandidos a la herida, y luego se usa un aloinjerto de cadáver para cerrar completamente la herida. Los sitios donantes de injertos de piel son heridas quirúrgicas que requieren el mismo nivel de atención que otras heridas abiertas.

10 Las composiciones de la presente divulgación también encuentran uso en el tratamiento de diversos tipos de heridas internas. Las heridas en los tejidos internos pueden ser la enfermera resultante por la cirugía, tales como las creadas por la eliminación de los tejidos cancerosos o la corrección de un labio y/o paladar leporino. Las heridas se pueden formar en las membranas de la boca, nariz y sistema digestivo.

15 Un labio y/o paladar leporino afecta a la forma facial evidente como una deformidad anatómica y tiene consecuencias funcionales que afectan la capacidad del niño para comer, hablar, oír y respirar. De forma específica, en el niño nacido con una hendidura bilateral, el cirujano se enfrenta inicialmente con un premaxilar protrusivo y la dificultad de conseguir una longitud columelar adecuada y altura vertical al labio durante la reconstrucción. Aunque la cirugía para el labio leporino bilateral ha sufrido muchos avances recientes, la corrección de las deformidades nasales asociadas con esta malformación congénita sigue siendo uno de los mayores retos en la cirugía plástica. La corrección quirúrgica de las deformidades nasales asociadas con labio leporino bilateral es un reto debido a que las deformidades se pueden hacer evidentes a medida que la nariz experimenta un mayor crecimiento y desarrollo.

20 La eliminación del cáncer de la mandíbula a menudo crea una brecha en el hueso que produce heridas en los tejidos circundantes. La osteogénesis por distracción es una técnica en la que el hueso se puede alargar mediante la formación ósea *de novo* como parte del proceso de cicatrización normal que se produce entre segmentos óseos quirúrgicamente osteotomizados que sufren distracción gradual y controlada.

25 La disfunción velofaríngea (VP) incluye cualquier trastorno estructural y/o neuromuscular de las paredes del velo y/o faríngea a nivel de la nasofaringe en la que se produce una interferencia con el cierre esfinteriano normal. La disfunción VP puede resultar de una alteración anatómica, mioneural, conductual o una combinación de trastornos.

30 El eritema multiforme (EM) es una reacción de hipersensibilidad mucocutánea aguda de gravedad variable caracterizada por una erupción cutánea distribuida de forma simétrica, con o sin lesiones de membrana mucosa. La forma leve más común, el EM menor, consiste en lesiones cutáneas con la participación de no más de una superficie de mucosa. Las máculas o pápulas eritematosas distribuidas de forma simétrica evolucionan en iris clásico o lesiones diana, con bordes rojos brillantes y petequias, vesículas o púrpura centrales. El EM mayor, o síndrome de Stevens-Johnson, es más grave, involucrando 2 o más membranas mucosas con afectación cutánea más variable. Puede implicar órganos internos y por lo general se asocia a síntomas sistémicos. Los hallazgos cutáneos pueden ser similares al EM menor, pero a menudo son más variables y graves. Son habituales las lesiones vesiculobullosas inflamatorias, a menudo con hemorragia y necrosis.

35 La rinitis se define como la inflamación de las membranas nasales y se caracteriza por un complejo de síntomas que consiste en cualquier combinación de los siguientes: estornudos, congestión nasal, picor nasal y rinorrea. Los ojos, oídos, senos y garganta también pueden estar implicados. La rinitis alérgica es la causa más común de rinitis.

40 La enfermedad de Crohn es un proceso inflamatorio idiopático, crónico, transmural del intestino que puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano. Se cree que la afección es el resultado de un desequilibrio entre mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios. La mayoría de los casos involucran al intestino delgado, en particular al íleon terminal. La presentación característica de la enfermedad de Crohn es con dolor abdominal y diarrea, que puede complicarse por formación de fístulas intestinales, obstrucción, o ambos. La lesión inicial comienza como un infiltrado inflamatorio focal alrededor de las criptas, seguido por ulceración de la mucosa superficial. Más tarde, las células inflamatorias invaden las capas profundas y, en ese proceso, comienzan a organizarse en granulomas no caseantes. Los granulomas se extienden a través de todas las capas de la pared intestinal y hacia el mesenterio y los ganglios linfáticos regionales. Aunque la formación de granulomas es patognomónica de la enfermedad de Crohn, la ausencia no excluye el diagnóstico. La anomalía inicial es la hiperemia y el edema de la mucosa involucrada. Posteriormente, se forman úlceras superficiales separadas, que se convierten en úlceras serpiginosas profundas localizadas de forma transversal y longitudinal sobre una mucosa inflamada, dando a la mucosa una apariencia de paralelepípedos. A menudo, las lesiones son segmentarias, separadas por zonas sanas. La malabsorción se produce como resultado de la pérdida de la superficie funcional de absorción de la mucosa. Este fenómeno puede conducir a desnutrición proteico-calórica, deshidratación y múltiples deficiencias de nutrientes. La participación del íleon terminal puede dar como resultado la malabsorción de los ácidos biliares, lo que conduce a esteatorrea, deficiencia de vitaminas liposolubles y la formación de cálculos biliares. La malabsorción de grasa, al atrapar el calcio, puede dar como resultado un aumento de la excreción de oxalato (normalmente formando complejos con calcio), causando la formación de cálculos renales.

5 La gastritis incluye una miríada de trastornos que implican cambios inflamatorios en la mucosa gástrica, incluyendo gastritis erosiva causada por un irritante nocivo, gastritis por reflujo a partir de exposición a bilis y fluidos pancreáticos, gastritis hemorrágica, gastritis infecciosa y atrofia gástrica de la mucosa. La enfermedad de úlcera péptica (PUD) se refiere a un defecto de la mucosa separado en las porciones del tracto gastrointestinal (gástrico o duodenal) expuestas a la secreción de ácido y pepsina. Por lo general, la gastritis erosiva se asocia con una enfermedad grave o con varios fármacos. El estrés, etanol, bilis y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) alteran la barrera gástrica de la mucosa, haciéndola vulnerable a las secreciones gástricas normales. La infección con *Helicobacter pylori*, un bacilo gram-negativo microaerófilo corto, en forma de espiral, es la principal causa de PUD y está asociada con prácticamente todas las úlceras no inducidas por los AINE.

10 El herpes oral es una infección causada por el virus del herpes simple. El virus causa llagas dolorosas en los labios, encías, lengua, techo de la boca e interior de las mejillas. También puede causar síntomas tales como fiebre y dolores musculares.

15 Las composiciones de la presente divulgación encuentran además uso en la mejora de las diversas fases del proceso de cicatrización. Hay diferentes fases del proceso de cicatrización. La fase inflamatoria comienza con la propia lesión. La fase inflamatoria se caracteriza por hemostasis e inflamación. Aquí se tiene sangrado, estrechamiento inmediato de los vasos sanguíneos, formación de coágulos y liberación de diversas sustancias químicas en la herida que iniciarán el proceso de cicatrización. Las células especializadas limpian la herida de los desechos a lo largo de varios días. El colágeno expuesto durante la formación de la herida activa la cascada de coagulación (las rutas tanto intrínseca como extrínseca), iniciando la fase inflamatoria. Después de producirse una  
20 lesión en el tejido, las membranas celulares, dañadas por la formación de la herida, liberan tromboxano A2 y prostaglandina 2-alfa, potentes vasoconstrictores. Esta respuesta inicial ayuda a limitar la hemorragia. Después de un breve periodo de tiempo, se produce una vasodilatación capilar de forma secundaria a la liberación local de histamina, y las células de la inflamación son capaces de migrar al lecho de la herida.

25 Las plaquetas, la primera célula de respuesta, liberan múltiples quimioquinas, incluyendo factor de crecimiento epidérmico (EGF), fibronectina, fibrinógeno, histamina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), serotonina y factor de von Willebrand. Estos factores ayudan a estabilizar la herida a través de la formación de coágulos. Estos mediadores actúan para controlar el sangrado y limitar el alcance de la lesión. La desgranulación plaquetaria también activa la cascada del complemento, específicamente C5a, que es un potente quimioatrayente para los neutrófilos. La fase inflamatoria continúa, y más células de respuesta inmunológica migran a la herida. La  
30 segunda célula de respuesta que migra a la herida, el neutrófilo, es responsable de la eliminación de residuos, opsonización mediada por el complemento de bacterias y destrucción de bacterias a través de mecanismos de estallido oxidativo (es decir, formación de superóxido y peróxido de hidrógeno). Los neutrófilos matan a las bacterias y descontaminan la herida de los residuos extraños. Las siguientes células presentes en la herida son los leucocitos y los macrófagos (monocitos). El macrófago, denominado orquestador, es esencial para la cicatrización de heridas.  
35 Los macrófagos secretan numerosas enzimas y citoquinas. Estas incluyen colagenasas, que desbridan la herida; interleuquinas y factor de necrosis tumoral (TNF), que estimulan fibroblastos (producen colágeno) y estimulan la angiogénesis; y el factor de crecimiento transformante (TGF), que estimula los queratinocitos. Esta etapa marca la transición al proceso de reconstrucción del tejido, es decir, la fase proliferativa.

40 En la fase proliferativa se forma una matriz o celosía de celdas. En esta matriz se formarán nuevas células de piel y vasos sanguíneos. Se trata de los nuevos vasos sanguíneos pequeños (conocidos como capilares) que dan a una herida en cicatrización su apariencia de color rosa o púrpura. Estos nuevos vasos sanguíneos proporcionarán oxígeno y nutrientes a las células en reconstrucción para sostener el crecimiento de las nuevas células y apoyar la producción de proteínas (principalmente colágeno). El colágeno actúa como el marco sobre el cual se construyen los nuevos tejidos. El colágeno es la sustancia dominante en la cicatriz final.

45 La epitelialización, angiogénesis, formación de tejido de granulación, y deposición del colágeno están implicados en la porción anabólica de la fase de proliferación de la cicatrización de la herida. La epitelización se produce temprano en la reparación de la herida. Si la membrana basal permanece intacta, las células epiteliales migran hacia arriba en el patrón normal. Esto es equivalente a una quemadura de piel de primer grado. Las células progenitoras epiteliales permanecen intactas por debajo de la herida, y las capas normales de la epidermis se restauran en 2-3 días. Si se  
50 ha destruido la membrana basal, similar a una quemadura de segundo o tercer grado, la herida se reepiteliza a partir de las células normales de la periferia y de los apéndices de la piel, si estuvieran intactos (por ejemplo, folículos pilosos, glándulas sudoríparas).

55 La angiogénesis, estimulada por el TNF-alfa, está marcada por la migración de células endoteliales y la formación de capilares. Los nuevos capilares suministran nutrientes a la herida y ayudan a mantener el lecho de tejido de granulación. La migración de los capilares hacia el lecho de la herida es fundamental para la correcta cicatrización de las heridas. La fase de granulación y la deposición de tejido requieren nutrientes suministrados por los capilares, y el fracaso para que esto ocurra da como resultado una herida crónica no cicatrizada. Los mecanismos para modificar la angiogénesis están bajo estudio y tienen un potencial significativo para mejorar el proceso de cicatrización.

60

Durante la formación de tejido de granulación, los fibroblastos se diferencian y producen sustancia fundamental y a continuación colágeno. La sustancia fundamental se deposita en el lecho de la herida; el colágeno se deposita a medida que la herida sufre la fase final de reparación. En la fase proliferativa de la reparación de la herida están implicadas muchas citoquinas diferentes. Las etapas y el mecanismo exacto de control no se comprenden bien.  
5 Algunas de las citoquinas incluyen PDGF, factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF) y EGF.

Durante una etapa de remodelación, el armazón (colágeno) se organiza más haciendo al tejido más fuerte. La densidad de los vasos sanguíneos se reduce y la herida comienza a perder su color rosado. En el transcurso de 6 meses, la resistencia de la zona aumenta, alcanzando opcionalmente un 70 % de la resistencia de la piel no lesionada. En la fase de maduración, la herida sufre una contracción, dando como resultado una cantidad menor de  
10 tejido cicatricial aparente. Todo el proceso es un continuo dinámico con una superposición de cada fase y una remodelación continua. La herida alcanza la máxima resistencia a un año, con una resistencia a la tracción que es un 30 % de la piel normal. La deposición de colágeno continúa durante un periodo de tiempo prolongado, pero el aumento neto en la deposición de colágeno se estabiliza después de 21 días.

La epitelialización es el proceso de establecer una piel, o células epiteliales nuevas. La piel forma una barrera protectora entre el medio exterior y el cuerpo. Su principal objetivo es proteger contra la pérdida excesiva de agua y bacterias. La reconstrucción de esta capa comienza unas pocas horas después de la lesión y se completa en 24-48 horas en una herida suturada (cosida) limpia. Las heridas abiertas pueden tardar 7-10 días debido a que el proceso inflamatorio es prolongado, lo que contribuye a la cicatrización. La cicatrización se produce cuando la lesión se  
15 extiende más allá de la capa profunda de la piel (en la dermis).

Las 3 categorías de cierre de heridas son primarias, secundarias y terciarias. La cicatrización primaria implica el cierre de una herida dentro de las horas de su creación. La cicatrización secundaria no implica un cierre formal de la herida; la herida se cierra de forma espontánea por contracción y reepitelialización. El cierre terciario de la herida, también conocido como cierre primario retardado, implica el desbridamiento inicial de la herida durante un periodo de tiempo prolongado y a continuación el cierre formal con sutura o por otro mecanismo.  
20

Las composiciones de la presente divulgación encuentran además uso para el tratamiento de cicatrices, solas o en combinación con tratamientos de cicatrices conocidos. Las heridas abiertas pueden dar como resultado una serie de complicaciones incluyen infección de la herida y cicatrices desfigurantes incluyendo queloides, cicatrices ensanchadas y cicatrices hipertróficas. Las cicatrices queloides y las cicatrices hipertróficas son heridas que se curan excesivamente por encima de la superficie de la piel. La diferencia entre un queloide y una cicatriz hipertrófica es que un queloide continúa agrandándose más allá del tamaño y forma originales de la herida, mientras que una cicatriz hipertrófica se agranda dentro de los límites de la herida original. Aunque ambos pueden ser de color rojo y elevadas, los queloides continúan creciendo y las cicatrices hipertróficas tienden a reducirse con el tiempo. Ambos pueden reaparecer después de la extirpación quirúrgica; sin embargo, la recurrencia de cicatrices queloides es más común. Las cicatrices ensanchadas son heridas que se separan durante el proceso de cicatrización, por lo general como respuesta a la tensión perpendicular a los bordes de la herida. Las cicatrices hipertróficas son más comunes que los queloides. Las cicatrices hipertróficas se pueden producir en personas de cualquier edad o en cualquier sitio, y tienden a retroceder de forma espontánea. En general, las cicatrices hipertróficas responden mejor al tratamiento. Aunque los queloides se producen con frecuencia en personas de raza negra, se pueden producir en personas de cualquier raza con una tendencia probada a la formación de queloides. Los queloides son más frecuentes en  
25 personas de 10-30 años, mientras que las cicatrices hipertróficas se producen en personas de cualquier edad.  
30  
35  
40

Los factores que inducen la formación de cicatrices queloides o hipertróficas no se conocen bien. Varias causas genéticas y ambientales se han visto implicadas en la etiología de las cicatrices queloides e hipertróficas. Tanto en la formación de cicatrices queloides como hipertróficas, se produce una acumulación excesiva de colágeno a partir de un aumento de la síntesis de colágeno o una disminución de la degradación del colágeno. Las causas propuestas para la formación de cicatrices anómalas incluyen la reacción de cuerpos extraños y las infecciones bacterianas. Muchas cicatrices anómalas están asociadas con tatuajes, quemaduras, inyecciones, mordeduras, vacunas, traumatismos, cirugía o infección. La tensión de la piel está frecuentemente implicada en la formación de cicatrices hipertróficas. La cicatrización anómala de la cicatriz implica zonas de alta tensión de la piel, tales como el pecho anterior, hombros y la parte superior de la espalda. Otros factores implicados en la etiología de la formación de cicatrices anómalas incluyen infección de la herida o anoxia, una respuesta inflamatoria prolongada y orientación de la herida diferente de las líneas de tensión cutánea relajada. La formación queloide tiene una base genética, como lo demuestra su predilección por las personas de ciertas razas y en ciertas familias. Debido a que los queloides tienden a demostrar un crecimiento acelerado durante la pubertad o el embarazo y tienden a resolverse con la menopausia, las hormonas (tanto andrógenos como estrógenos) se han visto implicadas en la formación de queloides. Otras hormonas relacionadas con la formación de queloides incluyen alteraciones de la hormona tiroidea y hormonas estimulantes de melanocitos. Las alteraciones inmunológicas están implicadas en cicatrices anómalas. De forma específica, los niveles irregulares de inmunoglobulina y complemento, aumento del factor beta de crecimiento transformante y mastocitos se encuentran en cicatrices anómalas. Además, la disminución del factor de necrosis tumoral y los niveles de interleuquina 1 se encuentran en estas cicatrices anómalas. Las cicatrices ensanchadas resultan de un exceso de tensión perpendicular a los bordes de la herida durante el proceso de cicatrización. Por lo general, el ensanchamiento de las cicatrices se produce en los primeros 6 meses de la lesión.  
45  
50  
55  
60

Aunque en la formación de cicatrices anómalas están implicados múltiples factores, los estudios indican que las cicatrices queloides e hipertrofiadas resultan de una mayor producción de colágeno y una menor degradación del colágeno. Los niveles de la enzima relacionada con el colágeno, prolil hidroxilasa, están elevados en la piel afectada por queloides en comparación con la piel normal. La prolil hidroxilasa es necesaria para la hidroxilación de prolina durante la síntesis de colágeno, lo que sugiere que la sobreproducción de colágeno se produce con queloides.

La producción de colágeno se eleva en muestras de biopsia que loide y en fibroblastos cultivados obtenidos a partir de queloides. El aumento de la producción de colágeno por fibroblastos cultivados obtenidos a partir de queloides persiste durante toda su vida *in vitro*; no vuelven a la normalidad después de la transferencia de la lesión al cultivo. No se encuentran diferencias significativas en el contenido de ADN o celularidad cuando la dermis que loide se compara con la dermis normal. Esto sugiere que cada fibroblasto está produciendo más colágeno en lugar de un aumento que se produce en el número de fibroblastos que producen una cantidad normal de colágeno. En la formación de queloides, la producción excesiva de colágeno por los fibroblastos es probable debido al entorno de la herida.

Se cree que la formación de cicatrices ampliadas resulta de la separación del borde de la herida con una tensión perpendicular a la herida de la piel en cicatrización. En la piel existe de forma natural estado de tensión; la piel herida hace huecos y se vuelve elíptica en lugar de redondo. Cuando se cierra una herida opuesta a las líneas de tensión, aumenta la posibilidad de formación de cicatrices ensanchadas.

Después del examen clínico, los queloides y las cicatrices hipertróficas se elevan por encima del nivel de la piel. Las cicatrices hipertróficas están autolimitadas; se hipertrofian dentro de los límites confines de la herida. Inicialmente, las cicatrices hipertróficas pueden ser elevadas, rojas, pruriginosas e incluso dolorosas; sin embargo, con el tiempo, se vuelven pálidas y planas. Las cicatrices hipertróficas aparecen peor de 2 semanas a 2 meses. Las cicatrices queloides se pueden diferenciar de las cicatrices hipertróficas por su propagación más allá de la herida original. Las cicatrices queloides tienden a permanecer rojas, pruriginosas y dolorosas durante muchos meses a años hasta la menopausia. Por lo general, los pacientes tienen antecedentes personales o familiares de formación de queloides. A diferencia de las cicatrices hipertróficas y queloides, las cicatrices ensanchadas son planas y a veces deprimidas. Con la maduración de la herida adecuada, estas heridas se desvanecen al pigmento de la piel no dañada circundante. Normalmente, las cicatrices ampliadas no son de color rojo ni pruriginosas.

Las líneas de tensión relajadas de la piel siguen los surcos formados cuando la piel está relajada. A diferencia de las arrugas, no son características visibles de la piel. Se derivan simplemente de los surcos producidos por pellizcar sobre la piel. Estos surcos se producen preferentemente con pinzamiento perpendicular a las líneas. Cuando la piel se pellizca en oblicuo a las líneas de tensión relajadas de la piel, se crea un patrón en forma de S. Si la piel se pinza en paralelo a las líneas se crean surcos más pequeños y más altos. Las incisiones de cierre opuestas a las líneas de tensión relajadas de la piel pueden aumentar el riesgo de formación de cicatrices ensanchadas o hipertróficas.

Una contraindicación relativa potencial a la cirugía de revisión de cicatriz existe cuando la cicatriz es un que loide debido al riesgo de empeorar la cicatriz. En ocasiones, cuando los queloides recurren, se hacen más grandes que el original. Las cicatrices ampliadas se pueden diferenciar fácilmente de las cicatrices hipertróficas y queloides basándose en los hallazgos de un examen físico. Las cicatrices ampliadas son planas y a veces incluso deprimidas. Las cicatrices hipertróficas y los queloides son indistinguibles con microscopía óptica. Sin embargo, hay varias diferencias cuando se observan bajo un microscopio electrónico y cuando se evalúan de forma inmunológica. Los queloides contienen fibras de colágeno gruesas con un aumento del contenido hialurónico epidérmico, mientras que las cicatrices hipertróficas presentan estructuras nodulares con finas fibras de colágeno y aumento de los niveles de actina del músculo liso alfa. El colágeno tanto en queloides como en cicatrices hipertróficas se organiza en nódulos discretos, anulando con frecuencia las papilas epiteliales en la dermis papilar de las lesiones. Aunque el colágeno en la dermis normal se coloca en manojos discretos separados por un espacio intersticial considerable, los nódulos de colágeno en queloides y en cicatrices hipertróficas aparecen avasculares y unidireccionales y están alineados en una configuración altamente tensada.

