

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 799**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2013** **PCT/EP2013/067329**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014** **WO14029778**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2013** **E 13756008 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018** **EP 2888353**

54 Título: **Procedimiento para aislamiento y purificación de células madre epiteliales de la piel**

30 Prioridad:

23.08.2012 EP 12181544

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

26.02.2019

73 Titular/es:

PELL CELL MEDICALS NV (100.0%)

Noorwegenstraat 4

9940 Evergem, BE

72 Inventor/es:

BROECKX, SARAH Y. y

SPAAS, JAN H.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 701 799 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para aislamiento y purificación de células madre epiteliales de la piel

5 CAMPO TÉCNICO

La invención pertenece al campo técnico de un procedimiento para aislar células madre multipotentes, preferentemente derivadas de muestras epiteliales. La invención también se refiere a composiciones celulares que comprenden dichas células madre, uso de las mismas y células diferenciadas derivadas de estas células madre.

10

ANTECEDENTES

Se están estudiando diferentes tipos de células madre debido a su capacidad de formar o regenerar órganos y tejidos cuando se producen lesiones. A diferencia de las células madre embrionarias, las células madre somáticas se pueden recuperar de tejidos adultos autólogos, disminuyendo de este modo el riesgo de rechazo del injerto. Por lo tanto, el aislamiento y caracterización de células madre de diferentes tejidos, tales como médula ósea, tejido adiposo, sangre periférica y cordón umbilical (sangre) son bien conocidos. Sin embargo, el porcentaje de células madre es muy bajo en cada órgano o tejido y, por lo tanto, también la purificación es un aspecto muy importante de la investigación con células madre.

20

Puesto que la regeneración constante de la piel se logra debido a la diferenciación de las células madre somáticas dentro de la epidermis y el folículo piloso, la piel puede servir como una excelente fuente de células madre epiteliales (EpSC) (Grandi *et al.*, 2012; Staniszewska *et al.*, 2011). Por lo tanto, se ha propuesto que las EpSC podrían ser útiles en el tratamiento de varias enfermedades, tales como quemaduras, heridas crónicas y úlceras (Draheim y Lyle, 2011). Además, las displasias ectodérmicas, moniletrina, síndrome de Netherton, enfermedad de Menkes, epidermólisis ampollosa hereditaria y alopecias también se podrían beneficiar de estas EpSC (Draheim y Lyle, 2011).

25

Por lo tanto, se han descrito diferentes intentos de separar las EpSC a partir de piel de mamífero (Fujimori *et al.*, 2009; Nowak y Fuchs, 2009). Fujimori informó del aislamiento de células madre/progenitoras epidérmicas humanas por medio de la separación celular asistida por gravedad. Sin embargo, la separación de las células en base a su diámetro es bastante controvertida, ya que también existen muchas células distintas a las células madre con un diámetro pequeño. Nowak y Fuchs describieron la separación celular activada por fluorescencia (FACS) como una técnica para aislar EpSC de ratones. Desafortunadamente, la separación celular se realizó en base a un marcador de superficie celular que también está presente en otros tipos de células. En ambos estudios, no se llevó a cabo una caracterización completa que pudiera haber confirmado el origen de las poblaciones de células mixtas.

35

Marcelo *et al.*, 2012, describen un procedimiento para producir cultivos celulares primarios a partir de piel epidérmica, mucosa oral y uréter por el uso de una etapa de tripsinización. Sin embargo, las células obtenidas son queratinocitos primarios. De forma similar, Liu *et al.* (1978) también describen el aislamiento y crecimiento de queratinocitos, Katwa *et al.* (2003) describen el aislamiento de miofibroblastos y Rosen *et al.* (1999) está relacionado con adipocitos, tipos celulares que han alcanzado todos un determinado estado de diferenciación y, por lo tanto, han perdido su multipotencia, lo que los hace menos atractivos de usar.

40

Recientemente, se informó del aislamiento de células equinas con capacidades de células madre/progenitoras mamarias (Spaas *et al.*, 2012) aislando tejido de glándula mamaria y haciendo uso de condiciones de preparación en placas no adherentes. Sin embargo, el procedimiento divulgado en el presente documento tiene varias lagunas, lo que da como resultado una población mixta de células madre mamarias, su progenie y células progenitoras distintas a células madre, como también se describe previamente por Stingl en 2009. Una conclusión similar se puede extraer del procedimiento para aislar y cultivar células madre epiteliales mamarias bovinas, como se describe por Li *et al.* (2008).

50

El documento EP 1 414 947 describió igualmente un procedimiento para obtener poblaciones altamente puras de poblaciones de células madre en base a su propiedad de poder sobrevivir en condiciones no adherentes. Sin embargo, la población de células madre obtenidas solo consistió en células madre dérmicas, mientras que se descubrió que no se pudo purificar ninguna célula madre viable de la epidermis. Sin embargo, las células madre dérmicas son restrictivas para la regeneración de tipos de células dérmicas (por ejemplo, adipocitos para tejido graso o fibroblastos para tejido conjuntivo). Las células madre epidérmicas son más ventajosas cuando se busca regenerar tejido epidérmico, por ejemplo como tratamiento para quemaduras u otros daños cutáneos (por ejemplo, úlceras).

60

El documento WO 2005/071063 A1 describe una metodología para el aislamiento específico de células madre dérmicas, preferentemente derivadas de papilas dérmicas. Las células que se aíslan surgen específicamente en la dermis durante la embriogénesis y son precursores relacionados con la cresta neural de nichos de papilas dérmicas.

65

Actualmente, los investigadores también se enfrentan a problemas para identificar las EpSC, y en especial de las diferenciación de EpSC de MSC o células madre mamarias. Aunque son conocidos algunos marcadores (por ejemplo, Spaas *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2009; Marcelo *et al.*, 2012; Juxue Li *et al.*, 2008 y Sharifullina *et al.*, 2005), no se encuentra ninguno específicamente adecuado para distinguir con certeza las poblaciones celulares mencionadas anteriormente. Más en particular, tanto Spaas *et al.* (2012) como Li *et al.* (2009) se refieren al aislamiento de células madre del tejido de glándula mamaria. Juxue Li *et al.* (2008) describen una metodología para enriquecer EpSC a partir de un cultivo de queratinocitos que da como resultado una subpoblación de queratinocitos adherentes que comprenden las EpSC. Sharifullina *et al.* (2005) proporcionan una visión general de sistemas de cultivo para células madre epidérmicas humanas, sin embargo, no se describen procedimientos de aislamiento específicos. Como la pureza de una población celular aislada es fundamental para aplicaciones posteriores, las herramientas de identificación adecuadas son un requisito.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de obtener un procedimiento mejorado para el aislamiento de una población pura de células madre epiteliales, que proporcionen preferentemente una población pura de células madre de origen epidérmico, así como proporcionar un conjunto de marcadores adecuado para identificar las EpSC. La invención tiene como objetivo para ello proporcionar un procedimiento optimizado para aislar, purificar y caracterizar EpSC derivadas de piel de mamífero, que se pueden usar, por ejemplo, con propósitos cosméticos y/o terapéuticos.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un procedimiento para obtener una composición celular que comprende células madre epiteliales (EpSC) de piel de mamífero de acuerdo con la reivindicación 1. En un modo de realización de la presente invención, el procedimiento para obtener una composición celular que comprende células madre epiteliales (EpSC) de piel de mamífero, por lo que dichas EpSC se derivan de la capa epidérmica, comprende las etapas de:

- obtener una muestra de piel de mamífero;
- separar al menos parcialmente la capa epidérmica de la capa dérmica;
- obtener una suspensión celular de dicha capa epidérmica realizando al menos una etapa de disociación enzimática; y
- cultivar dicha suspensión celular en condiciones de fijación baja.

El procedimiento permite la regeneración específica de tejido epidérmico, por ejemplo, como tratamiento para quemaduras u otros daños cutáneos.

Además, el procedimiento incluye preferentemente una etapa de selección, por lo que las células de la suspensión celular se seleccionan en base a su diámetro celular, antes del cultivo de la suspensión celular. Preferentemente, las células seleccionadas comprenden un diámetro de entre 5 y 150 μm , más preferentemente de entre 10 y 100 μm . Esto último permite seleccionar células individuales, lo que dará lugar después a una población pura de EpSC. Al seleccionar el diámetro, la contaminación por células adultas se reduce al mínimo.