Existen diferentes opciones no quirúrgicas para tratar las cicatrices anómalas. Se cree que la presión disminuye el metabolismo del tejido y aumenta la descomposición del colágeno dentro de la herida. Los diferentes procedimientos para aplicar presión incluyen el uso de vendajes elásticos (vendas de ACE), medias para enfermedad tromboembólica, o guantes de tipo Isotoner en las extremidades. Como alternativa, se pueden usar prendas de compresión ajustadas diseñadas a medida para aplicar presión a las zonas más difíciles, incluyendo el cuello y el torso. Dado que estos dispositivos son incómodos, el cumplimiento del paciente varía. Desafortunadamente, para obtener resultados óptimos, estos dispositivos se deben usar de 6-12 meses durante la maduración de la herida.

Para tratar cicatrices anómalas se puede usar gel de silicona. Se muestra que el gel de silicona disminuye de forma significativa el volumen de la cicatriz cuando se usa con el tiempo en particular para la formación de cicatrices hipertróficas. Se cree que el efecto del gel de silicona sobre la cicatriz se debe a la hidratación de la herida. El gel de silicona se aplica a la herida durante al menos 12 h/d. Los pacientes encuentran que es más atractivo aplicar la silicona a sus heridas durante la noche. El gel de silicona está ganando popularidad porque se puede aplicar en una zona más pequeña durante 12 h/d, por lo general por la noche. Sin embargo, la ruptura de la piel, erupciones cutáneas, y dificultad con la adherencia de la herida puede conducir al desuso.

Las inyecciones de esteroides se han convertido en una opción no quirúrgica común en el tratamiento de cicatrices problemáticas. El esteroide usado para la inyección intralesional es triamcinolona (Kenalog). Las inyecciones de triamcinolona han sido el tratamiento convencional para inducir aplanamiento, atenuación y disminución de la sintomatología de las cicatrices hipertróficas. Estas inyecciones se pueden administrar en cuanto se identifique una cicatriz problemática. La dosis de la inyección puede variar de 10-120 mg, dependiendo del tamaño de la cicatriz.

Para cicatrices hipertróficas de finas a anchas se puede hacer uso de una inyección de triamcinolona y para cicatrices hipertrofiadas muy anchas se puede usar silicona. Algunos pacientes prefieren las inyecciones de triamcinolona para evitar la aplicación y uso de silicona todos los días durante 6-9 meses, especialmente en las zonas del cuerpo en las que la adherencia es escasa. Los efectos adversos de las inyecciones de triamcinolona incluyen hipopigmentación y atrofia subcutánea. Otras opciones no quirúrgicas incluyen inyecciones intralesionales de corticosteroides, terapia con vitamina E, terapia con óxido de cinc, agentes antineoplásicos e inmunoterapia.

Si las medidas no quirúrgicas no tienen éxito en el tratamiento de cicatrices anómalas, se puede considerar la intervención quirúrgica. El cierre de las heridas cierre para orientar la herida a lo largo de las líneas de tensión relajadas de la piel son importantes. Una práctica convencional usada a menudo de manera más bien subconsciente después de la escisión de una lesión implica la evaluación de la dirección de la menor tensión basándose en la configuración de los bordes de la herida o pinzando la herida.

El procedimiento de primera línea usado para la revisión de la cicatriz es la escisión fusiforme. En general, la escisión fusiforme no requiere elongación de la cicatriz. Para evitar las aurículas caninas, asegurarse de que la herida tenga una relación de longitud a anchura de 4:1. Para heridas cortas orientadas a lo largo de líneas de tensión relajadas de la piel se prefiere la escisión fusiforme. El procedimiento del colgajo de Millard es similar a la escisión fusiforme, pero implica conservar la cicatriz y su conexión a la grasa subyacente. Se hace una incisión en la piel de forma fusiforme alrededor de la cicatriz hasta el nivel subcutáneo. A continuación, la cicatriz se desepitelializa, y los bordes de la piel se aproximan sobre la cicatriz desepitelializada. Para las cicatrices ensanchadas y deprimidas se prefiere la técnica del colgajo de Millard.

Las cicatrices no orientadas a lo largo de las líneas de tensión relajadas de la piel se pueden modificar con un procedimiento de plastia en Z. Se crean miembros de igual longitud para la plastia en Z. El ángulo de Z determina la longitud de la distribución de la tensión y el alargamiento de la cicatriz (por ejemplo, 30° para un 25 %, 45° para un 50 %, 60° para un 75 %, 75° para un 100 %, 90° para un 120 %). La técnica de plastia en W para la revisión de la cicatriz es similar a la plastia en Z debido al resultado de separar una cicatriz en línea recta en un patrón que es menos visible. Del mismo modo que una escisión fusiforme, la plastia en W implica la eliminación de la piel; por lo tanto, evitar este procedimiento si hay una tensión significativa a través de los bordes de la herida. La revisión de la cicatriz por plastia en W es preferente para cicatrices a lo largo de líneas de la tensión de la piel relajadas; cicatrices con una contractura del arco; cicatrices cortas y deprimidas; y cicatrices faciales.

La expansión del tejido y la escisión en serie se pueden considerar para revisiones de cicatrices de mayor tamaño cuando se predice una tensión excesiva de la herida. Si se esperan más de 2 escisiones en serie, se prefiere la expansión del tejido. Por último, otros procedimientos que se han descrito para tratar cicatrices incluyen dermoabrasión, criocirugía y terapia con láser. Las cicatrices ensanchadas se pueden tratar de manera diferente a las cicatrices hipertrofiadas. Las cicatrices ampliadas pueden ser planas o incluso deprimidas. Por lo tanto, no se prefiere la administración de esteroides intralesionales; estos agentes podrían empeorar la depresión. Las cicatrices ensanchadas se tratan preferentemente con la técnica de 2 de colgajo de Millard sobre una cicatriz desepitelializada. Esta técnica proporciona un relleno de tejido blando bajo los bordes aproximados de la herida. Además, si la cicatriz ensanchada se repite, el riesgo de otra recurrencia se puede minimizar reorientando la tensión de la herida a lo largo de las líneas de tensión relajada de la piel. Otros adjuntos descritos en el tratamiento de cicatrices ensanchadas incluyen la inyección de injertos de grasa u otros sustitutos de tejido. Cuando se orientan cerca de las líneas de tensión relajadas de la piel, las cicatrices hipertróficas se pueden extirpar de una manera fusiforme. Si la cicatriz hipertrófica se desarrolla debido a una tensión excesiva a través de la herida como resultado de una orientación desfavorable de la herida, en ocasiones la plastia Z puede ayudar a reorientar la herida para distribuir la tensión en una dirección diferente para minimizar el riesgo de recurrencia.

Después de la cirugía, son preferentes prendas de compresión y gel de silicona durante 4-6 meses para disminuir el riesgo de recurrencia. Se alienta a los pacientes a que se abstengan de realizar actividades extenuantes durante al menos 6 semanas, hasta que la herida consiga aproximadamente un 80 % de la resistencia a la tracción original de la herida. Los pacientes se supervisan durante 6 meses después de la cirugía para detectar y potencialmente evitar las recurrencias tempranas. Después de la cirugía, los pacientes corren riesgo de cicatriz hipertrófica y recurrencia de cicatrización ampliada. Otros riesgos incluyen infección, hematoma, seroma y cicatrización dolorosa o poco atractiva. El riesgo de recurrencia es significativo para las cicatrices tanto hipertróficas como ensanchadas, y se incrementa con operaciones repetidas. La cicatrización de la herida requiere aproximadamente 1 año, periodo de tiempo durante el cual el cirujano y el paciente deberían observar y esperar mejoría. Una vez que la cicatriz ha tenido una oportunidad de madurar, la revisión de la cicatriz se puede considerar.

En algunos casos de la presente descripción, se usan composiciones que comprenden extractos celulares diferenciados para mejorar cualquier zona de la persona visible y que contribuya al aspecto cosmético de una

persona, que incluyen, pero no se limitan a, piel, cabello, uñas, dientes, grasa subcutánea, cartílago, músculo y estructuras esqueléticas. Se contemplan los procedimientos de suministro con pistola génica y microinyección descritos para introducir extractos o extraer componentes a estructuras por debajo de la superficie de la piel de una persona.

- 5 La presente divulgación se refiere a impedir el deterioro, daño y mal funcionamiento de células y tejidos, y para estimular, mejorar y superar la función celular con el fin de estimular, mejorar y superar la apariencia, vitalidad y salud tratando células y tejidos con células, extractos de células o huevo diferenciables o componentes de dichos extractos que incluyen moléculas de señalización, péptidos, carbohidratos, lípidos o ácidos nucleicos.

10 La presente divulgación contempla la evaluación de las necesidades de una persona para cicatrización, regeneración o reparación de daños por varios medios, que incluyen, pero no se limitan a, análisis y mediciones de superficies visibles, pH de la piel, espesor, estructura y elasticidad de capas de piel, análisis de muestras de sangre o tejidos mediante microchip, RT-PCR, espectrometría de masas, cromatografía líquida de alta presión, ensayos de ELISA, análisis de ARN, análisis de acumulación de daño en el ADN o genes defectuosos mediante secuenciación de ADN, evaluación de la salud de órganos y tejidos internos mediante imágenes de rayos X, formación de imágenes por ultrasonido, tomografía computarizada (CT), formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), tomografía de emisión de positrones (PET).

20 La grasa subcutánea contribuye a la apariencia estética de una persona y se redistribuye durante el envejecimiento, fumando y en una serie de enfermedades, que incluyen el VIH y la diabetes, así como en las víctimas de quemaduras. El síndrome del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)-lipodistrofia está asociado con la redistribución de la grasa y anomalías metabólicas, incluida la resistencia a la insulina. Se cree que el aumento de las concentraciones de lípidos intramiocelulares (IMCL) contribuyen a la resistencia a la insulina, estando vinculadas a variables metabólicas y de composición corporal. Entre los sujetos infectados por el VIH, se reduce el área de grasa subcutánea en la pantorrilla y la grasa de las extremidades. La grasa extrema se asocia de forma significativa con IMCL entre pacientes infectados por el VIH, controlando la grasa abdominal visceral, la grasa subcutánea abdominal y los medicamentos antirretrovirales en un modelo de regresión. El aumento de IMCL en mujeres infectadas por el VIH con un patrón de lipodistrofia mixta se asocia de forma más significativa con la reducción de la grasa de las extremidades. (Torriani M y col., J. Appl. Physiol. Febrero de 2006; 100 (2): 609-14. Epub del 13 de octubre de 2005). La saturación del depósito de grasa subcutánea es el suceso primario en la fisiopatología de la resistencia a la insulina en la mayoría de los pacientes y postula que este suceso seminal puede conducir al desarrollo de hipertensión, hipertrigliceridemia y niveles de HDL deprimidos (es decir, el síndrome metabólico). En la actualidad no existen medios eficaces para redistribuir la grasa subcutánea en tales personas, el tratamiento actual incluye (1) pérdida de peso con diferentes respuestas observadas con respecto a la resistencia a la insulina dependiendo del tamaño del depósito de grasa; (2) agonistas gamma del receptor activado por proliferador de peroxisoma, tales como tiozolidinadionas que expanden el depósito de grasa subcutánea, (3) expandir sitios alternativos de almacenamiento de triglicéridos por una variedad de técnicas, tales como hipertrofia muscular inducida por entrenamiento de resistencia, también pueden mejorar la resistencia a la insulina; (4) fármacos, tales como los agonistas del receptor beta 3 adrenérgico que estimulan la lipólisis, pueden aumentar la resistencia a la insulina liberando ácidos grasos libres en la circulación. Los inhibidores de la oxidación beta de los ácidos grasos libres (por ejemplo, inhibidores de la carnitina palmitoil transferasa) pueden causar resistencia a la insulina al ahorrar grasa y (5) liposucción, al reducir el tamaño del depósito de grasa subcutánea puede empeorar la resistencia a la insulina, aumentando de este modo el riesgo de diabetes mellitus de tipo 2 (Cherian MA, Santoro TJ, Med Hypotheses. 14 de diciembre de 2005; [Epub previa a la edición impresa]).

45 Las alteraciones en la grasa subcutánea y en el estado de la piel debido a cambios hormonales que se producen durante el envejecimiento y la enfermedad también se contemplan en áreas de uso para la presente divulgación. Los efectos de los esteroides ováricos y otros son importantes para el metabolismo de la piel y el cabello, los cambios en la composición corporal y las alteraciones de la distribución de grasa subcutánea a lo largo de la vida. La denominada endocrinología estética tiene acceso a deficiencia o exceso de esteroides ováricos que conducen a diferentes problemas de piel y cabello y otros no genitales, es decir, obesidad y celulitis. Los esteroides sexuales son moléculas pequeñas que se transportan a la piel por aplicación tópica cuando se formulan adecuadamente, y se contempla que se añada a los extractos presentados en la presente invención con el fin de conseguir efectos locales pero para evitar reacciones sistémicas. Los estrógenos, administrados por vía oral o por vía tópica, pueden contrarrestar el envejecimiento de la piel especialmente después de la menopausia. El estrógeno por sí solo no es suficiente para la reconstitución de la piel juvenil, pero puede ralentizar el proceso de envejecimiento de la piel. El tratamiento hasta el momento solamente exitoso de la pérdida de cabello en las mujeres es mediante la aplicación del compuesto no hormonal minoxidil, y las composiciones contempladas por la presente divulgación pueden servir para ser una manera diferente de tratar la pérdida del cabello. De hecho, las composiciones contempladas pueden estimular los folículos pilosos para regenerar o aumentar la velocidad y la calidad del cabello, así como las uñas. Los estrógenos también contribuyen al hirsutismo (el crecimiento excesivo de pelo oscuro grueso en localizaciones en las que el crecimiento del pelo en mujeres por lo general es mínimo o ausente), acné y cambios en la composición del cuerpo. (Gruber CJ, y col., Current concepts in aesthetic endocrinology. Gynecol Endocrinol. Diciembre de 2002; 16 (6): 431-41). Las composiciones en la presente divulgación se contemplan adicionalmente para su uso en la pérdida del cabello y la alopecia en los hombres que pueden estar causadas por hormonas, dieta, cáncer, enfermedad crónica o estrés.

Se contempla que la presente divulgación se puede usar para regular el crecimiento del cabello estimulando o modulando las células del folículo piloso para reducir o mejorar o regenerar el crecimiento del cabello en zonas deseadas p mediante or aplicaciones tópicas o subdérmicas.

5 La presente divulgación también es útil en el tratamiento de la celulitis. La celulitis es un término común usado para describir los bolsillos superficiales de grasa atrapada, que causan hoyuelos desiguales o "piel de naranja". Aparece en un 90 % de las mujeres post-adolescentes y rara vez se observa en los hombres. Las zonas comunes pero no exclusivas en las que se encuentra la celulitis, son los muslos, nalgas y abdomen. Contrariamente a la creencia popular, la celulitis no está relacionada con la obesidad, ya que se produce en mujeres con sobrepeso, normales y delgadas. La celulitis puede ser ayudada por dispositivos mecanizados con rodillos motorizados y succión regulada. Este dispositivo no quirúrgico y no invasivo crea un pliegue simétrico de la piel, lo que permite la movilización del tejido profundo que se produce y los resultados en la reducción de la celulitis y la pérdida de centímetros. La presente divulgación contempla la aplicación de extractos por vía tópica o por vía subcutánea para regular la distribución de depósitos de grasa subcutánea y mejorar la apariencia estética de áreas afectadas por la celulitis.

15 Se contempla que la presente divulgación puede ser útil para la reparación o rejuvenecimiento o formación *de novo* de tejidos, órganos y células dañados debajo de la piel, incluyendo todos los órganos y tejidos internos, que incluyen, pero no se limitan a, músculo, grasa, cartílago, hueso, tejido conectivo, bazo, hígado, páncreas, pulmones y tejido nervioso. Los daños a los tejidos u órganos internos pueden ser inducidos, por ejemplo, por accidentes, enfermedades, medicación, cáncer, radiación y cirugía.

20 Cuando el cuerpo está expuesto a altas dosis de radiación, se inicia una respuesta biológica compleja que puede conducir a un fallo multiorgánico (MOF). El MOF comienza con los depósitos de energía en las dianas celulares y se propaga y amplifica mediante la respuesta de los tejidos al daño celular. La biología de la cicatrización de las heridas está en la raíz del MOF después del traumatismo quirúrgico, la inflamación es la base del MOF en la sepsis y la biología del tejido irradiado inicia el MOF radiogénico. Se ha sugerido que la respuesta del tejido a los daños por radiación se inicia y coordina mediante la señalización extracelular. Se ha demostrado que el factor de crecimiento transformante 31 dirige la biología del tejido irradiado como un sensor de estrés oxidativo a nivel de tejido, y es parte integrante de la respuesta al daño del ADN celular. (Barcellos-Hoff MH. How tissues respond to damage at the cellular level: orchestration by transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) British Journal of Radiology (2005) Suplemento\_27, 123-127).

30 En algunos casos, las composiciones que se han descrito anteriormente se usan para aumentar la producción de colágeno por las células de la piel. En algunos casos, las composiciones se aplican a la piel o heridas en la piel en una cantidad eficaz, que es la cantidad requerida para aumentar la producción de colágeno en las células. Se contempla que al aumentar la producción de colágeno, las composiciones de la presente invención realzan o mejoran la cicatrización de heridas en un sujeto. También se contempla que al aumentar la producción de colágeno mediante aplicación tópica, las composiciones de la presente divulgación pueden mejorar los atributos de la piel dañada, tales como aspecto general, flexibilidad, suavidad, cantidad de arrugas, humedad, color, etc. La presente invención encuentra uso en el aumento del contenido de colágeno en la piel que se ha puesto en contacto con la composición de manera que la humedad de la piel mejora o aumenta, la formación de arrugas en la piel mejora o disminuye, la flexibilidad de la piel mejora o aumenta, el tono de la piel mejora o aumenta, el color de la piel se mejora o se normaliza, se mejoran, las estrías de la piel mejoran, disminuyen o se eliminan o la aspereza de la piel mejora o disminuye. En otros casos, las composiciones de la presente invención son útiles para la profilaxis o para impedir las afecciones cutáneas mencionadas anteriormente.

45 En algunos casos, las composiciones que se han descrito anteriormente se usan para aumentar la proliferación de células de la piel, y en particular fibroblastos de la piel. En algunos casos, las composiciones se aplican a la piel o heridas en la piel en una cantidad eficaz, que es la cantidad requerida para aumentar la proliferación de fibroblastos en el sitio de aplicación. Se contempla que al aumentar la proliferación de fibroblastos, las composiciones de la presente invención realzan o mejoran la cicatrización de heridas en un sujeto. También se contempla que al aumentar la proliferación de fibroblastos mediante aplicación tópica, las composiciones de la presente divulgación pueden mejorar los atributos de la piel dañada, tales como aspecto general, flexibilidad, suavidad, cantidad de arrugas, humedad, color, etc. En consecuencia, la composición de presente invención encuentra uso en el aumento del contenido de colágeno en la piel que se ha puesto en contacto con la composición de manera que se mejora o aumenta la humedad de la piel, mejora o disminuye la formación de arrugas en la piel, aumenta o mejora la flexibilidad de la piel, mejora o aumenta la suavidad de la piel, mejora o aumenta el tono de la piel, mejora o normaliza el color de la piel, las estrías de la piel mejoran, disminuyen o se eliminan o la aspereza de la piel mejora o disminuye.

55 En consecuencia, en algunos casos, la presente divulgación proporciona procedimientos para tratar sujetos que padecen una o más de las afecciones que se han descrito anteriormente. En algunos casos, los procedimientos comprenden poner en contacto al sujeto con una composición que comprende un extracto celular diferenciable como se ha descrito anteriormente, o cualquiera de las composiciones descritas con detalle anteriormente. En algunos casos, los procedimientos comprenden poner en contacto el tejido del sujeto con un extracto de huevo en condiciones tales que se incremente la expresión de un gen, en el que dicho gen se selecciona entre el grupo que consiste en colágeno 1, colágeno 3, VEGF-B, VEGF-C, TGF $\beta$ 2, TNF $\beta$ 3, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-D, IL-18, y

fibronectina. En algunos casos, los procedimientos comprenden poner en contacto el tejido del sujeto con un extracto de huevo en condiciones tales que la expresión de un gen disminuye, en los que dicho gen se selecciona entre el grupo que consiste en una metalopeptidasa de matriz, TGF $\beta$ 1, VEGF-A, elastina, IL1 $\beta$ , e IL 12. En algunos casos, la metalopeptidasa de matriz (MMP) se selecciona entre el grupo que consiste en MMP 14, 16, 17, 19, 20, 23, 25 y 28. En algunos casos, la presente divulgación proporciona procedimientos para tratar a un sujeto con una afección de la piel que comprende poner en contacto la piel de dicho sujeto con un extracto de huevo citoplásmico de pez o de anfibio en una cantidad eficaz, en los que dicha afección de la piel se selecciona entre el grupo que consiste en, úlceras, psoriasis, callosidades, verrugas, acné, rosácea, dermatitis, queratosis, carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas. En los casos preferentes, el extracto celular diferenciable es un extracto celular citoplasmático de pez o anfibio y se proporciona en una crema, gel, emulsión, pomada, aerosol, polvo o loción. En algunos casos, la presente invención proporciona composiciones que comprenden un extracto celular diferenciable para su uso en el tratamiento o para impedir cualquiera de las afecciones que se han desvelado anteriormente.