Preferentemente, las EpSC se purifican de células contaminantes a través de una etapa de selección en condiciones de fijación baja, por lo que se seleccionan células no adherentes que forman cuerpos esféricos (epidermoesferas). Dichas epidermoesferas tienen preferentemente un radio de entre 10 y 1000 μm , más preferentemente de entre 25 y 250 μm . Cada esfera contendrá preferentemente entre 2 y 50 EpSC a los 7 días después del cultivo.

La caracterización de la composición celular obtenida que comprende EpSC se produce preferentemente evaluando la expresión de un marcador molecular elegido del grupo de CD29, CD44, CD49f, CD90, Ki67, p63 y caseína cinasa 2 β . En otro modo de realización, la composición celular comprende EpSC que son negativos para el marcador molecular CD105, Pan CK, Wide CK y/o CK18. Como tal, se puede verificar la naturaleza de las EpSC, así como la pureza de las células proporcionadas.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición celular de acuerdo con la reivindicación 9. Dicha composición celular comprende al menos un 90 % de EpSC viables derivadas de la capa epidérmica de piel de mamífero. Las células madre expresan p63 y al menos un marcador molecular elegido del grupo de CD29, CD44, CD49f, CD90, Ki67 y caseína cinasa 2 β y son negativos para al menos un marcador molecular seleccionado de CD105, CK18, Pan CK y/o Wide CK.

En un modo de realización preferente, las células son derivadas de equino. El sistema equino ha demostrado ser un sistema modelo excelente para propósitos de investigación y terapéuticos, ya que se parece mucho al sistema humano. Por lo tanto, en situaciones donde el uso de EpSC humanas específicas no se desea o no es posible, las EpSC derivadas de equino pueden proporcionar una alternativa adecuada.

En un aspecto final, la presente invención también se refiere a la composición celular o células diferenciadas de la misma para el tratamiento de lesiones de tejidos y/u órganos y/o para la regeneración de tejidos y/u órganos.

5 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **figura 1** representa las EpSC purificadas de acuerdo con la presente invención, en un estado de suspensión (figura 1A y 1B), cuando se siembran en condiciones de fijación ultrabaja y como células adherentes, cuando se preparan en placas en condiciones normales (figura 1C y 1D).

La **figura 2** representa los resultados de un ensayo de unidad formadora de colonias (UFC) con EpSC purificadas de acuerdo con un protocolo de la presente invención.

La **figura 3** representa los resultados de un ensayo de amplificación con EpSC purificadas de acuerdo con un protocolo de la presente invención.

Las **figuras 4, 5 y 6** muestran los resultados de un ensayo de diferenciación de queratinocitos con EpSC purificadas de acuerdo con la presente invención. Las EpSC antes de la diferenciación fueron predominantemente negativos para marcadores de queratinocitos específicos (figura 4A, C y E). Después del cultivo en un medio inductor de diferenciación de queratinocitos específico, las células diferenciadas mostraron una morfología alterada y fueron positivas para los marcadores de queratinocitos (figura 4B, D y F). El mismo cambio en la expresión de citoqueratina se pudo observar en las epidermoesferas después de 1 hora de adherencia (A) o en citospinas (B) (figura 5). Algunas de las células diferenciadas se identificaron como miocitos (figura 6).

La **figura 7** muestra los resultados de cultivar las EpSC obtenidas de acuerdo con la presente invención en un medio inductor de diferenciación adipogénico.

La **figura 8** muestra que la inmunocitoquímica con una caseína cinasa 2 β en la composición celular obtenida confirma la naturaleza epitelial de las células madre.

La **figura 9** representa la propagación de las epidermoesferas de acuerdo con un modo de realización de la presente invención, después de transferir desde una placa celular en condiciones de fijación baja (primer pocillo) a una placa de cultivo normal (pocillos posteriores) lo que permite la adherencia de las células. Las células muestran una velocidad de proliferación notable cuando se siembran en condiciones que permiten la fijación a un sustrato.

La **figura 10** representa experimentos de inmunocitoquímica de citoqueratina 18 (CK18) y Wide CK en EpSC humanas tanto indiferenciadas (negativas) como diferenciadas (positivas) purificadas de acuerdo con un modo de realización de la presente invención.

La **figura 11** representa la presencia de caseína cinasa 2 β , vimentina y Ki67 en EpSC epiteliales aisladas de una muestra humana de acuerdo con un modo de realización de la presente invención.

La **figura 12** muestra la presencia de vimentina y la ausencia de citoqueratina 18 (CK 18) en EpSC derivadas de humano y equino aisladas de acuerdo con la presente invención.

La **figura 13** muestra la presencia de vimentina y citoqueratina 18 (CK18) en células madre mesenquimales derivadas de humano y equino.

La **figura 14** muestra la evaluación de heridas macroscópicas tratadas con o sin composiciones celulares de acuerdo con un modo de realización de la presente invención. Imágenes macroscópicas del sitio de herida en diferentes puntos temporales (d = día) después de tratamiento con plasma rico en plaquetas (PRP) con (B, D y F) y sin (A, C y E) células madre epiteliales derivadas de la piel (EpSC). En cada punto temporal, la imagen izquierda representa las heridas A-C en el lado izquierdo del caballo y la imagen derecha las heridas D-F en el lado derecho. La tabla I representa el porcentaje de llenado de herida, calculado después de medir las áreas antes del tratamiento (después de inducción de herida a d0) y 30 días después (d30). En las heridas tratadas con EpSC/PRP, se llenó un área significativamente mayor en d30.

La **figura 15** muestra tinciones de hematoxilina-eosina (A-C y G-I) y Van Gieson (D-F) en muestras cutáneas intactas (A y D), grupo tratado con PRP (B y E) y grupo tratado con EpSC/PRP (C y F). La inflamación crónica se evaluó por una infiltración de células plasmáticas y linfocitos leve (G), moderada (H) o abundante (I). Las barras de escala representan 1 mm (A-C), 200 μ m (D-F) y 100 μ m (G-I).

La **figura 16** representa la tinción inmunohistoquímica en las muestras cutáneas intactas (columna izquierda: A, D, G, J, M, P), grupo tratado con PRP (columna central: B, E, H, K, N, Q) y grupo tratado con EpSC/PRP (columna derecha: C, F, I, L, O, R). La caseína cinasa 2 β (A-C) y Ki67 (D-F) indican la localización de las EpSC, mientras que la citoqueratina Pan (CK) y Wide CK (G-I) muestran la localización de queratinocitos adultos. La neovascularización

se visualiza después de la tinción con el factor Von Willebrand (J-L). También se evaluaron la producción de elastina (M-O) y miofibroblastos positivos de actina del músculo liso (SMA) (P-R). Además de las barras de escala de "A, J, K y L", que son 100 μm , todas las barras representan 20 μm .

5 La **figura 17** muestra la expresión de Ki67 y caseína cinasa 2 β en EpSC indiferenciadas de acuerdo con la presente invención en cultivos adhesivos (A), epidermoesferas después de 1 hora de adherencia (B) y epidermoesferas en citospinas (C). Las barras representan 50 μm .

10 La **figura 18** muestra la expresión de p63 en células madre epiteliales indiferenciadas (EpSC) y queratinocitos diferenciados en cultivos adhesivos (A), epidermoesferas después de 1 hora de adherencia (B) y epidermoesferas en citospinas (C). Las barras representan 50 μm .

15 La **figura 19** muestra la expresión (aunque baja) de MHCI y la ausencia de expresión de MHCII en las EpSC. La expresión se analizó por medio de citometría de flujo. Los experimentos se realizaron en tres veces y con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como control positivo. La figura 19 muestra el promedio de los experimentos realizados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener una composición celular que comprende células madre epiteliales (EpSC) de piel de mamífero, por lo que dichas EpSC se derivan de la capa epidérmica. Debido a su naturaleza proliferativa y diferenciadora, estas composiciones se pueden usar para diversas aplicaciones, tales como el tratamiento de quemaduras, reconstrucción mamaria o generación de tejido.

25 A menos que se defina de otro modo, todos los términos usados en divulgar la invención, incluyendo términos técnicos y científicos, tienen el significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Por medio de una guía adicional, se incluyen definiciones de términos para apreciar mejor las enseñanzas de la presente invención.