#### N. Terapia *ex vivo* e *in vivo*

En algunos casos, se contempla que los extractos se usen para el tratamiento *ex vivo* de células obtenidas a partir de un paciente. En resumen, las células se recuperan de un paciente, se expanden, se permeabilizan, se incuban con el extracto, se sellan y a continuación se usan para el tratamiento de un paciente. En este procedimiento, algunas de las propiedades de las células se podrían alterar o mejorar, incluyendo, pero no limitándose al alargamiento de los telómeros - los cromosomas terminales que protegen el ADN central contenido en el cromosoma que se acortan con cada división celular - renovando y alargando de ese modo el periodo de vida de la célula tratada. Los procedimientos preferentes se describen en el Ejemplo 3.

En algunos casos, los extractos se usan *in vivo* en los órganos y/o tejidos internos del paciente o células. En resumen, el extracto o sus componentes se podrían inyectar a la cavidad intraperitoneal, bañando de este modo la superficie de los órganos abdominales, que incluyen, pero no se limitan, los intestinos, hígado, bazo, páncreas, estómago y vejiga, induciendo de ese modo la cicatrización de heridas en estos órganos y tejidos o ayudando en la regeneración de las células a partir de las que se forman los órganos y/o tejidos.

También se contempla la introducción de células o extractos o componentes de los mismos en órganos y/o tejidos internos que incluyen, pero no se limitan a, músculo, cerebro, grasa, tejido conectivo, cartílago, páncreas, hígado, bazo, corazón y pulmones para inducir la formación celular *de novo* en tejidos y órganos y/o para rejuvenecer las células a partir de las que se forman los tejidos/órganos. La formación de células *de novo* ocurre de forma espontánea en organismos incluyendo seres humanos. La formación *de novo* de tejido linfóide local por células dendríticas que son las células presentadoras de antígenos profesionales más potentes (Ludewig B y col., 1998 J Exp Med).

La vida se manifiesta en el crecimiento. En las plantas, el crecimiento puede ser de dos tipos, heterótrofo y autótrofo. El crecimiento autótrofo usa material inorgánico para la nutrición. El crecimiento heterótrofo depende del material orgánico para la nutrición. Durante la germinación, las plántulas crecen por lo general de forma heterotrófica, pero una vez que una planta se convierte en fotosintética puede crecer de forma autótrofa - usando minerales del suelo y atmósfera y luz solar para la energía. Por lo tanto, durante la mayor parte de su vida, las plantas son autótrofas. Sin embargo, hay algunas plantas parásitas que crecen de forma heterotrófica, obteniendo material inorgánico de su huésped. En las plantas, el crecimiento es en serie, repetitivo y plástico, y las divisiones celulares contribuyen a la formación *de novo* de órganos en todo momento hasta la senescencia. En los animales, la división celular sirve para regenerar y mantener los tejidos y las poblaciones de células circulantes, y el crecimiento es repetitivo *de forma simultánea* y depende de la longitud de los telómeros que se acortan en cada división celular.

Esta enseñanza contempla el uso tanto de materiales orgánicos como de materiales inorgánicos contenidos o añadidos a extractos para nutrir, estimular y regular el crecimiento celular, la función y la formación *de novo* en todos los órganos y tejidos. Las semillas de plantas contienen materiales para el crecimiento heterotrófico y se contemplan para su uso en extractos para ayudar al crecimiento celular en seres humanos.

Ciertos animales tienen la capacidad de regenerar partes de su cuerpo después de una pérdida o lesión. De hecho, la regeneración de un órgano u otra estructura perdidos en lugar de simplemente llenar el vacío con tejido cicatrizal implica procesos que van desde una respuesta a la lesión y cicatrización de la herida hasta crecimiento, formación de patrones y diferenciación de nuevos tejidos similares a los que se produjeron durante el desarrollo embrionario. Con nuevas evidencias de la presencia de células madre en la mayoría de los órganos adultos, si no de todos, y de su capacidad para participar en la reparación de tejidos, el campo de la biología regenerativa ha asumido una relevancia médica mucho más extendida (Stocum, 1995, 2004). Si se examina la distribución filogenética de la capacidad regenerativa en diversos sistemas de órganos, parece que esta capacidad se ha perdido gradualmente en el curso de la evolución animal (Thouveny y Tassava, 1998; Sánchez Alvarado, 2000). La regeneración de miembros amputados en anfibios es uno de los sistemas modelo mejor estudiados y un paradigma útil para entender muchas características de la regeneración de órganos de vertebrados. Como un ejemplo de regeneración "epimórfica", este sistema incluye la desdiferenciación celular en los tejidos lesionados del muñón de extremidad y la proliferación de estas células para formar un blastema distal que experimenta patrones y crecimiento para restaurar las estructuras

de miembro faltantes. La cuestión de por qué las extremidades de los vertebrados filogenéticamente avanzados no se regeneran ha sido abordada por estudios con extremidades de anfibios anuros. La regeneración es excelente en las primeras etapas del desarrollo de las extremidades en anuros (ranas y sapos), pero disminuye gradualmente a medida que las larvas se aproximan a la metamorfosis (Dent, 1962). Los miembros de los anuros adultos son incapaces de regeneración completa.

Sin embargo, los anfibios urodelos (tritones y salamandras) comúnmente regeneran sus extremidades y a menudo otros órganos tales como colas, mandíbulas y partes del ojo a lo largo de sus vidas. Tales fenómenos regenerativos son muy raros entre reptiles, aves y mamíferos como adultos, lo que sugiere que la pérdida de capacidad regenerativa puede haber sido una parte adaptativa de la transición evolutiva hacia los tetrápodos más avanzados. Varios investigadores sugirieron que las células de diferenciación del músculo y otros tejidos en el miembro de los anuros pierden su capacidad de volver al estado proliferativo y contribuyen al rebrote de las extremidades. En consonancia con este punto de vista, se encontró que la regeneración y la morfogénesis aumentaban en las extremidades de las ranas adultas cuando la disociación de tejidos y la desdiferenciación celular aumentaban en los tejidos de los muñones por traumatismo adicional (Polezhaev, 1972). La plasticidad del estado diferenciado en las extremidades competentes para la regeneración y el potencial de las fibras musculares multinucleadas para desdiferenciarse y volver a entrar en el ciclo celular son en la actualidad áreas de investigación activas en el campo de la regeneración de las extremidades (Brockes y col., 2001; Brockes y Kumar, 2002).

La regeneración requiere interacciones epiteliales-mesenquimales en el tronco del miembro distal como las que impulsan el desarrollo embrionario de las extremidades, y también se ha estudiado la naturaleza cambiante del cierre de la herida después de la amputación de los miembros de anuros durante la transición de larvas a adultos. El cierre de los muñones en los mamíferos implica la contracción de la piel de espesor total y en ranas adultas implica una rápida formación de tejido conectivo debajo de la epidermis de la herida apical que cubre inicialmente la superficie cortada (Carlson, 1974). Tassava y Olsen (1982) sugirieron que la incapacidad de los vertebrados superiores para formar un epitelio funcional de la herida explica el potencial perdido para la regeneración. La interferencia con la formación distal de cicatrices en miembros amputados de mamíferos o ranas adultas con el fin de provocar la regeneración ha sido, en el mejor de los casos, un éxito marginal (véase la revisión de Stocum, 1996), pero la importancia de establecer condiciones adecuadas para las interacciones recíprocas entre el epitelio apical y las células mesodérmicas subyacentes es clara si una extremidad se tiene que regenerar. En las extremidades embrionarias, la señalización se produce entre el ectodermo apical y los factores de crecimiento de fibroblastos de células mesodérmicas adyacentes (FGF) y sus receptores. Galis y col., (2003) han sugerido que la razón para el fracaso de las extremidades de los vertebrados superiores para restablecer las interacciones del tejido funcional se debe a que la regeneración de los miembros solamente es posible cuando la extremidad se desarrolla como un módulo semiautónomo que no depende de las interacciones con estructuras transitorias como somitas.

El desarrollo de las extremidades de reptiles, aves y mamíferos comienza en el embrión temprano e implica la señalización de interacciones con diversas estructuras temporales vecinas, mientras que en el desarrollo de las extremidades en los anfibios se produce mucho más tarde en el desarrollo y no está acoplado a interacciones con estructuras transitorias. Los factores y las células del sistema inmunológico también pueden afectar a la capacidad regenerativa (Harty e col., 2003). El desarrollo de inmunidad adaptativa, que complementa mecanismos inmunitarios innatos más generales y primitivos y que permite que un organismo adquiera mecanismos de defensa altamente específicos contra microorganismos invasores, puede haber producido células inmunitarias y citoquinas cuya actividad en el tejido traumatizado es adversa a la desdiferenciación celular o la señalización requerida para iniciar la regeneración de las extremidades, de modo que la respuesta a la lesión en presencia de dicha inmunidad está dominada por la reparación tisular y la fibrosis en lugar de la regeneración (Mescher y Neff, 2005).

El origen de la inmunidad adaptativa durante la evolución que condujo a la restricción de la capacidad regenerativa es compatible con nuestro conocimiento de la filogenia inmune (Flajnik y col., 2003). Los invertebrados, que normalmente tienen capacidades para la regeneración bien desarrolladas, carecen por completo de inmunidad adaptativa. En cambio confían en una serie de defensas que constituyen un sistema inmunitario innato extremadamente eficaz. Los mecanismos subyacentes a la inmunidad adquirida o adaptativa aparecen primero en los vertebrados de mandíbula, haciéndose más eficaces en varios órdenes de peces y anfibios y altamente desarrollados en los homeotermos (Flajnik y col., 2003).

La presente enseñanza contempla aumentar la plasticidad y alterar el potencial de crecimiento de células y tejidos aumentando la desdiferenciación celular y la disociación tisular, permitiendo de este modo la generación *de novo* de células, tejidos y órganos. También se contemplan alteraciones de las respuestas inmunitarias por sustancias activas en los extractos.

## Ejemplos

### Ejemplo Comparativo 1

#### Células y Extractos celulares extracts

Las células NCCIT, Jurkat (clon E6-1) y 293T (Colección Americana de Cultivos Tipo, Bethesda, MD) se cultivan en RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO) con suero bovino fetal al 10 % (FCS), L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM y aminoácidos no esenciales (RPMI completo). Los fibroblastos Swiss-Albino de NIH3T3 (Colección Americana de Cultivos Tipo) se cultivan en medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM; Sigma) con FCS al 10 %, L-glutamina y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM. Las ESC de ratón se aíslan de masas de células más internas de blastocistos de la cepa sv129 y se siembran en capas alimentadoras irradiadas con radiación y en fibroblastos de ratón en medio de ESC (DMEM, FCS al 15 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM, aminoácidos no esenciales, penicilina/estreptomicina al 1 %) suplementado con 1.000 unidades/ml (10 ng/ml) de factor inhibitorio de leucemia recombinante (LIF; Sigma) en placas revestidas con gelatina. Antes de cosechar para la preparación de los extractos, las ESC se pasan y se cultivan en condiciones sin alimentador en RPMI que contiene 10 ng/ml de LIF.

Para preparar los extractos de NCCIT, las células se lavan en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y en tampón de lisis celular (HEPES 100 mM, pH 8,2, NaCl 50 mM,  $MgCl_2$  5 mM, ditiotretol 1 mM e inhibidores de proteasa), se sedimentan a 400 g, se vuelen a suspender en 1 volumen de tampón de lisis celular frío y se incuban durante 30-45 min en hielo. Las células se sonicán en hielo en alícuotas de 200  $\mu$ l usando un sonicador de pulso Labsonic-M equipado con una sonda de 3 mm de diámetro (B. Braun Biotech, Melsungen, Alemania) hasta que todas las células y los núcleos se lisan, de acuerdo con el criterio del microscopio. El lisado se sedimenta a 15.000 g durante 15 min a 4 °C para salir entre el material grueso. Se toman alícuotas del sobrenadante, se congelan en nitrógeno líquido y se almacenan. El lisado de  $95.583 \pm 10.966$  células NCCIT se usa para generar el extracto. Los extractos de ESC (25-30 mg/ml de proteína) se preparan del mismo modo a partir de cultivos de ESC adaptados por LIF. Los extractos de células 293T, Jurkat y NIH3T3 también se preparan como se mencionó anteriormente. Si fuera necesario, los extractos se diluyen con  $H_2O$  antes de su uso para ajustar la osmolaridad a  $\sim 300$  mOsm.

### Ejemplo Comparativo 2

#### Células madre de protuberancia de folículo piloso

Para aislar los folículos de vibrisas, el labio superior que contiene la almohadilla de vibrisas de un sujeto se corta y su superficie interna se expuso. En individuos humanos, en lugar de vibrisas se pueden usar pelos del cuero cabelludo o de otras partes del cuerpo con pelo. Las vibrisas o folículos fibrosos se diseccionan bajo un microscopio binocular. Las vibrisas se arrancan de la almohadilla tirando de ellas suavemente por el cuello con fórceps fino. Las vibrisas aisladas se lavaron en DMEM-F12 (GIBCO/BRL), que contenía B-27 (GIBCO/BRL) y un 1 % de penicilina/estreptomicina (GIBCO/BRL). Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron en un entorno exterior. La zona de la protuberancia folicular de la vibrisa contenía células que expresaban nestina. Las células se aislaron por exposición a anticuerpos anti-nestina fluorescentes bajo microscopía de fluorescencia. Las células aisladas se suspendieron en 1 ml de DMEM-F12 que contenía B-27 con un 1 % de metilcelulosa (Sigma-Aldrich), y  $20 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  D. FGF básico (bFGF) (Chemicon). Las células se cultivaron en placas de cultivo tisular de 24 pocillos (Coming) a 37 °C en una incubadora de cultivo tisular con un 5 % de  $CO_2/95$  % de aire. Después de 4 semanas, las células de la zona de la protuberancia forman colonias.

### Ejemplo Comparativo 3

#### Terapia *Ex vivo*

Las células a reprogramar *ex vivo* se lavan en PBS frío y en solución salina fría equilibrada con Hank sin  $Ca^{2+}$  ni  $Mg^{2+}$  (HBSS; Invitrogen, Gaithersburg, MD). Las células se volvieron a suspender en alícuotas de 100.000 células/100  $\mu$ l de HBSS, o múltiplos de los mismos, se colocaron en tubos de 1,5, ml y se centrifugaron a 120 g durante 5 min a 4 °C en un rotor basculante. Las células sedimentadas se suspenden en la 97,7 ml de HBSS frío, los tubos se colocan en un baño de  $H_2O$  a 37 °C durante 2 min y se añaden 2,3 ml de SLO (Sigma; 100 mg/ml de solución de reserva diluida a 1:10 en HBSS frío) hasta una concentración final de SLO de 230 ng/ml. Las muestras se incuban en posición horizontal en un baño de  $H_2O$  durante 50 min a 37 °C con agitación ocasional y se ponen en hielo. Las muestras se diluyen con 200 ml de HBSS frío y las células se sedimentan a 120 g durante 5 min a 4 °C. La permeabilidad que no se evalúa controlando la absorción de un dextrano conjugado con rojo Texas de 70.000 Mr (Molecular Probes, Eugene, OR; 50  $\mu$ g/ml) en una muestra separada 24 h después de volver a sellar y volver a sembrar las células en placas. La eficacia de la permeabilización en estas condiciones es  $\sim 80$  %.

Después de la permeabilización, las células a volver a reprogramar *ex vivo* se suspenden a 1.000 células/ $\mu$ l en 100 ml de extracto (o múltiplos de los mismos) que contienen un sistema de regeneración en ATP (ATP 1 mM, fosfato de creatina 10 mM, 25 mg/ml de creatina quinasa; Sigma), GTP 100  $\mu$ M (Sigma) y 1 mM de cada y trifosfato de nucleótido (NTP; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El tubo que contiene células se incubaba de forma horizontal durante 1 h a 37 °C en un baño con  $H_2O$  con agitación ocasional. Para volver a sellar las membranas plasmáticas, el extracto se diluye con  $CaCl_2$  2 mM que contiene RPMI y antibióticos, y las células se siembran a 100.000 células por pocillo de una placa de 48 pocillos. Después de 2 h, las células flotantes se retiran y las células se sembrarán en placas se cultivan en RPMI completo. Las células reprogramadas se pueden trasplantar de nuevo en un paciente.

**Ejemplo 4****Base de crema para su uso con extractos celulares**

- Agua - 78 %  
 Proteínas - 10 %  
 5 por ejemplo, Queratina, Filagrina, y/o Factores de crecimiento en cantidades traza (cantidades de  $\mu\text{M}$  -  $\text{mM}$  de EGF, IGF, IGFII, Insulina, Sustancia P, Defensinas, NGF)  
 Lípidos - 10 %  
 10 Escualina al 9 %, Ceras alifáticas al 12 %, Ésteres de esteroles al 33 %, Ésteres de diol al 7 %, Triglicéridos al 26 %, Esteroles libres al 9 %, Otros lípidos al 4 %.  
 Extracto celular o extracto de huevo o componentes de extractos - 2 %.

Una base de crema fabricada a partir de cualquier combinación de extractos celulares que contienen lípidos y/o proteínas y/o agua.

**Ejemplo 5****15 Preparación de extractos de huevo de pez**

- Los huevos frescos, sin fertilizar, de salmón (*Salmon salar*) obtenidos a partir de hembras en fase de reproducción (al final del otoño) se mantienen en hielo, y el extracto se prepara preferentemente de forma inmediata. Es posible liofilizar los huevos en un agente crioprotector (por ejemplo, ,2-propanodiol 1,5 M 1 y sacarosa 0,2 M) sin interrumpir la membrana del huevo. La congelación debería ser gradual ( $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Los huevos se deberían descongelar y mantener en hielo durante todo el procedimiento de preparación del extracto.

- Los huevos se lavan dos veces en HBSS o agua de mar con inhibidores de proteasa (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). La solución de lavado se retira y los huevos se lisan y se homogeneizan en un homogeneizador de vidrio Dounce enfriado previamente. El lisado se transfiere a tubos de centrifuga (5 ml) de polialómero Ultra Clear de Beckman a la vez que se edita la transferencia de cáscaras de huevo y se centrifuga durante 15 min a 15.000 g a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una ultracentrifugadora de Beckman usando un rotor SW55T1. De este modo se obtienen tres fracciones; fracción superior lipídica, fracción media citoplasmática, y una fracción de fondo que contiene cáscaras de huevo y restos nucleicos. La fracción media citoplasmática es el extracto recogido. Se espera que este extracto contenga la mayor parte de orgánulos citosólicos, incluyendo mitocondrias, lisosomas y peroxisomas, que debería ser claro y viscoso, y tener un tinte de color naranja. Se añaden inhibidores de proteasa (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de solución de reserva) y los extractos se mantienen a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- El fraccionamiento adicional del extracto citoplásmico es posible. La centrifugación a 100.000 g a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 60 minutos produce 2-3 fracciones, en las que la fracción citoplasmática superior/media contiene el citosol con retículo endoplasmático, SV y microsomas. El pH del extracto se mide con papel de tornasol, la concentración de proteína se mide con el ensayo de Bradford y la osmolaridad se mide con osmómetro.

- Los embriones de peces cebrá en la etapa media de blástula se recogen, el líquido se retira y se congelan a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para preparar el extracto, los embriones se descongelan en hielo, se lisan y se homogeneizan con un homogeneizador de vidrio Dounce en una pequeña cantidad de HBSS o agua de mar (preferentemente menos de un 50 % de líquido en v/v). El lisado se filtra a través de una tela de lino estéril y se centrifuga a 5.000 g a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos en un rotor SX4250 usando una centrifugadora X-22R de Beckman. El extracto citoplásmico (sobrenadante) se recoge y se añaden inhibidores de proteasa (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). El extracto se puede filtrar con Millipore (filtro estéril MilliQ de 0,22  $\mu\text{m}$ ). Los extractos se mantienen a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El pH del extracto se mide con papel de tornasol, la concentración de proteína se mide con el ensayo de Bradford y la osmolaridad se mide con osmómetro.

- Este procedimiento general es útil para la preparación de extractos de erizo de mar, gamba, huevos/huevas de pez o huevos de rana. Brevemente, se recogieron huevas de peces hembra grávidas poco después de que liberaran sus huevos en un programa de desove (hormona hCG inyectada (1 ml/kg) de 6 a 8 horas antes de la liberación del huevo, normalmente al amanecer (2 - 4 am) o de ranas grávidas. Las huevas/huevos se liofilizan o se congelan a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o se usan frescas. Las huevas se recogen de diferentes tipos de peces. Para el erizo de mar, se inyecta KCl 0,5 M alrededor de la boca para evocar el desprendimiento de huevos. El extracto se prepara a partir de huevos/huevas por trituración (tritador celular o homogeneización en Dounce) o centrifugación a diferentes velocidades para separar el citoplasma con todo el contenido, con/sin cáscaras de huevo (zona pelúcida), con/sin núcleo/citosol, con/sin lípidos. Se puede realizar un fraccionamiento adicional para aislar uno o más de ARNm, proteínas, péptidos pequeños, carbohidratos y lípidos. Los componentes principales de ácidos grasos en las huevas son ácido oleico, ácido linoleico y ácidos grasos omega-3.

- Después de la aplicación del protocolo mencionado anteriormente para extractos de huevo de salmón, los extractos de huevo de salmón presentaban una concentración de proteína sorprendentemente elevada que variaba de 100 - 380 mg/ml, pH entre 6,4 - 6,8 y una osmolaridad de aproximadamente 350 mOsm. Los extractos eran transparentes y viscosos y no filtrables (con un filtro MilliQ de 0,45  $\mu\text{m}$ ). La proteína en el extracto precipitó fácilmente tras la

adición de agua o soluciones hidratadas con baja capacidad de amortiguación debido al alto contenido de proteínas y pH bajo. Los extractos se pueden neutralizar a pH 7,0 mediante la adición de una solución alcalina (1-3 µl de NaOH 1 M/ml de extracto), con lo que es posible la dilución en agua y soluciones hidratadas. Los extractos de peces cebra presentaban una concentración de proteína que variaba de 23-26 mg/ml, pH entre 6,4 - 6,8 y una osmolaridad entre 80-150 mOsm. Los extractos eran transparentes y no viscosos, se podían filtrar y diluir fácilmente en agua a todas las diluciones.