30 Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

"Un", "una" y "el/la", como se usan en el presente documento, se refieren a referentes tanto singulares como plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. A modo de ejemplo, "un compartimento" se refiere a uno o más de un compartimento.

35 "Aproximadamente" como se usa en el presente documento en referencia a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, pretende englobar variaciones de $\pm 20\%$ o menos, preferentemente $\pm 10\%$ o menos, más preferentemente $\pm 5\%$ o menos, incluso más preferentemente $\pm 1\%$ o menos, y aún más preferentemente $\pm 0,1\%$ o menos de y desde el valor especificado, en la medida en que dichas variaciones sean apropiadas para realizar en la invención divulgada. Sin embargo, se debe entender que el valor al que se refiere el modificador "aproximadamente" también se divulga por sí mismo específicamente.

40 "Comprender", "que comprende" y "comprende" y "compuesto de" como se usa en el presente documento son sinónimos de "incluir", "que incluye", "incluye" o "contener", "que contiene", "contiene" y son términos inclusivos o abiertos que especifican la presencia de lo que sigue, por ejemplo, el componente y no excluyen ni impiden la presencia de componentes, rasgos, elementos, miembros, etapas adicionales no enumerados, conocidos en la técnica o divulgados en la misma.

45 La enumeración de intervalos numéricos por criterios de valoración incluye todos los números y las fracciones subsumidos dentro de ese intervalo, así como los criterios de valoración enumerados.

La expresión "% en peso" (porcentaje en peso), aquí y a lo largo de la descripción, a menos que se defina de otro modo, se refiere al peso relativo del componente respectivo basado en el peso global de la formulación.

50 En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para obtener una composición celular que comprende células madre epiteliales (EpSC) de piel de mamífero, por lo que dichas EpSC se derivan de la capa epidérmica, que comprende las etapas de:

- obtener una muestra de piel de mamífero;
- separar al menos parcialmente la capa epidérmica de la capa dérmica;
- obtener una suspensión celular de dicha capa epidérmica realizando al menos una etapa de disociación enzimática; y

- cultivar dicha suspensión celular en condiciones de fijación baja.

Preferentemente, las células madre epiteliales se derivan de la capa epidérmica. Por lo tanto, dependiendo de la naturaleza de la muestra de piel, el procedimiento incluye preferentemente una etapa de separación, por lo que la dermis se separa al menos parcialmente de la epidermis. Esta separación se puede producir solo mecánicamente, por el uso de, por ejemplo, fórceps, bisturí o pinzas o por el uso de agentes de disociación tales como enzimas. En un modo de realización, ambos procedimientos se pueden combinar.

Como se usa en el presente documento, el término "epitelio" quiere decir el recubrimiento celular de las superficies corporales internas y externas (cutánea, mucosa y serosa), incluyendo las glándulas y otras estructuras derivadas de ellas, por ejemplo, queratocitos, células esofágicas, epidérmicas y células epiteliales del folículo piloso. Otro tejido epitelial ejemplar incluye: epitelio olfativo, que es el epitelio pseudoestratificado que recubre la región olfativa de la cavidad nasal, y que contiene los receptores para el sentido del olfato; epitelio pulmonar, que recubre el interior de los pulmones y los alvéolos; epitelio glandular, que se refiere al epitelio compuesto de células secretoras; epitelio pavimentoso, que se refiere al epitelio compuesto de células similares a placas planas. El término epitelio también se puede referir a epitelio de transición que se encuentra recubriendo característicamente las vísceras huecas que se someten a un gran cambio mecánico debido a contracción y distensión, por ejemplo, el tejido que representa una transición entre epitelio cilíndrico y pavimentoso estratificado. El término "epitelización" se refiere a la cicatrización por el crecimiento de tejido epitelial sobre una superficie desnuda.

Por "piel" se entiende la cubierta protectora externa del cuerpo, que consiste en la epidermis, la membrana basal y la dermis, y se entiende que incluye glándulas sudoríparas y sebáceas, así como estructuras del folículo piloso. En toda la presente solicitud, el adjetivo "cutáneo" se puede usar, y se debe entender que se refiere en general a atributos de la piel, según sea apropiado para el contexto en el que se usa.

Por "muestra cutánea" se entiende una muestra o biopsia de la piel, comprendiendo dicha muestra epidermis (que comprende estrato córneo, estrato lucídico, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal), la membrana basal y la dermis.

Por "epidermis" se entiende la capa más externa y no vascular de la piel, derivada del ectodermo embrionario, que varía en espesor de 0,07-1,4 mm. En las superficies palmar y plantar comprende, desde el exterior, cinco capas: capa basal compuesta por células cilíndricas dispuestas perpendicularmente; capa espinosa o de células espinosas compuesta de células poliédricas planas con procesos cortos o espinas; capa granulada compuesta de células granulares planas; capa transparente compuesta de varias capas de células claras transparentes en las que los núcleos están mal definidos o ausentes; y capa córnea compuesta de células no nucleadas, planas y conificadas. En la epidermis de la superficie corporal general, la capa clara normalmente está ausente. Un "epidermoide" es una célula o tejido que se parece a la epidermis, pero también se puede usar para referirse a cualquier tumor que se produce en un sitio no cutáneo y se forma por inclusión de elementos epidérmicos. Por "dermis" se entiende la capa más interna de la piel en animales vertebrados. La dermis se encuentra debajo de la epidermis y contiene terminaciones nerviosas y vasos sanguíneos y linfáticos. En mamíferos, la dermis también contiene folículos pilosos y glándulas sudoríparas.

Por "diferenciación" se entiende la formación de células que expresan marcadores que se sabe que están asociados con células que son más especializadas y están más próximas a convertirse en células diferenciadas terminalmente incapaces de una mayor división o diferenciación.

Por "célula de linaje diferenciado" se entiende una célula progenitora que ya no es pluripotente pero se ha inducido para diferenciarse en un tipo de célula específico.

Por "proliferación" se entiende un incremento en el número de células.

Por "agrupaciones no adherentes" se entiende que las células de la invención se pueden adherir entre sí y formar agrupaciones con un incremento en el tamaño a medida que proliferan las células, pero estas células no se adhieren al sustrato y crecen en suspensión, en la que el sustrato es plástico de cultivo tisular no recubierto o un recipiente de cultivo recubierto con un recubrimiento neutro tal como agar o gelatina.

Por "disociar una muestra" se entiende separar el tejido en células individuales, agrupaciones celulares más pequeñas o piezas de tejido más pequeñas.

De forma ideal, la epidermis se separará completamente de la dermis. En la práctica, esto es bastante difícil de realizar, ya que es difícil evitar un cierto grado de contaminación con células madre dérmicas. En un modo de realización de la presente invención, la proporción entre células madre epidérmicas epiteliales y células madre dérmicas en la composición celular obtenida estará preferentemente entre 80:20 y 100:0, más preferentemente entre 90:10 y 100:0. Más preferentemente, la presencia total de las células madre epidérmicas en la composición celular será más de un 95 %. La presencia o ausencia de células dérmicas en la composición celular obtenida se puede discernir por el uso de marcadores apropiados tales como, por ejemplo, pero sin limitación a citoqueratina (negativo

para células madre epidérmicas, positivo para células madre dérmicas), subunidad 2 β de caseína cinasa (Deshiere *et al.*, 2012), p63 y CD105. Los resultados de la citometría de flujo con el marcador CD105 en una composición celular obtenida a través de la presente invención muestran un porcentaje de células positivas para CD105 de un 5 % $\pm$ 3 % (resultados no mostrados). Esto se corresponde con la señal de fondo ya que las células negativas mostraron un resultado similar. Las figuras 11-12 muestran la presencia de la subunidad 2 β de caseína cinasa (figura 11) así como vimentina (figura 12) en EpSC derivadas de una muestra epidérmica humana. Las EpSC derivadas de humano y equino fueron negativas para citoqueratina 18 (CK18) (figura 12). Se demostró que las células madre mesenquimales eran positivas tanto para citoqueratina 18 como para vimentina (figura 13). Además, las EpSC equinas fueron positivas para p63 (figura 18), mientras que se ha informado de que las MSC son negativas para p63 (Lim *et al.*, 2012; Reinshagen *et al.*, 2011).

Los resultados demuestran la naturaleza distinta de las EpSC purificadas de acuerdo con la presente invención y muestran que se derivan predominantemente de la capa epidérmica.