### Ejemplo 6

#### Ensayo de toxicidad de extractos

Los extractos con pH bajo y que contienen ciertas sustancias pueden ser tóxicos para las células. La toxicidad de cada lote se debe someter a ensayo en cada tipo de célula que se va a reprogramar. Las células se cosechan y se lavan dos veces en HBSS. Aproximadamente 100.000 células se sedimentan y se ponen a suspender en 100 µl de extracto y se incuban en un baño de agua a 37 °C durante 1 hora. Las diluciones de los extractos se pueden someter a ensayo para evaluar la supervivencia celular en extractos de concentración de proteína, pH y osmolaridad variables. De manera óptima, la concentración de proteína debería ser superior a 25 mg/ml, el pH debería estar cerca de 7,2 y la osmolaridad próxima a 280 mOsm. Las células y el extracto se incuban en pocillos con medio normal (según se adapte al tipo de célula elegido) durante 24 horas, y la morfología de las células se inspecciona mediante microscopía. Las células se recogen, se tiñen y se hace el recuento de las células viables. Si más de un 50 % de las células son no viables después del cultivo, el extracto se considera tóxico.

Después de la aplicación del protocolo mencionado anteriormente, las células 293T fueron viables durante al menos 3 semanas después de su incubación con extractos de huevos de salmón y embriones de peces cebra con concentraciones de proteína que variaban de 24 - 380 mg/ml, a osmolaridades entre 140 - 350 y pH 6,9 - 7,7. A osmolaridad inferior a 140 mOsm, las células morían.

La morfología celular de las células reprogramadas con extractos de huevo de salmón o extractos de embriones de pez cebra cambió después de aproximadamente 3 días. Las células 293T se vuelven más redondeadas, y algunas poblaciones de células comienzan a crecer en el blastoma como esferas. Estos cambios son persistentes y se pueden observar hasta 21 días (finalización del experimento), aunque en ciertas condiciones parece que los cambios se invierten hacia la morfología normal de 293T después de 2 semanas. Después del cultivo de células 293T normales con extracto añadido a medio normal (RPMI-1640 con FCS al 10 % y extracto al 0,2 %), se pueden observar cambios similares en morfología como se observa para células reprogramadas cultivadas en medio normal. Además, las células cultivadas con extractos de huevo de salmón en particular presentan un aumento de la tasa de crecimiento en comparación con las células normales. Cuando a las células se las priva de alimento (RPMI-1640 con FCS al 0,5 %), la tasa de crecimiento disminuye en forma significativa para las células tratadas sin extracto, y la morfología de las células cambia ligeramente. Para las células privadas de alimento cultivadas con extractos (extracto al 0,2% en medios de inanición), los cambios son más pronunciados. En este caso, la mayoría de las poblaciones celulares crecen en blastómeros como esferas, y las esferas se desprenden del vaso de cultivo y flotan en los medios, en los que continúan creciendo. De forma interesante, la desaceleración en la tasa de crecimiento se invierte en las células cultivadas con extracto añadido al medio de privación de alimentos.

### Ejemplo 7

#### Ensayos de expresión genética de extractos

Para verificar la expresión del extracto de los genes a estudiar en células reprogramadas, la RT-PCR se puede realizar en ARN aislado de extractos. El ARN se puede aislar a partir de extractos por el procedimiento de elección, por ejemplo usando un kit Qiagen RNeasy Plus (Qiagen). El ARN se cuantifica mediante espectrofotómetro y se almacena a -80 °C. Para la síntesis de ADNc se usa 1 µg de ARN. La síntesis de ADNc se puede realizar, por ejemplo, usando el kit de síntesis de ADNc de iScript (Bio-Rad), seguido de PCR realizada con los cebadores de elección. Para cada conjunto de cebadores sometidos a ensayo se incluyen controles positivos. Los productos de PCR se ejecutan en un gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio y las bandas se visualizan con lámpara de UV.

Después de la aplicación del protocolo mencionado anteriormente, los productos de PCR de extractos obtenidos mediante cebadores específicos para genes humanos de interés tal como se observa en geles de agarosa se compararon con bandas obtenidas a partir de líneas de células humanas de control positivo que previamente se había mostrado que expresaban genes investigados en el presente documento (por ejemplo, OCT4, NANOG, SOX2, UFT1, GAPDH, REX1 (también conocido como ZFP42), LMN-A, LMN-B1, OXT2, AC133, APL y STELLA). Las células NCCIT de control positivo mostraban una única banda con el tamaño esperado para cada gen sometido a ensayo, mientras que los productos de PCR ni de los extractos de huevo de salmón ni de los extractos de embriones de peces cebra dan bandas en el gel. Estos resultados indican que los extractos no expresan las variantes génicas humanas detectadas con los cebadores usados.

Los datos de micromatriz de fibroblastos estimulados 8 días con extracto presentan una regulación positiva/negativa de una serie de genes en comparación con las células no tratadas. Estos genes incluyen, pero no se limitan a, varios genes que previamente se ha demostrado que están implicados en el proceso que está relacionado con la

5 cicatrización de heridas/regeneración celular. Los ejemplos de genes regulados con el extracto son; proteínas de matriz celular extra tales como colágeno I y III, fibronectina y elastina; enzimas tales como metaloproteinasas de matriz; factores de crecimiento tales como factor de crecimiento obtenido a partir de plaquetas (PDGF), factor beta de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ , factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleuquinas (IL), el marcador de diferenciación celular de músculo liso actina y quimioquinas tales como el ligando (CXCL) de quimioquina (motivo C-X-C).

Los ejemplos de regulación genética en fibroblastos de piel humanos (hSF) después de tratamiento con extracto se proporcionan en la Tabla 1.

Tabla 1

COL11A1	49	<b>negativa</b>	colágeno, tipo XI, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL12A1	5,2	<b>positiva</b>	colágeno, tipo XII, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL13A1	6,8	<b>positiva</b>	colágeno, tipo XIII, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL14A1	17,8	<b>positiva</b>	colágeno, tipo XIV, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL15A1	25,4	<b>positiva</b>	colágeno, tipo XV, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL16A1	45	<b>positiva</b>	collagen, tipo XVI, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL17A1	132,4	<b>negativa</b>	colágeno, tipo XVII, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL18A1	31,8	<b>negativa</b>	colágeno, tipo XVIII, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL19A1	96,3	<b>negativa</b>	colágeno, typeXIX, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL1A1	303,9	<b>positiva</b>	colágeno, tipo I, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL1A2	20,1	<b>positiva</b>	colágeno, tipo I, alfa 2 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL20A1	53,1	<b>negativa</b>	colágeno, tipo XX, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL21A1	83,5	<b>negativa</b>	colágeno, tipo XXI, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL22A1	4,4	<b>negativa</b>	colágeno, tipo XXII, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL23A1	21,3	<b>negativa</b>	colágeno, tipo XXIII, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL25A1	4	<b>negativa</b>	colágeno, tipo XXV, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL3A1	207	<b>positiva</b>	colágeno, tipo III, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL4A1	8,9	<b>negativa</b>	colágeno, tipo IV, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL4A4	7,4	<b>negativa</b>	colágeno, tipo IV, alfa 4 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL4A5	6,4	<b>negativa</b>	colágeno, tipo IV, alfa 5 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL4A6	91,6	<b>negativa</b>	colágeno, tipo IV, alfa 6 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL5A1	193,7	<b>positiva</b>	colágeno, tipo V, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL5A3	13,8	<b>negativa</b>	colágeno, tipo V, alfa 3 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL6A1	17,6	<b>positiva</b>	colágeno, tipo VI, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL6A2	6,1	<b>negativa</b>	colágeno, tipo VI, alfa 2 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL6A3	35,9	<b>positiva</b>	colágeno, tipo VI, alfa 3 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL8A1	9,2	<b>positiva</b>	colágeno, tipo VIII, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL8A2	5,1	<b>negativa</b>	colágeno, tipo VIII, alfa 2 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL9A1	28,2	<b>negativa</b>	colágeno, tipo IX, alfa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL9A2	15,6	<b>negativa</b>	colágeno, tipo IX, alfa 2 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COL9A3	13,7	<b>negativa</b>	colágeno, tipo IX, alfa 3 [ <i>Homo sapiens</i> ]
COLQ	22,7	<b>negativa</b>	subunidad de cola similar a colágeno de acetilcolinesterasa asimétrica [ <i>Homo sapiens</i> ]
ELN	130,9	<b>negativa</b>	elastina [ <i>Homo sapiens</i> ]
FN1	4,7	<b>positiva</b>	fibronectina 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]

ES 2 613 965 T3

(continuación)

HABP2	4,4	<b>negativa</b>	proteína 2 de unión a hialuronano [ <i>Homo sapiens</i> ]
HABP4	8	<b>positiva</b>	proteína 4 de unión a hialuronano [ <i>Homo sapiens</i> ]
HAS2	4,9	<b>positiva</b>	hialuronano sintasa 2 [ <i>Homo sapiens</i> ]
HYAL1	4,1	<b>negativa</b>	hialuronoglucosaminidasa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
HYAL3	3,5	<b>positiva</b>	hialuronoglucosaminidasa 3 [ <i>Homo sapiens</i> ]
HYAL4	25,6	<b>negativa</b>	hialuronoglucosaminidasa 4 [ <i>Homo sapiens</i> ]
ACTA2	20,4	<b>positiva</b>	actina, alfa 2, músculo liso, aorta [ <i>Homo sapiens</i> ]
EGF	<b>No enumerado</b>		Factor de crecimiento epidérmico (beta-urogastrona) [ <i>Homo sapiens</i> ]
TGFB1	19,7	<b>negativa</b>	factor de crecimiento transformante, beta 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
TGFB1/1	9,1	<b>positiva</b>	factor de crecimiento transformante, beta 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
TGFBI	107,1	<b>positiva</b>	factor de crecimiento transformante, beta-inducido, 68 kDa [ <i>Homo sapiens</i> ]
TGFBR2	20,9	<b>positiva</b>	factor de crecimiento transformante, beta receptor II (70/80 kDa) [ <i>Homo sapiens</i> ]
TGFBR3	50,5	<b>positiva</b>	factor de crecimiento transformante, beta receptor III [ <i>Homo sapiens</i> ]
TGIF1	20,8	<b>positiva</b>	homeocaja 1 del factor inducido por TGFB [ <i>Homo sapiens</i> ]
VEGFA	95,9	<b>negativa</b>	factor A de crecimiento endotelial vascular [ <i>Homo sapiens</i> ]
VEGFB	82	<b>positiva</b>	factor B de crecimiento endotelial vascular [ <i>Homo sapiens</i> ]
VEGFC	11,6	<b>positiva</b>	factor C de crecimiento endotelial vascular [ <i>Homo sapiens</i> ]
PDGFD	19,3	<b>positiva</b>	factor D de crecimiento derivado de plaquetas [ <i>Homo sapiens</i> ]
PDGFRA	64,1	<b>positiva</b>	receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, polipéptido alfa [ <i>Homo sapiens</i> ]
PDGFRB	66,9	<b>positiva</b>	receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, polipéptido beta [ <i>Homo sapiens</i> ]
IL1B	20,7	<b>negativa</b>	interleuquina 1, beta [ <i>Homo sapiens</i> ]
IL1R1	3,5	<b>positiva</b>	receptor de interleuquina 1, tipo I [ <i>Homo sapiens</i> ]
MMP14	3,6	<b>negativa</b>	metalopectidasa 14 de matriz (insertada en membrana) [ <i>Homo sapiens</i> ]
MMP16	15	<b>negativa</b>	metalopectidasa 16 de matriz (insertada en membrana) [ <i>Homo sapiens</i> ]
MMP17	6,5	<b>negativa</b>	metalopectidasa 17 de matriz (insertada en membrana) [ <i>Homo sapiens</i> ]
MMP19	3,6	<b>negativa</b>	metalopectidasa 19 de matriz [ <i>Homo sapiens</i> ]
MMP2	4,1	<b>positiva</b>	metalopectidasa 2 de matriz (gelatinasa A, 72 kDa, gelatinasa, colagenasa de tipo IV de 72 kDa) [ <i>Homo sapiens</i> ]
MMP20	8,4	<b>negativa</b>	metalopectidasa 20 de matriz [ <i>Homo sapiens</i> ]
MMP23A	9	<b>negativa</b>	metalopectidasa 23A de matriz (pseudogén) [ <i>Homo sapiens</i> ]
MMP25	11,4	<b>negativa</b>	metalopectidasa 25 de matriz [ <i>Homo sapiens</i> ]
MMP28	3,1	<b>negativa</b>	metalopectidasa 28 de matriz [ <i>Homo sapiens</i> ]

(continuación)

TNF	No enumerado		Factor de necrosis tumoral (superfamilia de TNF, miembro 2) [ <i>Homo sapiens</i> ]
IFNG	No enumerado		interferón, gamma [ <i>Homo sapiens</i> ]
IL12A	No enumerado		interleuquina 12A (factor 1 estimulante de linfocitos citolíticos naturales, factor 1 de maduración de linfocitos citotóxicos, p35) [ <i>Homo sapiens</i> ]
IL12B	55,3	negativa	interleuquina 12B (factor 2 estimulante de linfocitos citolíticos naturales, factor 2 de maduración de linfocitos citotóxicos, p40) [ <i>Homo sapiens</i> ]
IL18	39,6	positiva	interleuquina 18 (factor inductor de interferón gamma) [ <i>Homo sapiens</i> ]
IL23A	No enumerado		interleuquina 23, subunidad alfa p19 [ <i>Homo sapiens</i> ]
CXCL1	No enumerado		ligando 1 de quimioquina (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa) [ <i>Homo sapiens</i> ]
CXCL10	No enumerado		ligando 10 de quimioquina (motivo C-X-C) [ <i>Homo sapiens</i> ]

**Ejemplo 8**

**Reprogramación de células con extractos de huevo o embrión de pez**

5 El tipo celular de elección (por ejemplo, células 293T humanas y células madre adiposas (sometidas a ensayo con ASC)) se cosecha, se mantiene en hielo, y se lava dos veces en HBSS enfriado con hielo. De aproximadamente 100.000 a 500.000 células se sedimentan mediante centrifugación (300 g, 4 °C durante 10 minutos). Las células se pueden permeabilizar con estreptolisina-O (SLO) por incubación durante 50 minutos en un baño de agua a 37 °C antes de la reprogramación, sin embargo, no es necesario para la reprogramación de efectos de extractos de huevo o embrión de pez. Después de incubación con SLO, las células se lavan en HBSS enfriado con hielo, se centrifugan y el exceso de líquido se retira a partir del sedimento. Las células se vuelven a suspender en 100 ul de extracto por 10 100.000 células y se incuban durante 1 hora a 37 °C en un baño con agua. Se siembran aproximadamente 100.000 en pocillos con medio completo de elección. Si se ha realizado permeabilización con SLO, las células se cultivan en medio con CaCl<sub>2</sub> 2 mM durante 2 horas después de la reprogramación para volver a sellar las membranas celulares. El medio se debería cambiar 2-12 horas después de la reprogramación. Para evaluar el alcance de la 15 permeabilización con SLO, usar microscopía epifluorescencia para células incubadas durante 50 min en 0 o 100 ng/ml de SLO con 50 ug/ml de dextrano conjugado con rojo Alexia (10.000 Mr, o 70.000 Mr de dextrano) para verificar la permeabilización y el nuevo sellado celular.

20 Las células se cultivan en pocillos hasta que la proliferación permite la división a recipientes más grandes. Las células separadas. Las células se dividen según sea apropiado por el tipo celular, pero no se les permite que lleguen a ser confluentes. Los sedimentos para análisis genético se deberían recoger semanalmente y la morfología se debería evaluar mediante microscopía a de contraste de fase en cada pasaje. Las células se pueden cultivar siempre y cuando se desee, pero para evaluar la duración de los efectos de reprogramación, sugiere un mínimo de 40 días.

25 Además, las células se pueden reprogramar mediante incubación en medios potenciados con extractos de huevo o embrión de pez. Las células se reprograman mediante la adición de un 0,4 % de extracto a medio completo normal (10 % de FCS) o s medio de privación de alimento (0,5 % de FCS). Las células de elección se cultivan hasta una confluencia de un 50 %, y el medio normal se sustituye con medio completo o medio de privación de alimento que contiene un 0,4 % de extracto. Las células se dividen según sea apropiado con medio que contenga extracto. El medio recién preparado con extractos se debería añadir a las células al menos dos veces a la semana si se separan 30 menos de dos veces a la semana. Los sedimentos para análisis genético se deberían recoger semanalmente y la morfología se debería evaluar mediante microscopía a de contraste de fase en cada pasaje. Las células se pueden cultivar siempre y cuando se desee, pero para evaluar la duración de los efectos de reprogramación, sugiere un mínimo de 40 días.

35 Después de seguir los protocolos que se han enumerado anteriormente, las células reprogramadas con extractos de huevo de pez o de embrión de pez cebra, o cultivadas en medios con extractos añadidos, se cosechan y el ARN se aísla. Las células 293T reprogramadas o normales se incubaron en cualquiera de medio completo (RPMI-1640 con

5 un 10 % de FCS) con/sin extractos (0,2 %), o en medio de privación de alimentos (RPMI-1640 con un 0,5 % de FCS) con/sin extractos. La RT-PCR en tiempo real se realizó para estudiar la regulación positiva y negativa de genes marcadores de diferenciación. Después de 7 días, se observa una regulación positiva pronunciada en el gen de OCT 4 en células tratadas con extracto, y los cuales todavía se observan después de 17 días. La expresión genética se calculó con el gen constitutivo GAPDH como referencia de expresión genética y se puede observar en las Tablas 2 y 3. Los valores representan el aumento de la expresión genética en células tratadas con respecto a células sin tratar cultivadas en medio normal. Los valores dados son para células tratadas durante 17 días, 17 días después de la reprogramación.

Tabla 2

FCS al 10 % medio normal	Extracto de huevo de salmón en p/0,2 %	Extracto de embrión de pez cebra en p/0,2 %	Extracto de huevo de salmón en p/reprogramado	Extracto de embrión de pez cebra en p/reprogramado	Extracto de huevo de salmón en p/reprogramado, cultivado con un 0,2 % de extracto	Extracto de embrión de pez cebra en p/reprogramado, cultivado con un 0,2 % de extracto
OCT4	59,78	100,58	34,98	18,20	82,26	90,12
NANOG	3,83	4,66	1,30	0,70	3,82	1,58
SOX2	5,58	6,16	4,24	8,36	3,67	2,41

Tabla 3

Medio de Privación de FCS al 0,5 %	Células 293T, sin tratar	Extracto de huevo de salmón en p/0,2 %	Extracto de embrión de pez cebra en p/0,2 %	Extracto de salmón de p/reprogramado	Extracto de embrión de pez cebra en p/reprogramado	Extracto de huevo de salmón en p/reprogramado, cultivado con un 0,2 % de extracto	Extracto de embrión de pez cebra en p/reprogramado, cultivado con un 0,2 % de extracto
OCT4	0,20	11,69	6,45	5,17	12,95	9,32	2,78
NANOG	0,14	0,51	0,41	0,37	1,10	0,32	0,14
SOX2	0,63	4,34	1,67	2,66	2,47	4,49	1,12

Los resultados muestran una regulación positiva (18 a 100 veces) del gen OCT-4 en todas las células tratadas con extractos en comparación con las células sin tratar. Los cambios en la expresión genética de NANOG son más discretos, con una regulación positiva que varía de ninguna a 5 veces. Para la expresión genética de SOX2, la regulación positiva observada variaba de 2 a 8 veces con respecto a la basal.

- 5 En las células privadas de alimento cultivadas sin extractos, todos los genes OCT4, NANOG y SOX2 están regulados en forma negativa (0,2 - 0,6 veces del crecimiento normal de las células 293T en medio normal). La adición de un 0,2 % de extracto al medio de privación de alimento rescata el perfil de expresión genética y regula de forma positiva la expresión genética de OCT4 de 5 a 13 veces con respecto a la expresión normal de las células 293T y una and regulación positiva de aproximadamente 100 veces de las células 293T privadas de alimento, sin tratar. Lo mismo no se observa para la expresión genética de NANOG, en la que el efecto de regulación negativa de la privación de alimento no se rescata. Para la expresión genética de SOX2, se observa un rescate similar al de OCT4, aunque no tan notable (hasta 4 veces de regulación positiva). En estos experimentos, parece que los extractos de huevo de salmón proporcionan el mayor rescate y regulación positiva de los genes asociados a la desdiferenciación.
- 10
- 15 Las replicaciones de estos experimentos de reprogramación por triplicado proporcionaron resultados que confirman que los extractos de huevo de salmón regulan de forma positiva los genes asociados con desdiferenciación, lo que indica un aumento de "pluripotencialidad" de las células 293T.

La reprogramación se realizó con tres procedimientos diferentes:

- 20
1. Reprogramación como se describe en los procedimientos, seguido por cultivo celular normal;
  2. Reprogramación como se describe seguido por cultivo en medio complementado con un 0,4 % de extracto de huevo de salmón (el mismo que el usado para la reprogramación); y
  3. Células normales no reprogramadas, cultivadas en medio complementado con un 0,4 % de extracto de huevo de salmón (el mismo que el usado para la reprogramación).