El término "etapa de disociación enzimática" se debe entender como cualquier etapa, que implique una enzima o solución que comprende una enzima, que da como resultado una desconexión completa o parcial de las células normalmente presentes dentro de una estructura bidimensional o tridimensional dispuesta geométricamente, por ejemplo una muestra de tejido. Como resultado final, se obtiene finalmente una solución celular, que principalmente consiste preferentemente en células individuales y/o agrupaciones celulares. La disociación se produce preferentemente por rotura de los enlaces de adherencia intercelular de las células.

En un modo de realización de la presente invención, dicha etapa de disociación enzimática implica una etapa de tripsinización. Dicha etapa de tripsinización se debe realizar en condiciones que permitan una liberación de las uniones dermoepidérmicas seguido del desprendimiento de la epidermis de la dermis. La tripsinización se puede realizar a temperatura ambiente (20-25 °C) o a una temperatura menor o mayor (por ejemplo, 37 o 38 °C), durante un período de tiempo suficientemente largo para destruir las conexiones célula-célula.

Preferentemente, dicha etapa de disociación enzimática va seguida de una separación mecánica de la capa epidérmica de la dérmica. Después de dicha separación mecánica de la capa epidérmica de la dérmica, se puede obtener una suspensión celular, preferentemente por medio de una o más etapas de disociación enzimática.

En un modo de realización más preferente, dicha etapa de disociación enzimática incrementará el porcentaje de aislamiento de las células madre. Las soluciones enzimáticas adecuadas que se pueden usar para esta segunda etapa de disociación enzimática pueden comprender colagenasa tipo I, colagenasa tipo II, colagenasa tipo III, papaína y dispasa. Preferentemente, dicha segunda etapa de disociación enzimática comprende colagenasa tipo III.

En otro modo de realización, se incorpora una etapa de selección que permite seleccionar y aislar ese conjunto de células que finalmente dará lugar a la composición celular de las células madre epiteliales. Preferentemente, dicha selección presente en la suspensión celular se basa en el diámetro celular. La etapa de selección se produce antes del cultivo de la suspensión celular. En un modo de realización preferente, el diámetro celular de las células seleccionadas estará entre 5 y 150 μ m, más preferentemente entre 10 y 100 μ m. En un modo de realización, la selección se produce a través de la filtración de la solución celular con un filtro que tiene un tamaño de poro adecuado para la selección de células dentro del intervalo de diámetro celular deseado. En otro modo de realización, se puede realizar la selección a través de medios de separación de células, tales como un separador celular o citómetro de flujo. En general, se debe evitar la presencia de agrupaciones celulares, para eliminar el riesgo de contaminación con células adultas. Las agrupaciones celulares de células adultas pueden sobrevivir a las condiciones de baja adherencia durante la purificación.

El procedimiento de la presente invención incluye igualmente una etapa de cultivo de la solución celular en circunstancias de baja adherencia. Dichas "circunstancias de baja adherencia" se deben entender como las condiciones que permiten cultivar células en suspensión, preferentemente para la propagación de dichas células, por lo que la adherencia de las células a un sustrato se reduce al mínimo. Más específicamente, se refiere al uso de equipo de cultivo de tejidos especialmente diseñado, tal como placas o matraces, que evita las interacciones hidrófobas e iónicas de las células con un sustrato. Dichas condiciones se pueden obtener, por ejemplo, proporcionando al equipo de cultivo de tejidos una capa de hidrogel que es hidrófila y con carga neutra. Por lo tanto, cuando se cultivan en estas condiciones, las células se mantendrán en suspensión. Las placas de fijación ultrabaja son fácilmente conocidas y están disponibles comercialmente. Las células madre, mucho más que otras células, tienen la capacidad de sobrevivir y proliferar en estas condiciones de fijación ultrabaja. Poco después del cultivo, las células madre comenzarán a formar agrupaciones de células esféricas en el medio celular, llamadas epidermoesferas (*cfr.* cuerpos embrioides de células madre embrionarias). Dichas epidermoesferas tienen preferentemente un radio de entre 10 y 1000 μ m. Preferentemente, dichas epidermoesferas contienen de 2 a 50 EpSC a los 7 días de cultivo.