25 En los tres procedimientos proporcionan cambios en la morfología y la expresión genética en células, pero a diferentes niveles y se produce en diferentes momentos. Los cambios en la expresión genética se observan al mismo tiempo que se observan los cambios morfológicos, variando desde el día 5 después de la reprogramación hasta el día 28 después de la reprogramación. Parece que esto depende del procedimiento usado: la reprogramación (procedimientos 1 y 2) puede proporcionar cambios más rápidos que la no reprogramación y cultivo en medios complementados (procedimiento 2).

30 Las células reprogramadas con cambios morfológicos y cambios de expresión genética como se muestra a continuación, se etiquetaron adicionalmente con anticuerpos de OCT4 y NANOG y se visualizaron con anticuerpos secundarios fluorescentes en un microscopio confocal para verificar el aumento de la expresión de estos genes.

35 Los resultados de los ejemplos mostrados en las Tablas 4 y 5 que siguen a continuación, en los que los números representan el número de veces de regulación positiva o negativa de los genes OCT4, NANOG y SOX2 asociados con la desdiferenciación en comparación con células 293T normales. Los números inferiores a uno indican regulación negativa, y los números superiores a uno indican regulación positiva. Los efectos de regulación positiva grande están marcados en color azul en la tabla. La regulación positiva que se produce el día de ASC indica células madre adiposas, solamente se pueden detectar cambios menores en la expresión genética. Esto está de acuerdo con los experimentos realizados con diferentes extractos (observaciones sin publicar, Taranger y col., 2006).

40

**Tabla 4**

REPROGRAMACIÓN DE ASC	DÍA	OCT4	NANOG	SOX2
Reprogramación A1, medio normal	5	0,257	0,071	
	11	0,74	0,47	3,2
	19	0,78	1,17	ND
	40	1,27	0,22	ND
Reprogramación A2, medio con un 0,4 % de extracto	5	0,88	0,17	2,81
Reprogramación B1, medio normal	5	0,78	0,79	ND
	11	0,37	0,07	1,11

(continuación)

REPROGRAMACIÓN DE ASC	DÍA	OCT4	NANOG	SOX2
	18	2,25	1,91	ND
	35	1,27	0,12	ND

Tabla 5

REPROGRAMACIONES DE CÉLULAS 293T	DÍA	OCT4	NANOG	SOX2
Reprogramación A1, medio normal				
	11	24,99	382,08	2,73
	25	2,77	19,54	7,01
	34	20,5	228,13	1,44
	42	1,31	0,82	3,27
<b>293T</b>	<b>DÍA</b>	<b>OCT4</b>	<b>NANOG</b>	<b>SOX2</b>
Reprogramación A2, medio con un 0,4 % de extracto				
	11	0,92	5,92	0,93
	25	0,9	0,76	0,99
	34	1,34	123,61	1,84
	42	8,14	2,69	6,55
<b>293T</b>	<b>DÍA</b>	<b>OCT4</b>	<b>NANOG</b>	<b>SOX2</b>
Reprogramación B1, medio normal				
	27	2,22	2,74	1,69
<b>293T</b>	<b>DÍA</b>	<b>OCT4</b>	<b>NANOG</b>	<b>SOX2</b>
Reprogramación, B2, medio con un 0,4 % de extracto				
	27	2,51	3,28	1,80
Reprogramación C1, medio normal				
	5	0,41	0,53	1,84
	11	0,61	0,56	1,73
	20	8,65	14,83	1,89
	28	125,70	18,03	84,69
<b>293T</b>	<b>DÍA</b>	<b>OCT4</b>	<b>NANOG</b>	<b>SOX2</b>

(continuación)

REPROGRAMACIONES DE CÉLULAS 293T	DÍA	OCT4	NANOG	SOX2
Reprogramación C2, medio con un 0,4 % de extracto				
	5	0,92	0,60	1,61
	11	0,65	1,10	1,17
	20	10,12	45,30	1,84
	28	2,25	0,79	5,61

Los estudios presentados en el presente documento proporcionan protocolos apropiados para la preparación de extractos de huevo de pez, ensayos de caracterización y toxicidad de tales extractos, protocolos para la reprogramación celular con los extractos, así como resultados de cambios inducidos por los extractos en células. Los resultados incluyen cambios morfológicos presentados como imágenes microscópicas, así como cambios en la expresión genética en las células tratadas presentadas como datos de PCR en tiempo real. La reprogramación de las células 293T se realizó 17 veces individuales, con cambios de morfología observados en 12 de las 17 y reprogramaciones. Las alteraciones en la expresión genética se observaron en 8 de 12 estudiadas. Las alteraciones en la morfología se correlacionan con cambios en la expresión genética, es decir, los cambios en la morfología se producen al mismo tiempo que los cambios de expresión genética en las células, y esto se verifica mediante etiquetado con inmunofluorescencia de genes de desdiferenciación en las células reprogramadas. La reprogramación de células madre adiposas se realizó 6 veces, y los cambios morfológicos solamente se observaron en 1 de estas. Solamente se pueden detectar cambios menores en los cambios de expresión genética en estas células reprogramadas.

### Ejemplo 9

#### Cambios que morfológicos en células tratadas con extractos

La morfología de las células reprogramadas con extractos de huevo de salmón o extractos de embriones de pez cebra cambia después de aproximadamente 3 días. Las células 293T se hacen más redondas, y algunas poblaciones de células comienzan a crecer en esferas similares a blastoma. Estos cambios son persistentes, y se pueden observar hasta 21 días (experimento terminado), aunque en ciertas condiciones, parece que los cambios se invierten hacia una morfología normal de 293T después de 2 semanas. Después del cultivo de células 293T normales con extracto añadido a medio normal (RPMI-1640 con un 10 % de FCS y un 0,2 % de extracto), se pueden observar cambios similares en la morfología como sede para las células reprogramadas cultivadas en medio normal. Además, las células cultivadas con extractos de huevo de salmón en particular tienen un aumento de la tasa de crecimiento en comparación con las células normales. Cuando las células se privan (RPMI-1640 con un 0,5 % de FCS), la tasa de crecimiento disminuye de forma significativa (no se muestra) para las células tratadas sin extracto, y la morfología de las células cambia ligeramente. Para las células privadas de alimento cultivadas con extractos (0,2 % de extracto en medio de privación de alimento), los cambios son más pronunciados. En el presente documento, la mayoría de las poblaciones celulares crecen en esferas similares a blastómeros, y las esferas se desprenden del recipiente de cultivo y flotan en el medio, cuando se mantienen en crecimiento.

De forma interesante, la deceleración de la tasa de crecimiento se invierte en células cultivadas con extracto añadido al medio de privación de alimento. Las reprogramaciones satisfactorias normalmente crecen en grupos grandes (> 2 mm de diámetro) visibles en los recipientes celulares a simple vista.

### Ejemplo 10

#### Alteraciones en patrones de crecimiento en células incubadas con extractos

Se sembraron 500.000 células 293T en placas de cultivo redondas de tamaño medio y se incubaron en medio normal o el medio con adición de extracto de medio de privación de alimento. Las células se cosecharon después de 24, 41, y 68 horas, se hizo el recuento y se calcularon las tasas de crecimiento. Los resultados se presentan en las Tablas 6 y 7.

ES 2 613 965 T3

Tabla 6

Calcular n.º de divisiones celulares:							
Número de células (Ne) = Número inicial de células (No)12^ número de divisiones (g)							
<b>g = (log Ne - log No)/0,301</b>							
					24 h	41 h	68 h
	60314-24	060313 -0			min/generación (T(horas) x 60)/g =		
<b>g = 24H</b>	log Ne	log No			<b>Min/gen =</b>		
<b>2,3704</b>	517000	100000		293norm	607,4923	768,2811	693,4967
<b>2,018123</b>	405000	100000		293Tnorm+LE	713,5343	824,4037	922,3786
<b>1,613692</b>	306000	100000		293Tnorm+ZE	892,3634	824,9083	689,2529
<b>2,208113</b>	462000	100000		293Tpriv	652,1406	1072,826	1695,597
<b>2,170141</b>	450000	100000		293Tpriv+LE	663,5513	989,671	669,0016
<b>2,3704</b>	517000	100000		293Tpriv+ZE	607,4923	1252,756	1228,08
	60315-41	060313 - 0					
<b>g = (log Ne - log No)/0,301</b>							
<b>g = 41H</b>	log Ne	log No					
<b>3,201953</b>	920000	100000		293norm			
<b>2,983975</b>	791000	100000		293Tnorm+LE			
<b>2,98215</b>	790000	100000		293Tnorm+ZE			
<b>2,29301</b>	490000	100000		293Tpriv			
<b>2,485675</b>	560000	100000		293Tpriv+LE			
<b>1,96367</b>	390000	100000		293Tpriv+ZE			
	60314-68	060313 - 0					
<b>g = 68H</b>	log Ne	log No					
<b>5,883229</b>	5900000	100000		293norm			
<b>4,423347</b>	2145000	100000		293Tnorm+LE			
<b>5,919453</b>	6050000	100000		293Tnorm+ZE			
<b>2,406232</b>	530000	100000		293Tpriv			
<b>6,09864</b>	6850000	100000		293Tpriv+LE			
<b>3,322259</b>	1000000	100000		293Tstatv+ZE			

(continuación)

<b>Calcular n.º de divisiones celulares:</b>							
<b>Tiempo de generación:</b>							
T: Tiempo transcurrido entre No (casi al comienzo del crecimiento exponencial)							
y (casi al final del crecimiento exponencial de Ne)							
<b>Curva de crecimiento:</b>							
LogN.ºcélulas							

Tabla 7

Condición	0H	24H	41H	68H				
293norm	5	2,783541	2,88552	2,841044				
293Tn+LE	5	2,853415	2,91614	2,964909				
293Tn+ZE	5	2,950542	2,916406	2,838379				
293Tpriv	5	2,814341	3,030529	3,229323				
293Ts+LE	5	2,821874	2,995491	2,825427				
293Ts+ZE	5	2,783541	3,097867	3,089227				

- 5 Se observan cambios en la tasa de crecimiento, cuando las células privadas de alimento crecen mucho más lentamente que las células en medio normal a través del estudio. Este efecto se rescata por adición de medio de huevo de salmón después de 42 horas de cultivo. Las células cultivadas en medio normal crecen más rápidamente con extracto de embrión de pez cebra y extracto de huevo de salmón que las demás células durante las primeras 24 horas. Véanse las Figuras 1-3.

10 **Ejemplo 11**

**Aumento de la cicatrización de heridas con extractos de huevos de salmón**

**Objetivo del estudio:** Investigar los efectos de extracto de huevos de salmón desarrollado en la cicatrización de heridas en la piel de ratones.

**PROCEDIMIENTOS:**

- 15 **Sumario:** Se indujeron dos tipos de heridas en la piel dorsal de ratones. Una herida por escisión de 1 cm de diámetro se indujo en el lado izquierdo del dorso de cada ratón (n = 12 repetido 3x), a y se indujo una herida por incisión de 2 cm de longitud en el lado derecho del dorso en paralelo a la espina dorsal. La mitad de los ratones (seleccionados de forma aleatoria) se trataron con 30 µl de extracto de huevos de salmón después de la inducción de la herida y cada 3 días durante 12 días. El grupo de control no recibió tratamiento. Las heridas en todos los ratones (tratados y controles) se pulverizaron con Band-Aid líquido del día 1 en una de las 3 repeticiones, pero esto no influyó en las diferencias observadas entre los ratones de control y los tratados tal como se observa en los 3 experimentos (con/sin apósito pulverizado).

25 En cada experimento, los ratones se dividieron en 3 jaulas, cada una con 2 controles y 2 animales tratados. El proceso de cicatrización de la herida se controló durante 12 días, con mediciones tomadas que incluyen áreas de la herida, días hasta la cicatrización completa (reepitelialización y pérdida de la costra), y tamaño de la cicatriz resultante. Las biopsias se tomaron en el día uno y en el día 12 para análisis adicionales, y se hicieron fotografías de las heridas de forma regular para documentar la evolución de la cicatrización.

**Materiales**

Ratones: machos albinos A/J o NMRI.

- 30 Etanol para esterilización de la piel antes de la inducción de heridas.

Tijeras y microtijeras quirúrgicas pequeñas, cuchillas quirúrgicas y pinzas.

Extracto de de salmón, lote LE4, preparado como se ha descrito anteriormente.

Gas isoflurano: Isoflurano Vnr 506949 de FORENE, lote 22397VA, caducidad 10-2009 (Abbott, Solna, Suecia)  
Vaporizador: Isotec 5 de Datex-Ohmeda

5 Nitrógeno líquido para muestras de biopsia.

PFA al 4 % (en PBS) para muestras de biopsia.

Cámara digital para tomar fotografías de las heridas y la piel durante su cicatrización.

Molde redondo de 1 cm de diámetro para tinción en el tamaño de la herida en animales.

#### Diseño del estudio

10 **Animales.** Los ratones NMRI o A/J macho endogámicos sanos (estudios separados), que pesaban entre 25 g y 35 g se obtuvieron en el centro veterinario del Institute of National Public Health, Oslo, Noruega. Los ratones se aclimataron durante una semana antes de los experimentos, y se alojaron en jaulas de polipropileno con alimento normal y agua a voluntad, y se etiquetaron en el oído (1-4 en cada jaula) una semana antes del inicio de los experimentos. Los animales se pesaron de forma periódica antes y después de los experimentos. Los ratones se anestesiaron antes de la imposición de las heridas experimentales. Las intervenciones quirúrgicas se realizaron en condiciones estériles usando gas isoflurano (oxígeno + isoflurano mezclados en vaporizador). Los animales se observaron de cerca para cualquier infección; los que mostraron presentaban signos de infección se separaron y se excluyeron del estudio. Un estudio de toxicidad aguda se realizó para los extractos como se describe en cualquier parte de la presente patente. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Noruega.

15  
20 **Actividad de cicatrización de heridas.** Se usaron modelos de escisión e incisión de heridas para evaluar la actividad de cicatrización de heridas de los extractos de huevo de salmón. Cada animal recibió una herida por escisión en el lado derecho del lomo, y una herida por incisión en el lado izquierdo del lomo. Las heridas fueron inducidas el día 1 y el estudio terminó el día 12.

25 **Heridas por escisión e incisión.** Cada ratón se sometió a una herida por escisión (Morton JJP, Malone MH. Evaluation of vulnerary activity by an open wound procedure in rats. Arch Int Pharmacodyn. 1972; 196: 117-126) y una herida de incisión (Ehrlich HP, Hunt TK. Effect of cortisone and vitamin A on wound healing. Ann Surg. 1968; 167: 324-328). Los ratones se anestesiaron antes de la creación de las heridas, con gas isoflurano (con máscara, detalles del sistema a continuación). El pelaje dorsal del animal se rasuró con una máquina eléctrica para cortar el pelo y se hizo el contorno del área de la herida por escisión se esbozó en el lado izquierdo de la parte posterior de los animales con un marcador permanente impermeable. Se creó una herida o escisión de 1 cm de ancho (área circular = 0,785 cm<sup>2</sup>) de espesor total de la piel (aproximadamente 1 mm) a lo largo de las marcas con pinzas dentadas, una cuchilla quirúrgica y tijeras puntiagudas, dejando toda la herida abierta. En el lado derecho de la columna vertebral, se realizó una incisión paravertebral longitudinal de 2 cm de longitud a través de la piel y tejido cutáneo en el lomo. Los grupos de animales experimentales se trataron con extractos acuosos de huevo de salmón (30 µl), aplicados por vía tópica a la herida cada tercer día. Las heridas del grupo de control se dejaron sin tratar.

30  
35  
40 Los parámetros estudiados fueron cierre de la herida, tamaño de la herida, tamaño de la cicatriz, tiempo de epitelización e histología (parámetros morfológicos de la piel). Las mediciones de las áreas de la herida del modelo de herida por escisión se tomaron el día 1, 5, 9 y 12 después de la herida inicial usando papel transparente y un marcador permanente. Las heridas de cada ratón se fotografiaron diariamente con una cámara digital (véanse los detalles a continuación). El periodo de epitelización se calculó como el número de días necesarios para que las heridas no llegaron a tener costras.

45 **Biopsias.** El día 1, la piel extirpada en la creación de la herida por escisión se mantuvo como una biopsia de piel normal, permitiendo que cada animal fuera su propio control en un análisis de biopsia posterior. La mitad de la biopsia se fijó en PFA al 4 %, la otra se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido. En el modelo de herida por escisión e incisión, se hizo una escisión del tejido de granulación formado en la herida el día 12 después del sacrificio de los animales por dislocación cervical por gas CO<sub>2</sub>. Las heridas por escisión e incisión se retiraron de forma quirúrgica a lo largo de las marcas iniciales de inducción de la herida. La mitad de la biopsia se fijó en PFA al 4 %, la otra mitad se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido para su análisis posterior.

50 **Análisis histopatológico de biopsias.** La mitad de los tejidos de cicatrización obtenidos en el día 12 de todos los animales en el modelo de herida por escisión e incisión se fijó en paraformaldehído (4 % en tampón de fosfato sódico) durante 2 horas a temperatura ambiente y se almacenó a 4 grados Centígrados, se hizo una sección en un criostato antiparalela a la superficie de la piel. Las secciones se tiñeron con H & E y los parámetros de la cicatriz, incluyendo el grosor del tejido de granulación, se midieron en el microscopio.

Procedimiento convencional para tinción con H & E. En resumen, las secciones criostáticas de 10 µm de biopsias de piel de ratón (en portaobjetos SuperFrost Plus) se volvieron a hidratar (a partir de etanol de absoluto a etanol de un 96 % y un 70 %) antes de colorear con hematoxilina (7 minutos) (Sigma 51275 SOLUCIÓN DE HEMATOXILINA AC. DE MAYER), se lavaron el agua corriente (5 min), coloreada con eosina (1 min) (Sigma HT110116 EOSINA Y SOLUCIÓN ALCOHÓLICA), se aclararon brevemente en agua y se deshidrataron (de etanol de un 70 % a un 96 % a etanol absoluto seguido por 2 x 5 min en xilol). Las secciones se montaron directamente a partir de xilol con Eukitt (Sigma 03989-100ML EUKITT(R) QUICK-HARDENING MOUNTING ME-DI).

Las secciones de las biopsias de piel de ratón teñidas con H & E tomadas en el día 1 (en el momento de la inducción de la herida) y en el día 12 (después de la cicatrización) de los animales tratados y de control representativos, se estudiaron en el microscopio óptico, se tomaron imágenes digitales con los objetivos de 4x, 10x, 20x y 40x y se realiza heridas del espesor de la piel y los parámetros de la cicatriz a partir de las imágenes digitales.

**Inmunoetiquetado de secciones de criostato de biopsias de piel de ratón.** Las secciones de las biopsias de la herida por escisión tomadas el día 1 y el día 12 de los controles representativos tratados con el extracto y sin tratar se inmunoetiquetaron doblemente tal como se ha descrito previamente (Boulland y col., Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the wide-spread corelease of multiple neurotransmitters. J Comp Neurol. 13 de diciembre de 2004; 480 (3): 264-80) con anticuerpos frente a cualquiera de NANOG (policlonal de conejo, Abcam) y calbindina (ratón, Abcam) u OCT3/4 (policlonal de conejo, Santa Cruz) y calretinina (cabra, Chemicon) para buscar un aumento de la expresión de células madre (como se indica por la presencia de NANOG y OCT3/4) en las heridas curadas.

## RESULTADOS

Tasas de cicatrización de las heridas tratadas con extracto de huevo de salmón en comparación con los controles no tratados.

**Aspecto visual de heridas cutáneas tratadas y sin tratar.** Los resultados indican una cicatrización de las heridas más rápida en los animales tratados con el extracto (las imágenes no se muestran), con diferencias significativas en los días 9 y 12. Además, los tamaños de las heridas se redujeron más rápidamente en los animales tratados con extracto, con diferencias significativas al día 5 y 9. Véase la Figura 4.

**Tinción con Hematoxilina-Eosina de biopsias de piel para examen histológico (secciones embebidas en parafina o criostato).** Las biopsias tomadas de la piel eliminada para formar la herida por escisión en el día uno y las biopsias comparables de la misma área tomadas el día 12 de 6 animales se seccionaron con criostato, se tiñeron con H & E y se tomaron imágenes de microscopía y se analizaron. Morfológicamente, las secciones de biopsias de piel normal a partir del día 1 de los grupos control y animales tratados eran similares, con medidas iguales de los parámetros de la piel. Al día 12, el tejido cicatricial, en particular la organización de colágeno, parecía más desorganizada en los animales de control en comparación con los animales tratados con el extracto.

Tabla 8

	Espesor total de la piel (µm)	Espesor de la epidermis (µm)	Espesor de la dermis (µm)	Diámetro de la herida/cicatriz (µm)	Distancia entre folículos pilosos (µm)
<b>Controles</b>					
Día 1	391	15	340	10000	254
Día 12	1154	63	838	1913	144
<b>Tratado</b>					
Día 1	389	17	326	10000	218
Día 12	989	46	780	2113	157

Las mediciones (promedio de 3 mediciones independientes por sección) se tomaron de la siguiente manera: el espesor epidérmico se midió desde el estrato germinado (queratinocitos basales) hasta el estrato córneo. El espesor dérmico se midió desde debajo del estrato germinado hasta el subcutis (tejido adiposo por debajo de la dermis). El espesor total de la piel se midió como espesor combinado de la epidermis y la dermis. El diámetro de la cicatriz en el día 12 se midió entre las lengüetas de cicatrización de heridas a ambos lados del tejido cicatricial, y se comparó con el diámetro de la herida por escisión del día 1 (1 cm). La distancia entre los folículos pilosos se midió entre los centros de las papilas del cabello de los pelos adyacentes (proximal a la cicatriz en el día 12).

Las mediciones muestran que hay menos varianza en espesor de la cicatriz, diámetro, espesor epidérmico y dérmico en los animales tratados en comparación con los controles no tratados. Los animales tratados con el extracto presentaban un espesor epidérmico más normal (más cercano al espesor epidérmico tal como se mide en los mismos animales en el día 1), y la distancia entre los folículos pilosos recién formados proximales a la cicatriz se distribuían de forma más uniforme (más similar a la distribución del folículo piloso en la piel normal en el día 1), mientras que los folículos pilosos de la piel cicatrizada en los animales de control estaban más desorganizados y se distribuían con una distancia más pequeña entre los folículos pilosos en comparación con la piel normal.

En resumen, los datos muestran que los animales tratados con extracto tienen una cicatriz más fina de un 41 % (espesor total de la piel en el centro de la cicatriz) en comparación con los controles no tratados, y el epitelio recién formado en la piel cicatrizada es un 148 % más delgado y la nueva dermis un 7 % más delgada en los animales tratados en comparación con los controles no tratados. Además, el diámetro entre los nuevos folículos pilosos es un 16 % más próximo a la distancia preoperatoria en los animales tratados en comparación con los controles no tratados.

**Inmunoetiquetado de secciones de criostato de biopsias de piel de ratón.** Las secciones de las biopsias de herida por escisión tomadas el día 1 y el día 12 de los controles representativos tratados con el extracto y sin tratar se inmunoetiquetaron doblemente como se ha descrito anteriormente (Boulland y col.) con anticuerpos frente a cualquiera de NANOG (policlonal de conejo, Abcam) y calbindina OCT3/4 (policlonal de conejo, Santa Cruz) y calretinina (cabra, Chemicon) para buscar una mayor expresión de las células madre (como se indica por la presencia de NANOG y OCT3/4) en las heridas cicatrizadas.

OCT3/4 es un marcador de células madre embrionarias y otras, encontrado predominantemente en el núcleo. La tinción de OCT4 (verde) se detectó en la capa basal de la epidermis (proliferación de queratinocitos) (hallazgo novedoso). Los queratinocitos interfoliculares en cultivo se transfectar previamente con OCT-4, lo que dio como resultado un aumento de la expresión de Sox-2, Nanog, Uft1 y Rex-1.

A menudo la expresión de NANOG sigue la expresión de OCT4 en células madre. El etiquetado de NANOG se detectó en la base de folículos pilosos (células madre del pelo) así como en células migratorias a lo largo de la lengua de cicatrización de la herida al día 12 (novedad encontrada).

La CALRETININA es una proteína de unión al calcio que está presente en la capa celular complementaria del folículo piloso humano. La tinción de la calretinina se observó a lo largo de los folículos pilosos tal como se esperaba.

La CALBINDINA se encuentra en el núcleo y el citoplasma de los queratinocitos epidérmicos (más en el núcleo que en el citoplasma). Después de hacer la herida, los niveles de calbindina en el núcleo disminuyen durante aprox. 10 días después de la herida. El etiquetado de la calbindina se observó en los queratinocitos (epidermis y la capa alrededor de los folículos pilosos).

Se necesitará un análisis adicional que use apilamientos en Z y transformación de Fourier con microscopio confocal para buscar diferencias entre las heridas tratadas y los controles no tratados.

## Ejemplo 12

### Reprogramación de fibroblastos de piel humana y células HEK

#### Subcultivo de células hsF (Fibroblastos de piel humana)

Medio completo para hsF

500 ml de DMEM F-12 (+ Glutamax)  
50 ml (10 %) de FCS (Suero Bovino Fetal - inactivado con calor)  
5 ml (1 %) de PenStrep

Medio de privación de alimento para hsF

500 ml de DMEM F-12 (+ Glutamax)  
5 ml (1 %) de PenStrep

Cultivar las células en matraces grandes (162 cm<sup>2</sup>) - aproximadamente 1 mill de células por matraces grandes en la confluencia, o en cubreobjetos en pocillos para reprogramación. (Las células hsF usadas eran de la ACCT).

#### Subcultivo de células hsF:

1. Aclarar la capa celular dos veces con 10 - 15 ml de PBS para retirar todas las trazas de suero.
2. Añadir 2 ml de solución de Tripsina-EDTA hasta que la capa celular se disperse (5 - 7 minutos).
3. Añadir min 4 ml de medio y aspirar las células mediante pipeteo suave.
4. Proporción de subcultivo de 1:2 - 1:4; Añadir 2 - 3 ml de la suspensión celular al matraz y medio recién

preparado hasta un total de 25 ml. Subcultivar las células de 1:2 a 1:4 cada 2 a 3 días - por ejemplo, 1:4 dos veces a la semana.

#### Congelación del sedimento celular:

1. Preparar medio congelado reciente:
  - 5 a. Medio normal con FCS al 20 % y DMSO al 10 %
2. Seguir el protocolo mencionado anteriormente (subcultivo) hasta el punto 3; a partir de ese momento
3. Transferir células a un tubo Nunc de 50 ml y centrifugar a 300 g (1500 rpm), 10 min 4 °C.
4. Volver a suspender las células hasta 1 millón por 1 ml de medio congelado y añadir alícuotas de 1 ml a criotubos Nunc.
- 10 5. Congelar las células en caja Mr. Frosty con isopropanol a -80 °C durante la noche (-1 °C/min).
6. Transferir a un tanque de nitrógeno.

#### Preparar sedimentos para aislamiento de ARN

Seguir el protocolo de subcultivo hasta el punto 3; a partir de ese momento

1. Transferir células a un tubo Nunc de 50 ml y centrifugar a 300 g (1500 rpm), 10 min a 4 °C.
- 15 2. Lavar las células en un ml de PBS enfriado con hielo por millón de células y centrifugar a (300 g, 10 minutos a 4 °C).
3. Volver a suspender el sedimento en la misma cantidad de PBS y añadir 1 ml a un tubo Eppendorf para sedimentos de ARN.
4. Centrifugar a 300 x g 10' a 4 °C.
- 20 5. Aspirar el PBS.
6. Mantener el sedimento en hielo y congelar instantáneamente en N<sub>2</sub> líquido.
7. Transferir a un congelador a -80 °C.

#### Reprogramación de hsF en cubreobjetos, incluyendo SLO

25 **Objetivo:** reprogramar las células con un extracto libre de material nuclear para alterar la expresión genética, morfología y elementos de crecimiento y estudiar cambios en el estado de diferenciación.

30 **Materiales:** Células hsF cultivadas en placas de 24 pocillos en cubreobjetos (aproximadamente 100.000 células sembradas por pocillo en medio de privación de alimento aproximadamente 5 días antes y aproximadamente 50.000 células sembradas por pocillo en medio normal aproximadamente 3 días antes); Extracto de huevo de salmón; Incubación en medio para control; 1 x PBS; Solución Salina Equilibrada con Hanks sin Ca<sup>2+</sup> (HBSS) a 4 °C; TE para disgregar las células hsF del matraz; solución de reserva de SLO de 100 µg/ml diluida a 1:100 en HBSS; ATP (solución de reserva 200 mM en agua); GTP (solución de reserva 10 mM en agua); Fosfocreatina (solución de reserva 2 M en agua); Creatina quinasa (5 mg/ml de solución de reserva en agua); Agua MQ tratada en autoclave; Baño de agua a 37 °C; medio enriquecido con CaCl<sub>2</sub> (2 mM); la solución de reserva de CaCl<sub>2</sub> 100 mM se prepara mezclando 1,67 g CaCl<sub>2</sub> con 15 ml de agua destilada y se filtra de forma estéril. La concentración 2 mM de CaCl<sub>2</sub> se prepara por ejemplo, mezclando 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 100 mM con 2450 µl de medio de reprogramación.

35 **Procedimiento:** Lavar las células dos veces en 1 x PBS enfriado con hielo (1 ml). Lavar las células dos veces en HBSS frío (1 ml). Calentar las muestras previamente en una incubadora, 37 °C, 2 - 3 min y retirar la HBSS. Añadir 110 µl de HBSS y 90 µl de SLO (hasta una concentración final de SLO de 450 ng/ml) y mezcla. Añadir 200 µl de HBSS a pocillos de control sin SLO. Incubar en incubadora 30 min, inclinar la placa cada 10 min. Retirar el SLO (mantener uno paralelo cuando SLO permanece en el pocillo). Preparar el extracto para la reprogramación: Una reacción de reprogramación contiene 250 µl de extracto (para 50 - 100K células).

40 Preparar el sistema de generación de ATP, mantener en hielo: mezclar ATP, GTP, creatina quinasa, fosfocreatine en una proporción de 1:1:1:1, mantener en hielo. Añadir 12,5 µl de sistema de generación de ATP por reacción al extracto. Añadir 250 µl de extracto de huevo de salmón (con sistema de generación de ATP). Asegurarse de que el extracto cubre las células de objetos. Mezclar inclinando la placa. Incubar en incubadora 60 min, inclinar la placa cada 10 min. Aspirar el extracto (200 µl) y añadir medio enriquecido con Ca a cada pocillo (aproximadamente 1500 µl). Incubar durante 2 h. Comprobar en el microscopio si las células se han unido a los cubreobjetos. Si es así, retirar el medio que contiene Ca y añadir medio completo (aproximadamente 500 µl). Incubar a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. Evaluar las células dentro de las 24 horas del cultivo. Microscopía de contraste de fases. Separar las células antes de alcanzar la confluencia. Los cubreobjetos se movieron a nuevos pocillos un día después de la reprogramación, y algunos cubreobjetos se tripsinaron para moverlos a frascos pequeños. Dado que las células no se disgregan, todo el cubreobjetos se movió a la botella.

#### Resultados - reprogramación de hsF

Experimentos de reprogramación de RPE (medio de privación de alimentos) y RPF (medio normal).

**Cambios en la expresión genética**

**Tabla 9:** Número de veces de regulación positiva de los genes de OCT4 y NANOG regulados por el desarrollo, con respecto a GAPDH, tal como se evalúa mediante qPCR

	<b>OCT4</b>	<b>NANOG</b>
<b>RPE 1 y 2</b>	150,71	10,14

5 **Cambios morfológicos de las células.** Después de la reprogramación, los cultivos celulares se evaluaron mediante microscopía de contraste de fases y se compararon con células normales.

10 Un día después de la reprogramación, una población de las células supervivientes parecían células hSF normales, mientras que una subpoblación de células presentaban una morfología alterada. Estas células aparecen más largas/más estiradas que las células normales y algunas (especialmente las de los medios de privación de alimentos) presentaron vesículas/cuerpos circulares en el citoplasma. Sobrevivieron más células del medio de privación de alimentos que el medio normal.

15 Desde el día 12 hasta el día 22 después de la reprogramación (el experimento terminó el día 22), las células que todavía estaban unidas a los cubreobjetos presentaban una morfología inusual, con un núcleo más largo y más distinto con "ramificaciones"/"espolones" finos y células con una forma diferente a la de las células normales. Una subpoblación de células (principalmente células privadas de alimento) todavía presentaban vesículas/cuerpos circulares dentro del citoplasma. Como no se espera la reprogramación completa de todas las células en cada experimento (Taranger y col., 2005), la subpoblación de células que presentan una morfología alterada probablemente representa a las células reprogramadas que son responsables de las alteraciones de la expresión genética detectadas por qPCR.

20 **Inmunofluorescencia.** Las células se fijaron en cubreobjetos en el día 7 después de la reprogramación. El etiquetado con inmunofluorescencia se realizó básicamente como se ha descrito anteriormente para secciones de tejido (Boulland y col., 2004). En resumen, las células cultivadas en cubreobjetos se fijaron en PFA al 4 % (TA durante 30 min), se lavaron en PBS, se bloquearon con etanolamina 1 M, se lavaron en 3 x PBS, se incubaron previamente en solución de bloqueo (1 hr a TA), se incubaron con anticuerpos primarios frente a OCT 3/4 (Santa Cruz) (1:200) en solución de incubación (3 hrs a TA), se aclararon en 3 x PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios Alexa 488 acoplados con fluorescencia (1:2000) (Molecular Probes) (1 hr a TA) y por último se aclararon en 3 x PBS. Para teñir los núcleos, se añadió DAPI (1:1000) se añadió al segundo hasta el último aclarado. Los cubreobjetos se montaron con reactivo Antivahò ProLong Gold (Molecular Probes) y se tomaron imágenes con un microscopio de fluorescencia (Olympus) o microscopio confocal (Zeiss).

30 La tinción de OCT4 se observó en el citoplasma de la mayoría de las células, un etiquetado más débil se observó en las células reprogramadas en comparación con el control normal, que presentaba una tinción muy débil. La tinción de Hoechst se observó en los núcleos de células normales, que se solapaban adicionalmente con la tinción de OCT4 en el citoplasma de las células reprogramadas. Las células se evaluaron para infección para asegurar que la tinción de Hoechst citoplasmática no estaba causada por micoplasma sino más bien por una expresión real de la reprogramación.

**Subcultivo de células HEKa (Queratinocitos Epidémicos Humanos - adulto)**

Sistemas de Cultivo de Queratinocitos de Cascade Biologics  
EXTENDED-LIFESPAN SYSTEMS  
Medio Basal Medio EpiLife®

40 Suplemento de Crecimiento HKGS (S-001-5)  
Reactivo de Subcultivo Tripsina /EDTA (R-001-100)  
Reactivo de Subcultivo Neutralizador de Tripsina (R-002-100)  
Antibióticos (después de reprogramación) Gentamicina/Anfotericina B (R-015-10)  
esperanza de vida esperada de duplicaciones de población de 35-45 de HEKa (C-005-5C)

45 Medios completos para HEKa  
500 ml de Medio EpiLife  
5 ml de HKGS (Suplemento de Crecimiento de Queratinocitos Humanos)  
Después de reprogramación: 1 ml de Gentamicina/Anfotericina (GA).

Cultivar las células en matraces de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> - aproximadamente 10 mill células en confluencia.

50 **Subcultivo de células HEKa**

1. Aclarar las células rápidamente con 3 ml de Tripsina/EDTA.

2. Añadir 1 ml de Tripsina/EDTA recién preparado e incubar hasta que las células se dispersen (8-10 min).
3. Añadir 3 ml de solución de Neutralizador de Tripsina y transferir las células a un tubo estéril de 15 ml. Repetir con una cantidad adicional de 3 ml de Neutralizador de Tripsina adicional.
4. Centrifugar a 180 x g durante 7 minutos.
5. Volver a suspender el sedimento celular y sembrar nuevos recipientes de cultivo con  $2,5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>.
6. Cambiar los medios en las células después de 48 horas
7. Cambiar el medio cada dos días hasta que el cultivo sea confluyente en aproximadamente un 50 %.
8. Cambiar el medio cada día hasta que el cultivo sea confluyente en aproximadamente un 80 %.

**Congelación del sedimento celular:**

7. Preparar medio congelado reciente:
  - a. Medio normal añadido con FCS al 10 % y DMSO al 10 %
8. Seguir el protocolo mencionado anteriormente (subcultivo) hasta el punto 4.
9. Lavar las células con PBS (180 x g, 7 min)
10. Volver a suspender el sedimento celular hasta 1 millón por 1 ml de medio congelado y añadir alícuotas de 1 ml a criotubos.
11. Congelar las células en caja Mr. Frosty con isopropanol a -80 °C durante la noche (-1°C/min).
12. Transferir a un tanque de nitrógeno.

**Preparar sedimentos para aislamiento de ARN:**

Seguir el protocolo de subcultivo hasta el punto 4; a partir de ese momento

8. Volver a suspender hasta 1 millón por 1 ml de PBS y añadir 1 ml a un tubo Eppendorf para sedimentos de ARN.
9. Centrifugar a 300 x g 10' a 4 °C.
10. Aspirar el PBS, mantener el sedimento en hielo y congelar instantáneamente en N<sub>2</sub> líquido.
11. Transferir a un congelador a -80 °C.

**Reprogramación de células HEKa (sin SLO)**

**Objetivo:** reprogramar las células con un extracto libre de material nuclear para alterar la expresión genética, morfología y elementos de crecimiento y estudiar cambios en el estado de diferenciación.

Las células HEKa usadas para el experimento se cultivaron en sus medios normales (EpiLife con HGKS y como alternativa GA al 1 % [después de la reprogramación]). La reprogramación "simulada" se realizó como control (las células experimentan el procedimiento de reprogramación en medio normal sin extracto añadido) y las células **HEKa** normales se cultivaron en paralelo como control negativo.

Las células 293T se reprogramaron en el mismo experimento, que también incluía una reprogramación simulada y 1 matraz de células 293T normales como controles. Las células 293T se cultivan en sus medios normales (RPMI con PS al 1 %).

**Materiales:** 1 matraz de células HEK; 1 matraz de células 293T; Extracto (extracto de huevo de salmón); Incubación en medio para control; medio RPMI (293T); Medio EpiLife (HEK); 1x PBS; Solución Salina Equilibrada con Hanks sin Ca<sup>2+</sup> (HBSS) a 4 °C; TE para disgregar las células HEK del matraz; solución de TN (Neutralización de Tripsina); ATP (solución de reserva 200 mM en agua); GTP (solución de reserva 10 mM en agua); Fosfocreatina (solución de reserva 2 M en agua); Creatina quinasa (5 mg/ml de solución de reserva en agua); NTP (solución de reserva 25 mM); Agua MQ tratada en autoclave; matraces de 75 cm<sup>2</sup>; 15 ml, tubos de centrifugadora de 1,5 ml enfriados a 4 °C; Rotor de cubo oscilante para tubos de 1,5 ml, y para tubos de 15 ml; Baño de agua a 37 °C.

**Procedimiento:**

1. Cosechar las células HEK - lavar con 1 ml de TE, aspirar e incubar con 3 ml de TE durante 5-10 min. Transferir las células en tubos de 15 ml y centrifugar a 200 x g, 10 min a 4 °C. (Cosechar las células 293T - lavar con PBS, añadir 10 ml de medio RPMI, disgregar las células y transferirlas a un tubo de 50 ml).
  - a. Lavar una vez en 30 ml de PBS enfriado con hielo y una vez en 10 ml de HBSS enfriada con hielo
  - b. Volver a suspender las células hasta 500.000 por 1 ml de HBSS
2. Añadir 500 000 células en cada tubo de reprogramación
  - a. Centrifugar a 1200 rpm, 5 min 4 °C en un rotor de SW
  - b. Retirar la HBSS
3. Preparar el extracto para reprogramación

- a. Preparar sistema de generación de ATP, mantener en hielo: mezcla ATP, GTP, creatina quinasa, fosfocreatina en una proporción de 1:1:1:1, mantener en hielo. + NTP 0,5 mM por reacción
  - b. Añadir 30 µl de sistema de generación de ATP por reacción
4. Añadir extracto (con sistema de generación de ATP), 500 ul para 500.000 células por tubo.
- 5 a. Cubrir los tubos con parafilm e incubar durante 60 min en baño de agua a 37 °C. Mover las células rápidamente dos veces durante la incubación.
5. Añadir un tubo de reprogramación por matraz con medio.
6. Incubar a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %.

10 Evaluar las células en las 24 horas de cultivo. Microscopía de contraste de fases. Separar las células antes de alcanzar la confluencia.

**Resultados: reprogramación de HEKa**

Experimento de reprogramación de RPH.

**Cambios en la expresión genética:**

15 **Tabla 10:** Número de veces de regulación positiva de los genes de OCT4 y NANOG regulados por el desarrollo, con respecto a GAPDH, tal como se evalúa mediante qPCR

	<b>OCT4</b>	<b>NANOG</b>
<b>RPH simulado d13</b>	1,29	1,26
<b>RPH3 d13</b>	4,13	13,45

**Cambios morfológicos de las células:**

Después de la reprogramación, los cultivos celulares se evaluaron mediante microscopía de contraste de fases y se compararon con células normales.

20 En el procedimiento de reprogramación sobrevivieron menos células incubadas con extracto que células de control simulado. Algunas de las células reprogramadas mostraban vesículas/cuerpos circulares dentro del citoplasma y posiblemente núcleos más grandes y menos definidos. Algunas de las células mostraban una morfología atípica con pequeñas "puntas" que se parecían a podocitos sobresaliendo de la membrana plasmática y con una forma general diferente a la de las células normales.

25 Inmunofluorescencia

Las células se fijaron en cubreobjetos el día 9 después de la reprogramación. El etiquetado de inmunofluorescencia se realizó como se ha descrito para las células hSF.

30 Las células HEK se inmunoetiquetaron para OCT4 (mismo procedimiento y anticuerpo que para las células hSF) y los núcleos identificaron mediante tinción de Hoechst en un microscopio de fluorescencia. Las células HEK normales presentaban una tinción de OCT4 y de Bill en los núcleos, mientras que los núcleos de una subpoblación de células HEK re programadas con extracto de huevo de salmón estaban más fuertemente teñidas con OCT4 de manera evidente, de acuerdo con los resultados de qPCR que muestran una regulación positiva de OCT4 en células de la misma reprogramación. La tinción de Hoechst se superponían con la tinción de OCT4 en los núcleos de la mayoría de las células, y la tinción de OCT4 era especialmente fuerte en los nucleolos de las células reprogramadas.

35 Los controles negativos (anticuerpo primario omitido) no presentaban tinción de OCT4 mientras que los núcleos se teñían normalmente con Hoechst. Cuando se observaron las células se usaron ajustes idénticos para el microscopio y capturar imágenes digitales.

**Ejemplo 13**

**Preparación de extracto de huevo de salmón o trucha**

40 Este ejemplo describe la preparación de extractos de LEX a partir de salmón fresco o huevos/huevos de trucha enviados en hielo durante la noche desde la piscifactoría. Los huevos que han estado en tránsito en hielo > 48 horas se descartan. Si los huevos no se pueden preparar el día de llegada, los huevos se pueden almacenar a -20 °C hasta 12 meses. Los extractos se preparan usando una ultra centrifugadora Avanti J-26 XP con un rotor JLA 8.1000 y tubos de 6 x 1000 ml (polipropileno, n.º 363678 con revestimiento).

El día antes de la preparación de los extractos, el equipo de vidrio y acero inoxidable se esteriliza en autoclave. Se preparan diez litros de PBS / NaCl al 0,9 % y se colocan en una cámara fría. Se preparan cinco litros de Buffodine (50 ml en NaCl al 510,9 %).

5 El día de la extracción, el rotor se enfría previamente colocando el rotor en una centrifugadora con los 6 contenedores y programando la centrifugadora (velocidad 2000 g, tiempo 30 min, temperatura 4 °C e "inicio"). El siguiente equipos se coloca en la cámara frigorífica: trituradora de patatas de metal, tamices metálicos, embudos, pinza o pinzas, vasos de precipitados de vidrio de 3 l, 1 l y 500 ml (tubos: tubos Eppendorf estériles (esterilizados en autoclave), tubos/contenedores de 50 ml, tira de tubo de 200 µl, Buffodine y NaCl enfriado con hielo para el lavado, sal marina para el equipo de lavado, cajas de hielo para la preparación, agujas estériles (14 G) y jeringas (50+ ml) para extraer el extracto de los tubos de centrifuga. Los revestimientos también se colocan en cubos del rotor en la estantería.

15 Los materiales se manipulan en una habitación fría y los huevos, homogenado y extracto se mantienen en hielo en todo momento. Los huevos se lavan en Buffodine durante 10 minutos (Buffodine a 1:100 en NaCl al 0,9 %) y se escurren. Los huevos se enjuagan 4 x en NaCl. El tamiz con huevos se drena bien entre lavados. Los huevos se homogeneizan triturándolos en el triturador de patatas de metal directamente en un vaso de precipitados de vidrio a través de un tamiz colocado en un embudo (trabajar rápidamente y en cámara fría). Las cáscaras de huevo y los desechos del tamiz y triturador se descartan (todo el extracto se retira en biorresiduo). El homogenado se transfiere a tubos de centrifugadora vertiéndolo a través del embudo en los revestimientos en los tubos. Todos los cubos se pesan para asegurar que la diferencia de peso máximo es < 30 g. A continuación, los cubos se cierran y se colocan en recipientes en el rotor. Los homogenados se centrifugan 1 hora en el de rotor JLA 8.1000 a 7.000 rpm (12200 RCF (g)) a 4 °C. Los tubos se retiran después de la centrifugación y la fracción media (citoplásmica) se recoge mediante la inserción de una aguja de aproximadamente 0,5 cm sobre el fondo del tubo. Se tiene cuidado para no contaminar la fracción con los lípidos de la parte superior (la fracción superior) o residuos de fondo. Cualquier material que contenga lípidos o desechos se descarta. La fracción media se transfiere directamente a los recipientes resistentes a la congelación (tubos de microcentrifugadora (alícuotas de 1 ml), tubos PCR de 8 tiras (alícuotas de 200 µl) y tubos de 50 ml u otros recipientes. Para el ensayo se retiene aproximadamente 1 ml en el hielo. Las alícuotas de los extractos se congelan inmediatamente a -80 °C y se pueden almacenar hasta un año. Los extractos tienen un pH de 6,5 - 7,0; tienen una carga bacteriana inferior a < 100 colonias por ml (por ejemplo, < 10 colonias por placa) tal como se sometió a ensayo en placas de agar sin antibiótico; una osmolaridad de 300-500 mOsm; y un contenido de proteína de 100-300 mg/ml.

#### Ejemplo 14

##### Los extractos de huevo aumentan la producción de colágeno

35 Los extractos de huevo preparados como se ha descrito en el de Ejemplo 13 se aplicaron a fibroblastos *in vitro* y la producción de colágeno se sometió a ensayo. En resumen, el día -1, los fibroblastos se sembraron en matraces de cultivo celular. En el día cero, el medio de cultivo se sustituyó por medio de cultivo recién preparado complementado con un 0,5 % de LEX. Las células de control se cultivaron con medio de cultivo celular sin LEX. Los cultivos se continuaron durante siete días, con el medio complementado con LEX cambiado cada 24 horas. El día 8, las células se lavaron 3X con PBS y se añadió un medio de cultivo celular bajo en suero. El día 9, el medio de cultivo se cosechó y el contenido de colágeno se sometió a ensayo usando un kit de colágeno (Bicolor). Las células cultivadas en presencia de medio complementado con LEX (cuatro preparaciones diferentes) demostraban un aumento estadísticamente significativo en la producción de colágeno. Los datos se resumen en la tabla que sigue a continuación.

**Tabla 11. Aumento del contenido de colágeno en el medio (%) usando diferentes lotes de LEX**

Lote de LEX	% de aumento con respecto al control	Valor de P
LEX6	1800 %	
LEX18	532 %	0,01
LEX19	617 %	0,001
LEX20	547 %	0,01

#### 45 Ejemplo 15

##### La estimulación de células con extractos durante 8 días, a continuación durante un periodo adicional de 7 días sin extracto (total de 15 días) muestra que los efectos del extracto en la secreción de colágeno son reversibles

50 Este experimento muestra que el efecto del tratamiento de células con el extracto (LEX) durante 8 días (dando un aumento de un 367 % en la producción de colágeno en el día 8) se veía significativamente reducido cuando las células se tratan durante otros 7 días con el medio de cultivo celular sin extracto (el aumento de un 50 %

permanecía). Esto indica que el efecto del extracto en los fibroblastos es reversible.

**Ejemplo 16**

**Los extractos de huevo aumentan la proliferación de fibroblastos**

5 Los extractos de huevo preparados como se ha descrito en el Ejemplo 13 se aplicaron a fibroblastos *in vitro* y la producción de colágeno y la proliferación se sometieron a ensayo. En resumen, el día -1, los fibroblastos se sembraron en matraces de cultivo celular. En el día cero, el medio de cultivo se sustituyó por medio de cultivo recién preparado complementado con un 0,5 % de LEX. Las células de control se cultivaron con medio de cultivo celular sin LEX. Los cultivos se continuaron durante cinco días, con el medio complementado con LEX cambiado cada 24 horas. El número de células se determinó en los matraces. Las células cultivadas en presencia de medio  
10 complementado con LEX (dos preparaciones diferentes) demostraban un aumento estadísticamente significativo en el número de células. Los datos se resumen en la Figura 5.

**Ejemplo 17**

**Comparación de huevos de trucha, huevos de salmón fertilizadas, y huevos de salmón sin fertilizar**

15 Los extractos de huevo de salmón fertilizado, extractos de huevo de salmón sin fertilizar, y extractos de huevos de trucha preparados como se ha descrito en el Ejemplo 13 se aplicaron a fibroblastos *in vitro* y la producción de colágeno y la proliferación se sometieron a ensayo. En resumen, el día -1, los fibroblastos se sembraron en matraces de cultivo celular. En el día cero, el medio de cultivo se sustituyó por medio de cultivo recién preparado complementado con un 0,5 % de LEX. Las células de control se cultivaron con medio de cultivo celular sin LEX. Los datos se resumen en la Figura 6.

**Ejemplo 18**

**El extracto de huevo aumenta la absorción en la piel**

20 Los extractos de huevo de salmón preparados como se ha descrito en el Ejemplo 13 se incorporaron a una concentración final de un 4 % en una pomada (Ensayo 1) o crema (Ensayo 2). Los tratamientos del ensayo se aplicaron a una mano mientras que el tratamiento de control que carecía del extracto de huevo se aplicó en la mano opuesta. En cada ensayo participaron cinco personas de ensayo durante una semana. Las personas del ensayo  
25 rellenaron una encuesta restos del tratamiento. Los resultados se presentan en la Tabla 12.

**Tabla 12**

Preguntas contestadas:	% de preferencia del extracto	
	ENSAYO 1 (derecha)	ENSAYO 2 (derecha)
1 ¿Observó una diferencia en la parte izquierda/derecha ?	<b>100</b>	<b>100</b>
2 ¿Qué tipo de diferencia observó? (para la crema con LEX)		
1. Mejor absorción	<b>100</b>	<b>100</b>
2. Piel más suave	<b>100</b>	<b>100</b>
3. Efecto en las heridas pequeñas	<b>25</b>	<b>25</b>
4. Efecto en las arrugas	<b>25</b>	<b>25</b>
3 Mejora visible en la piel tratada con LEX después de 7 días crema preferida ( % de preferencia del extracto de total con	<b>100</b>	<b>50</b>
4 preferencia)	<b>100</b>	<b>100</b>
5 Diferencia observada en el olor o en la textura de las cremas	<b>100</b>	<b>50</b>

ENSAYO pomada Vitapan con un 4 % de miel de manuka y un 4 % de LEX2 (fuerte efecto en las células).

1 Todas las personas del ensayo observaron una clara diferencia. ENSAYO

2 Crema Vitapan con un 4 % de LEX13 (buen efecto en las células). Algunas personas observaban una clara diferencia, otras una diferencia moderada.

**Ejemplo 19****Propiedades físicas de los extractos**

El contenido de ARN, ADN y proteína de LEX se midieron usando el fluorímetro Qube-iT de InVItrogen. Todos los extractos medidos produjeron efectos comparables sobre la secreción de colágeno de fibroblastos humanos *in vitro* a una estimulación de un 0,5 % durante 8 días. Los extractos se diluyeron en tampón de ensayo PBS y Qube-iT antes de las mediciones.

**Contenido de ARN de homogenados de salmón y trucha y extractos con un promedio de 2-5 mg/ml.** Los homogenados de huevos de salmón (sin centrifugar) contienen 3-4 mg/ml de ARN. Después de la centrifugación a 9-15.000 g, el contenido de ARN se redujo a 2-3 mg/ml. Esto se debe probablemente a que el ARN se centrifuga o se degrada. Curiosamente, los homogenados de huevos de trucha (sin centrifugar) contienen 2-3 mg/ml de ARN, pero después de la centrifugación a 9-15.000 g, la concentración de ARN aumenta a 3-5 mg/ml. Los extractos preparados a partir de huevos de trucha son menos viscosa que los extractos preparados a partir de huevos de salmón, y pueden mantener el ARN mejor en suspensión en fase acuosa durante la centrifugación.

**Contenido de ADN de de homogenados de salmón y trucha y extractos entre 40-500 µg/ml.** Los homogenados de huevos de salmón (sin centrifugar) contienen 60-200 µg/ml de ADN. Después de la centrifugación a 9-15.000 g, el contenido de ADN se redujo a 40-51 µg/ml. Esto se debe probablemente al ADN que se centrifuga. Curiosamente, los homogenados de huevos de trucha (sin centrifugar) contienen más ADN que los extractos de huevo de salmón: 130-530 µg/ml de ADN. Después de la centrifugación a 9-15.000 g, el contenido de ADN se reduce a 70-125 µg/ml, pero todavía es superior a los extractos de huevo de salmón comparables. Los extractos de huevos de trucha son menos viscosos que los extractos preparados a partir de huevos de salmón, y pueden mantener el ADN en una suspensión de fase acuosa mejor durante la centrifugación.

El contenido de ADN varía ampliamente entre los homogenados de ensayo preparados en el presente documento, y puede estar causado por el lisado diferencial de los núcleos que contienen ADNg antes de la centrifugación. Una mejor lisis de los núcleos por variaciones en el proceso de homogeneización durante la producción puede producir extractos con un contenido de ADN más elevado. Estos extractos diferenciales pueden producir efectos separados útiles para diferentes aplicaciones, tales como efectos sobre la expresión genética en células cutáneas.

**Contenido de proteína de homogenados de salmón y trucha y extractos con un promedio 180-300 mg/ml.** homogenados de huevos de salmón (sin centrifugar) contienen 180-260 mg/ml de proteína. Después de la centrifugación a 9-15.000 g, el contenido de proteína no cambió o aumentó ligeramente hasta 200-260 mg/ml. Los homogenados de huevos de trucha (sin centrifugar) contienen 250-300 mg/ml de proteína, y después de la centrifugación a 9-15.000 g, el contenido de proteína es aproximadamente el mismo (250-270 mg/ml). No se espera que la fracción proteica del citosol del huevo sea centrifugada en las fuerzas g aplicadas, y se puede esperar que sea similar al contenido de proteína sin procesar del citosol del huevo.

Las mediciones previas de los contenidos de proteínas en extractos usando un espectrofómetro Nano-drop mostró un intervalo de 150-250 mg/ml. Esto se puede deber a un límite superior de detección de aproximadamente de 250 mg/ml en el de Nano-drop. Es probable que las mediciones del fluorómetro ligeramente más elevadas presentadas en el presente documento sean más precisas.

**Tabla 13.** Sumario de mediciones de contenido de ARN, ADN y proteína en extractos

Fuente de huevos	Velocidad de centrifugación	LEX/corresp a LEX	mg/ml de ARN	mg/ml de ADN	mg/ml de proteína
Salmón	Homogenado, sin centrifugación	LEX20	3,51	66,8	256
Salmón	15000 xg	LEX20	2,34	44	252
Salmón	Homogenado, sin centrifugación	LEX24	3,42	192,4	180
Salmón	12000 xg	LEX24	2,93	50,8	208
Trucha	Homogenado, sin centrifugación	LEX28	2,67	131,6	249
Trucha	15000 xg	LEX28	3,51	73,2	249
Trucha	Homogenado, sin centrifugación	LEX25	2,53	528	296

(continuación)

Fuente de huevos	Velocidad de centrifugación	LEX/corresp a LEX	mg/ml de ARN	mg/ml de ADN	mg/ml de proteína
Trucha	15000 xg	LEX25	3,70	72,8	262
Trucha	15000 xg	LEX25	3,63	99,2	210
Trucha	12000 xg	LEX31	4,59	87,2	270
Trucha	12000 xg	LEX32	4,68	124,8	-
Trucha	12000 xg	LEX33	4,67	94,4	252

5 **El contenido de lípidos de los extractos es 3,7 - 4,5 g/100g de extracto (3,7-4,5 %).** El contenido de lípidos de los extractos se midió en ALS (Alemania), y se encontró que estaba en el intervalo estrecho de 3,7 - 4,5 g/100 g en todos los extractos de huevos de salmón o trucha preparados a centrifugaciones que varían de 1.700 g a 15.000 g. Parece que las centrifugaciones más bajas de fuerza g requieren una centrifugación a temperatura ambiente para dar un fraccionamiento de lípidos igual a fuerzas g más elevadas a 4 grados centígrados.

10 **Sumario de propiedades físicas.** La preparación de extracto a partir de homogenados de huevos de salmón y trucha da una separación diferencial de ARN, ADN y proteína, pero una separación igual de lípidos. Los extractos de huevos de salmón fertilizados y sin fertilizar presentan los mismos perfiles de proteína, ARN y ADN.

1) La concentración de proteína (180-300 mg/ml) del extracto es aproximadamente comparable con la del homogenado (sin proteína o poca proteína retirada con el procedimiento de producción independientemente de la fuerza g).

15 2) El contenido de ARN (2-5 mg/ml) parece aproximadamente igual para los homogenados de salmón y trucha, ligeramente inferior en la trucha. Parece que el ARN aumenta en los extractos preparados a partir de homogenados de huevo de trucha, lo que se puede deber a una viscosidad menor y a una mejor solubilidad del ARN en la fracción de extracto de estos huevos. El contenido de ARN en los extractos finales de huevo de salmón es ligeramente inferior al de los extractos de huevo de trucha.

20 3) El contenido de ADN (40-500 ug/ml) de los extractos es altamente variable, lo que probablemente está causado por un lisado diferencial de los núcleos en el procedimiento de homogeneización de triturado de huevo. Parece que los extractos de huevo de salmón tienen un contenido de ADN inferior al de los extractos de huevo de trucha. En ambos extractos, el contenido de ADN es inferior en los extractos que en los homogenados, lo que indica que una cierta parte del ADN se centrifuga a fuerzas g de aproximadamente 9,379 g.

25 4) El contenido total de lípidos (3,7-4,5 %) es aproximadamente igual para los extractos de salmón y trucha. Parece que cantidades iguales de los lípidos se separan de la fracción del extracto en la mayoría de las fuerzas g de aproximadamente 1700 g.

## Ejemplo 20

### Producción de extractos

30 Se ha documentado que el contenido de lípidos del extracto está inalterado de forma sorprendente a velocidades de centrifugación que varían de 1.700 g a 15.000 g (véase anteriormente), mientras que otros parámetros tales como el contenido de ARN, ADN y proteína se alteran con el aumento de la fuerza g durante la centrifugación.

35 Una etapa adicional de lavado de los huevos durante 10 minutos con Buffodine (1:100 en NaCl al 0,9 %) antes de la preparación del homogenado es beneficiosa. Esta etapa de lavado parece reducir de forma significativa el contenido bacteriano. Por razones de seguridad, todos los lotes de LEX envasados en recipientes finales se pasteurizan ligeramente (se incuban) calentando a 56 °C durante 20 minutos. Esta pasteurización esteriliza completamente el extracto, con 0 bacterias encontradas en extractos de placas de bacterias incubadas durante 3 días a temperatura ambiente, 4 grados centígrados o 30 grados centígrados. 1 colonia/ 100 µl de LEX en placas de agar incubadas a temperatura ambiente es el máximo observado. Esto es 100x por debajo de los límites de seguridad para el agua potable (100 bacterias/ml). Una sola colonia raramente observada proviene probablemente del aire durante la siembra de LEX, y es comparable con el crecimiento bacteriano del control negativo (solamente la placa).

40 La estabilidad del efecto de secreción de LEX y colágeno se mantiene después de que LEX se caliente a 56 °C durante 20 minutos. Cuando se aplicaba a fibroblastos humanos *in vitro* a una concentración de un 0,5 % en medio celular durante 8 días (medios cambiados diariamente), el efecto en la secreción de colágeno (medido como eflujo de colágeno de células con respecto a medio celular y comparado con células de control no tratadas) era comparable con las células tratadas con extracto sin calentar que se habían mantenido a -80 °C después de la preparación. Se observó un aumento de un 200-400 % en comparación con los controles para LEX tanto calentado como no calentado. Anteriormente, los inventores han observado una disminución del efecto en la secreción de

colágeno con extractos incubados a 72 °C, lo que indica que las sustancias activas en los extractos que se pueden desnaturar entre 56 y 72 °C son responsables de partes de los efectos de secreción. En este intervalo de temperaturas, se sabe que las proteínas se desnaturan. Se puede deducir que una proteína estructurada es una de las sustancias activas.

5 **Ejemplo 21**

**Los extractos aumentan la producción de colágeno en seres humanos *in vivo***

Este Ejemplo describe los efectos en la expresión genética del colágeno y el contenido de proteína en piel intacta después de una aplicación de 14 días de LEX al 2 % en crema cosmética.

10 **DISEÑO EXPERIMENTAL:** A dos voluntarios sanos (2 hombres, en el presente documento etiquetados como individuo 1 y 2, respectivamente) se les aplica una crema en la piel en el brazo superior izquierdo, y la misma crema con un 2 % de LEX al brazo superior derecho 2 veces al día durante 14 días sucesivos. No se usaron otros productos de crema en la piel durante el periodo de duración del estudio. Por lo tanto, cada individuo es su propio control negativo. Esto, como cantidad de colágeno en la piel, se considera que es diferente en los individuos.

15 Después de finalizar el tratamiento de 14 días, se tomaron biopsias de unión de 3 mm de grosor total de la piel de las áreas tratadas, brazo superior izquierdo y derecho, respectivamente, así como una biopsia igual del brazo inferior como control no tratado. Un total de 3 biopsias se tomaron de cada una de las 2 personas, y se etiquetaron con un número aleatorio por un dermatólogo. El estudio se realizó con ocultación y a los científicos que realizaron la evaluación solamente se les dio acceso a los números de codificación de las diferentes biopsias después de la finalización de los experimentos y la recopilación de los datos sin procesar.

20 Las tres biopsias de cada individuo se etiquetan: LEX (crema con un 2 % de LEX), crema (crema sola), control (piel no tratada). Las biopsias se congelaron en Nitrógeno líquido después de la escisión y se almacenaron a -80 °C antes del aislamiento de ARN y proteínas. La proteína y el ARN se aislaron en forma simultánea a partir de biopsias mediante el uso de un procedimiento modificado del micro kit RNeasy de Qiagen. Para la síntesis de ADNc se usó ARN, y la qPCR se realizó con cebadores para GAPDH (gen de referencia) y Colágeno I, usando reactivos de SybrGreen y máquinas de PCR en Tiempo Real de BioRad.

25 Los sedimentos de proteína aislados de las biopsias se disolvieron en PBS con y sin SDS al 5 % y la concentración de proteína total de cada muestra se midió usando el Ensayo de Proteína Quant-iT. La cantidad de colágeno en las mismas muestras de proteína se midió mediante un ensayo colágeno y se midió en un espectrofotómetro (Nanodrop). La cantidad relativa de colágeno en comparación con la proteína total en cada muestra se calculó a partir de estas mediciones. (Observar que los sedimentos de proteína eran difíciles de disolver en los tampones de ensayo, lo que puede haber influido en los resultados finales. Ya que el resultado final se da como una proporción (número relativo) de las 2 mediciones en muestras individuales, esto puede resolver el problema como ya que se puede suponer que cada muestra se puede disolver del mismo modo. La adición de SDS mejoró la solución de la proteína).

30 **Resultados de la expresión genética tal como se mide con qPCR:**

35 **Tabla 14.** Veces de regulación positiva de genes de colágeno I en biopsias de piel

Individuo	Biopsia tratada con LEX	Biopsia tratada con crema	Control no tratado
1	1,7x	0,6x	1
2	6x	2,5x	1
Individuo1: Aumento de 1,7x en el ARN de colágeno en piel tratada con LEX. Disminución de 0,6x en el ARN de colágeno en piel tratada con crema. Individuo 2: Aumento de 6x en el ARN de colágeno en piel tratada con LEX. Aumento de 2,5x en el ARN de colágeno en piel tratada con crema.			

40 **Discusión de la expresión genética:** Los resultados mostraban que 2 de 2 tenían 2,5 - 6 veces de regulación positiva de genes de colágeno I en la piel tratada con la crema con un 2 % de LEX en comparación con la piel de control no tratada. La expresión genética del colágeno en la piel tratada con la crema con un 2 % de LEX era para ambos individuos mucho más elevada que en la piel tratada solamente con la crema. La crema sola proporcionó una disminución baja cero insignificantes de la expresión genética del colágeno en comparación con la piel de control sin tratar en un individuo, aunque un ligero aumento en los otros dos.

Conclusión: El uso de la crema sola tiene un pequeño defecto o ninguno en la expresión genética del colágeno, mientras que la misma crema con un 2 % de LEX aumenta la expresión genética 1,7 - 6 veces. La conclusión final es

prueba del concepto de que un 2 % de LEX aumenta la expresión genética del colágeno I gene en piel humana *in vivo* después de 14 días de tratamiento. Esto está de acuerdo con los datos de los estudios de los inventores en fibroblastos de piel humana *in vitro*, en los que el tratamiento con un 0,5 % de LEX durante 8 días proporcionó un aumento de hasta 6 veces de la expresión genética del Colágeno I.

5 **Resultados - contenido de proteína colágeno:** Las mediciones de la concentración de proteína variaron entre muestras disueltas con/sin SDS. Como es imposible decir que medición es superior, un promedio de ambas mediciones de concentración total de proteína y concentración de colágeno I se usó para calcular las proporciones. Las mediciones mostraban que las biopsias individuales habían proporcionado cantidades diferentes de proteína, por lo tanto se calculó un valor relativo del contenido de colágeno/proteína total para cada muestra para corregir la diferente eficacia de aislamiento de proteína. A continuación, la proporción encontrada para la biopsia de control no tratada se estableció como 1 para cada individuo, para comparar la proporción de colágeno/proteína total:

**Tabla 15.** Cantidad relativa de colágeno en comparación con el contenido total de proteína extraído de cada biopsia. Proporciones de colágeno/proteína total para cada biopsia. La biopsia de control se establece como 1 para cada individuo.

Individuo	Biopsia tratada con LEX	Biopsia tratada con crema	Control no tratado
1	1,3	0,4	1
2	1,3	0,9	1

15 **Discusión del contenido de proteína colágeno:** Los resultados muestran que ambos individuos con un conjunto completo de biopsias de piel presentaban la cantidad relativa de colágeno/proteína total más elevada en la biopsia tratada con un 2 % de LEX en la crema. Con la cantidad de colágeno habiendo aumentado en 1,3x en comparación con la piel de control sin tratar. De forma interesante, para los 3 individuos, la proporción de colágeno/proteína total disminuyó en la piel tratada con crema sola en comparación con la piel de control no tratada. La crema puede contener agentes que aumentan otras sustancias en la piel, extrayendo las cantidades de colágeno secretado. La indicación de que LEX añadido a la crema puede aumentar la expresión genética del colágeno, puede implicar que la crema por sí misma puede reducir la secreción de colágeno, haciendo posible que se pudiera usar otra crema para adición de LEX.

20 Cuando se comparan resultados de mediciones de qPCR y proteína, las alteraciones en la expresión genética y la concentración relativa de proteína para cada muestra de biopsia eran notablemente similares. Esto refuerza los resultados adicionales, mostrando las alteraciones en el colágeno en piel tratada con LEX tanto en la expresión genética como en la de proteínas.

**Tabla 16.** Veces de regulación de expresión genética de colágeno (gen) y proporción de colágeno/proteína total (proteína) en biopsias de piel humana *in vivo* después de tratamiento de 14 días de crema con/sin LEX

Individuo	Biopsia tratada con LEX		Biopsia tratada con crema		Control no tratado	
	<i>proteína</i>	<i>gen</i>	<i>proteína</i>	<i>gen</i>	<i>proteína</i>	<i>gen</i>
1	1,3	1,7	0,4	0,6	1	1
2	1,3	6	0,9	2,5	1	1

35 Cuando se toma en conjunto, el estudio muestra que la adición de LEX al 2 % a una crema cosmética aumenta la expresión del gen del colágeno I y la cantidad relativa de colágeno con respecto a proteína total. Los resultados también muestran que el uso de la crema sola no tiene efectos, o incluso tiene efectos negativos, en el contenido de colágeno en piel humana *in vivo*. En conclusión, la adición de LEX al 2 % es lo que da el efecto en la expresión genética del colágeno y de proteínas.

**Ejemplo 22**

**Resultados del estudio de cicatrización de herida *in vivo* en seres humanos**

40 El presente Ejemplo describe los efectos en la cicatrización de heridas después de una aplicación de 14 días de LEX concentrado, puro a una herida de biopsia por punción de 3 mm de diámetro.

**Mejora de la cicatrización de una herida por tratamiento con LEX puro:** Se tomaron biopsias por punción de 3 mm de diámetro de espesor total de piel en un sujeto humano, 1 en cada brazo superior y 1 en cada brazo inferior, 4 biopsias en total. Las heridas tenían el mismo tamaño y profundidad.

5 Las biopsias en el brazo derecho (superior e inferior) se usaron como controles (no tratados), mientras que las biopsias en el brazo izquierdo se trataron 1x al día con cualquiera de LEX32 (herida en el brazo superior) o crema de Elisabeth Arden durante 8 horas (herida en el brazo inferior). Las heridas de la biopsia se cubrieron con apósitos los primeros 8 días hasta la formación de costras. Los apósitos se cambiaban 1x al día, en el momento de la aplicación de la crema LEX/8 horas. Después de la formación de la costra, la herida se mantenía sin cubrir, y LEX se aplicaba a la herida diariamente hasta el día 28. Las fotografías de cada heridas y cicatrices se tomaron diariamente con una cámara digital y una regla milimétrica mantenida acerca de la herida para comparar los tamaños de la herida durante el proceso de cicatrización.

10 Para este estudio se usó LEX del lote 32. El lote se fabricó a partir de huevos de trucha y sin bacterias. QC estaba dentro del intervalo normal del producto LEX habitual. El extracto se almacenó a -20 °C y los tubos de 1,5 ml se descongelaron el día 1, día 5, día 10 y el día 20. Una pequeña cantidad de LEX se aplicó con la punta en q directamente a la herida, y el tubo descongelado se almacenó a número 4 °C hasta 10 días. No se desarrolló olor, y no había signos de infección o crecimiento bacteriano en LEX ni en la herida.

**Sumario de resultados:**

15

**Tabla 16**

Día	Herida tratada con LEX	Herida de control positivo tratada con crema durante 8 horas	Control no tratado
0	3 mm de biopsia tomados	3 mm de biopsia tomados	3 mm de biopsia tomados
3	Herida seca	Herida abierta húmeda	Herida abierta húmeda
5	Herida seca, costra fina, visiblemente mejor contraída/más pequeña que los controles	Herida seca con costra. Mismo tamaño que el control no tratado. Color más rojo que el control.	Herida seca con costra. Mismo tamaño que con crema durante 8 horas.
13	Herida de 2/3 del tamaño de la herida de control, de color menos rojo y con una costra más pequeña	Cicatrización de color rojo alrededor de los bordes, costra grande	Cicatrización de color rojo alrededor de los bordes, mismo tamaño que con crema durante 8 horas, costra más pequeña
18	Reepitelialización. Sin costra, cicatriz de color rosa claro con parámetros uniformes	Costra, bordes hinchados de color rojo	Costra, bordes de color rojo
21	Cicatriz aplanada y de color rosa claro	Reepitelialización. Sin costra, cicatriz de color rojo, menos uniforme hinchada que el control con LEX y no tratado	Reepitelialización. Sin costra, escamas de color blanco secas bajo la cicatriz, bordes de color rojo
28	Remodelación de la cicatriz. Cicatriz visiblemente más pequeña con menos engrosamiento en la parte media	Remodelación de la cicatriz. Cicatriz roja y engrosándose en la parte media. Hinchazón palpable.	Remodelación de la cicatriz. Cicatriz roja, bordes no uniformes, engrosándose en la parte media.

**Discusión:** Los resultados presentados en el formato de la tabla anterior indican que la aplicación diaria de LEX puro al 100 % acelera y mejora la curación de la herida en muchos parámetros. La crema durante 8 horas (control positivo) no era mejor, o ligeramente peor, que en el caso sin tratar en la mayoría de los parámetros:

20 **Secado más rápido de la herida.** La herida tratada con LEX estaba seca (ningún fluido extracelular exudando de la herida) en el día 4, un día completo antes de las otras 2 heridas. Esto se puede deber parcialmente a que el LEX por sí mismo seca y forma una membrana seca, que protege la herida. También se formó una costra seca completa primero entre las 3 heridas.

25 **Reepitelialización más rápida.** La herida tratada con LEX perdió la costra (definido como reepitelialización) 3 días antes que la herida sin tratar o la herida tratada con crema durante 8 horas 8 (día 18 en comparación con el día 21).

30 **Reducción de la inflamación.** Durante todo el proceso de cicatrización, la herida tratada con LEX estaba menos roja, menos hinchada y parecía menos inflamada que la herida no tratada, y en particular mejor en estos aspectos que la herida tratada con crema durante 8 horas, que estaba hinchada, roja y pruriginosa antes de la reepitelización completa. El menor enrojecimiento de la herida tratada con LEX era particularmente visible desde el día 5-23. El LEX fluido aplicado a la herida contiene una alta concentración de proteínas y también sales

marinas. El LEX se seca hasta una película sobre la herida, y puede protegerla de agentes irritantes y patógenos transmitidos por el aire. La crema durante 8 horas es muy pegajosa y gruesa, lo que hace que los agentes patógenos y las fibras de la ropa, etc., se adhieran, irritando la herida y, por lo tanto, pueden aumentar el riesgo de inflamación en la herida. La herida tratada con crema durante 8 horas parecía estar peor que la herida sin tratar en todos los parámetros desde el día en que se retiró el apósito (día 8) hasta el día en que la costra se cayó (día 21).

**Contracción más rápida de la herida.** La herida tratada con LEX comenzó a retraerse alrededor de los bordes el día 3, en comparación con el día 6 en las otras heridas. Fue particularmente sorprendente cómo el borde de la herida aparecía diferente en la herida tratada: el borde retraído hacia el fondo de la herida, formando un menisco a lo largo del borde inferior, como si la herida se cerrase desde abajo. Parecía que las otras heridas se cerraban por contracción lateral, cuando la incisión de profundidad de la herida permanecía antiparalela al fondo de la herida durante los primeros 10 días. La mejor contracción observada en la herida tratada con LEX se puede deber a una diferenciación más rápida de fibroblastos a miofibroblastos y un movimiento más rápido de estos en la herida desde los bordes de la herida.

**Remodelación más temprana y mejor.** Después de que una herida está libre de costra y la cicatriz visible, la remodelación de la cicatriz comienza por la reorganización de las fibras de colágeno dentro de la cicatriz y la activación de los procesos de diferenciación entre fibroblastos y miofibroblastos. Los miofibroblastos responsables de depositar colágeno durante el proceso de cierre de la herida dejan la cicatriz y los fibroblastos normales depositan colágeno de tipo I mientras que una maquinaria de enzimas descompone y construye fibras colágeno en diferentes direcciones en la herida. Los vasos sanguíneos también se reorganizan, y los procesos inflamatorios retroceden. A medida que el proceso inflamatorio disminuye y las fibras de colágeno se reorganizan en plano con la piel, la cicatriz se aplanan. La cicatriz de la herida tratada con LEX era visiblemente más plana desde el día en que la costra se cayó (día 21), y evolucionó a tener un mejor aspecto que las otras 2 cicatrices durante todo el proceso de remodelación.

**Cicatriz más pequeña y menos roja con mejor aspecto visual.** Desde el día en que se cayó la costra (día 21), la cicatriz tratada con LEX parecía menos roja, más pequeña y más plana que las otras cicatrices. En combinación, cada uno de estos parámetros hace que la cicatriz sea menos visible y con un aspecto más saludable.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de fabricación de extractos de huevos de anfibio o pez que comprende:
  - a) proporcionar huevos seleccionados entre el grupo que consiste en huevos de anfibio y pez;
  - b) procesar dichos huevos para proporcionar una fracción citoplasmática de dichos huevos;
  - 5 c) tratar dicha fracción citoplasmática para impedir el crecimiento de bacterias por calentamiento de dicho extracto a una temperatura de 50 °C a 90 °C durante un periodo de tiempo superior a un minuto.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichos huevos se seleccionan entre el grupo que consiste en huevos fertilizados y no fertilizados.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho procesamiento comprende la homogeneización de dichos huevos seguido por centrifugación para separar lípidos y sólidos de dicha fracción citoplasmática.  
10
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha fracción citoplasmática comprende de 50 a 500 mg/ml de proteína de huevo de pez, de uno a seis gramos/100 gramos de extracto de lípidos de huevo de pez, una osmolaridad de 330 a 440 mOsm, y un pH de 5,0 a 7,7.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha fracción citoplasmática comprende de 100 a 250 mg/ml de proteína de huevo de pez en una solución acuosa; al menos un oligoelemento seleccionado entre el grupo que  
15 consiste en calcio, fósforo, cinc, cobre e hierro; al menos una vitamina seleccionada entre el grupo que consiste en las vitaminas A, E, riboflavina, niacina, B6, pantotenato cálcico y B12; y una fracción lipídica que comprende de hasta un 80 % de ácidos grasos insaturados; en el que dicha composición tiene una osmolaridad de 330 a 440 mOsm, un pH de 5,0 a 7,7, y una densidad de 0,8 a 1,4 g/ml.
- 20 6. Una composición fabricada con el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Uso cosmético de la composición de la reivindicación 6 para aumentar la producción de proteínas de colágeno o la expresión genética del colágeno en un sujeto.
8. Una composición de la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de una herida en un sujeto.

FIGURA 1

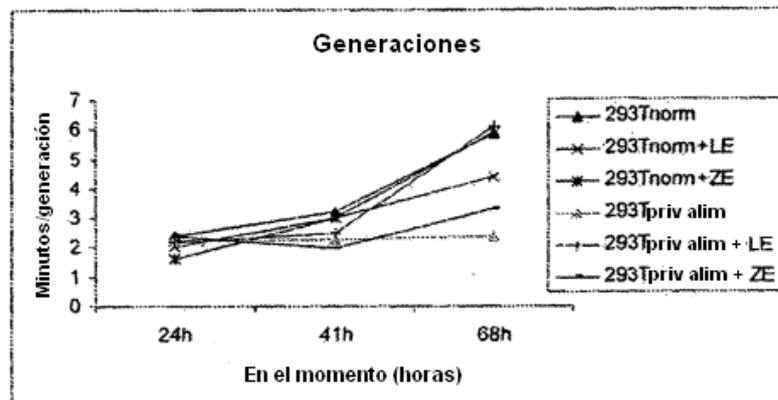


FIGURA 2

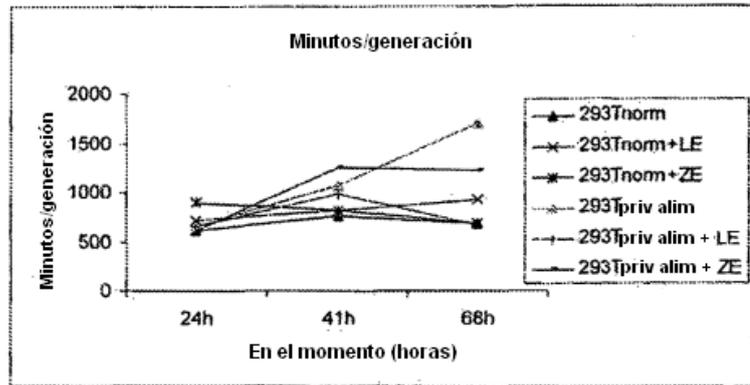


FIGURA 3

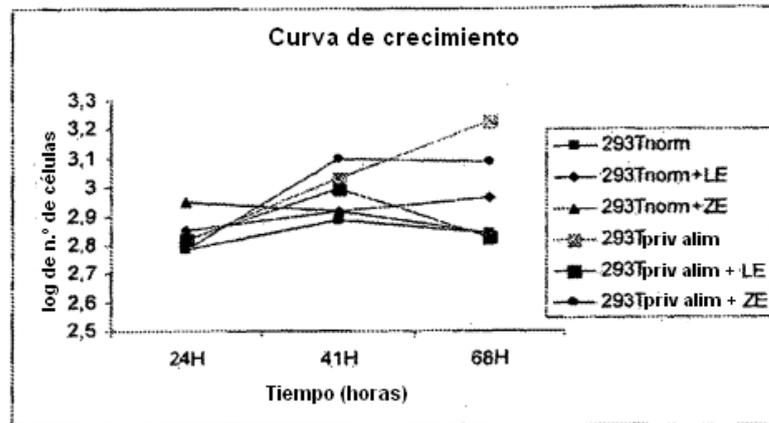


FIGURA 4

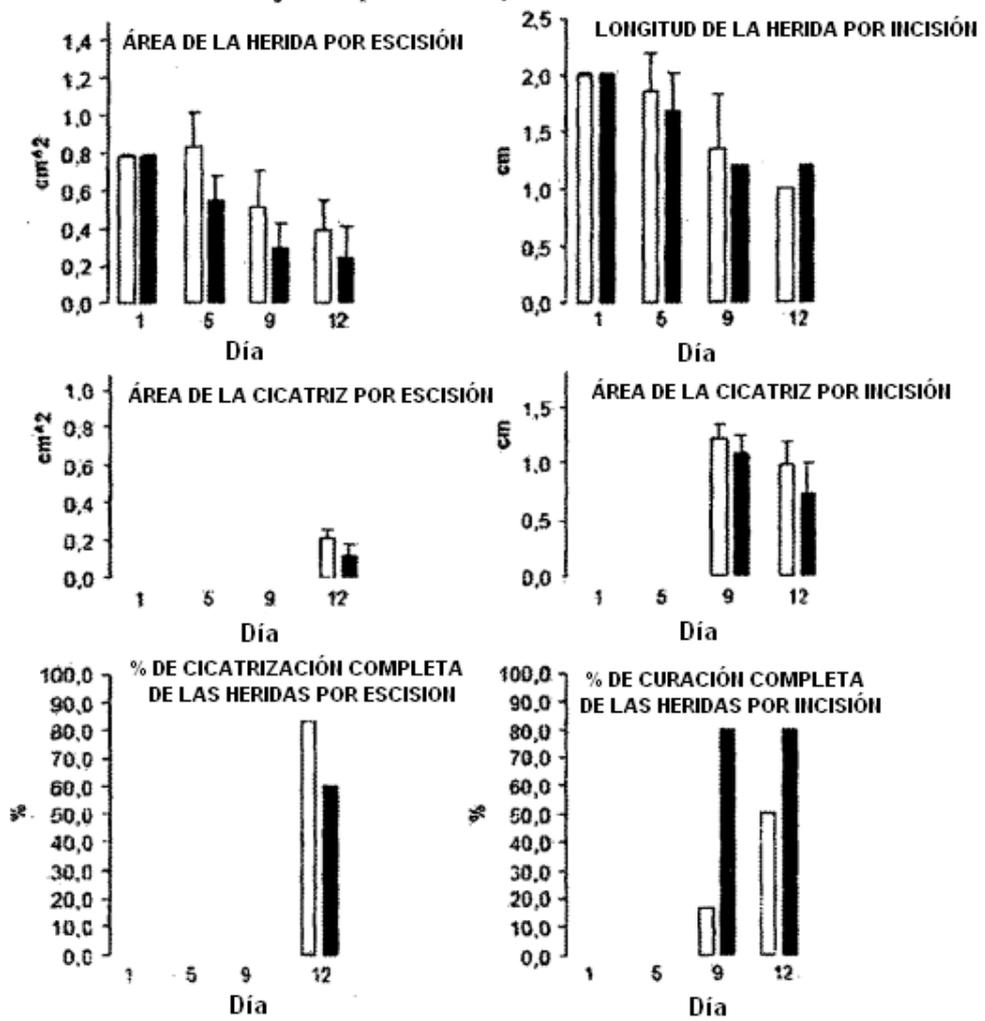
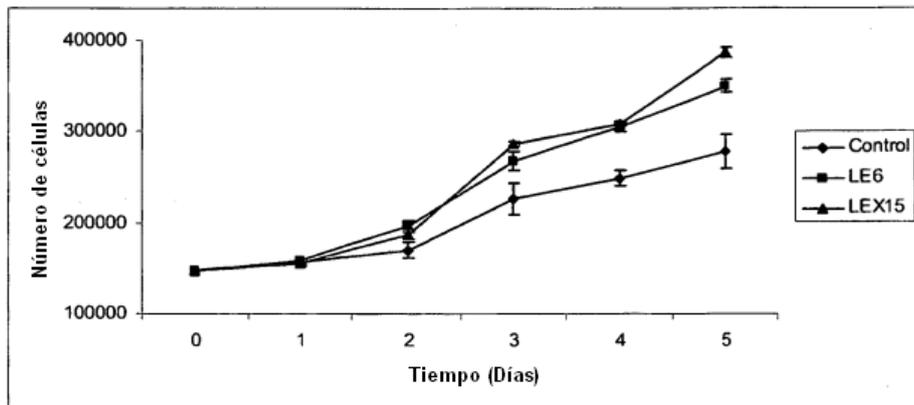


Figura 5



\* =  $p < 0,05$   
 \*\* =  $p < 0,01$

Figura 6