Preferentemente, las células se sembrarán en un medio (medio EpSC), específicamente optimizado para el cultivo y la proliferación de EpSC. En un modo de realización de la presente invención, este medio celular comprenderá factores de crecimiento, seleccionados del grupo que comprende FGF, bFGF y/o EGF. El enriquecimiento y la

selección de las células no adherentes resultantes se producen por la obtención del medio EpSC que comprende las epidermoesferas, la centrifugación y la retirada de sobrenadante (junto con células muertas y restos), resuspensión de las células en el medio EpSC y posterior siembra en placas de fijación ultrabaja. Al repetir esta ronda de purificación, finalmente se obtendrá una población altamente pura de EpSC. Dependiendo del nivel de pureza deseado de las EpSC, se pueden desear varias rondas de multiplicación.

En un modo de realización preferente, el cultivo en condiciones de adherencia ultrabaja se produce durante un mínimo de 7 días.

En general, la población obtenida de células no adherentes comprende al menos un 90 % de células madre epiteliales. Más preferentemente, la población celular obtenida comprenderá al menos un 95 % de células madre epiteliales, incluso más preferentemente al menos un 99 %. En un modo de realización más preferente, la población celular obtenida consistirá en células madre epiteliales puras al 100 %.

Si es deseable (por ejemplo, cuando el rendimiento de las células madre es bajo), se puede producir multiplicación de la composición celular obtenida de EpSC al sembrar las células en condiciones adherentes. Esto último permite la multiplicación de las células. La figura 9 muestra la placa de propagación y proliferación notable de epidermoesferas cuando se transfiere a una placa de fijación baja a una placa que permite la adherencia de las células. La propagación y proliferación celular se pueden discernir después de no menos de 3 horas.

Para determinar que de hecho se ha obtenido una composición celular pura de EpSC, la composición celular obtenida se someterá a prueba por el uso de marcadores adecuados. En un modo de realización de la presente invención, la composición celular comprende EpSC que expresan al menos un marcador molecular elegido del grupo de CD29, CD44, CD49f, CD90, Ki67, p63 y caseína cinasa 2β. Además, en otro modo de realización, la composición celular comprende EpSC que son negativas para el marcador molecular CD105, Pan CK, Wide CK y/o CK18.

Preferentemente, dichas EpSC son además ligeramente positivas para MHC I y negativas para MHC II (véase la figura 19).

En el modo de realización más preferente, se somete a prueba una combinación de marcadores tanto positivos como negativos para llegar a un resultado concluyente. Esto último permite distinguir la naturaleza de las EpSC aisladas y purificadas, y establecer la pureza de la muestra obtenida. Las células que no cumplen con la presencia y/o ausencia de los marcadores mencionados anteriormente no se deben considerar como EpSC (pero pueden ser, por ejemplo, MSC o células adultas). Por el procedimiento de acuerdo con la presente invención, se puede obtener un rendimiento muy alto de población EpSC pura (hasta un 100 %). Esto último es de crucial importancia para cualquier aplicación posterior.

En otro modo de realización, las EpSC de la composición celular se pueden diferenciar hacia queratinocitos, miofibroblastos y adipocitos.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención se puede realizar en todos los tipos y orígenes del tejido epidérmico. Preferentemente, la piel de mamífero será la base de la composición celular obtenida. Dicha piel de mamífero se puede obtener, por ejemplo, a partir de, pero sin limitarse a, humanos, ratones, perros, gatos, ovejas, vacas, cerdos, caballos, conejos, ratas, cobayas, otros roedores, etc.

En uno de los modos de realización preferentes, las EpSC se aíslan y se purifican de un sujeto humano. En otro modo de realización preferente, el aislamiento se produce a partir de muestras derivadas de equino. Diversas razones favorecen el uso de muestras de piel equina para el protocolo de aislamiento y purificación, con o sin extrapolación del protocolo a otras especies animales después. En primer lugar, la piel de los caballos tiene un gran parecido con la piel humana, mucho más que otros animales. A diferencia de caballos y humanos, los ratones no poseen glándulas sudoríparas apocrinas (Sundberg, 2004), las vacas tienen una capa dérmica bastante gruesa y los perros tienen un subcutis más desarrollado. Además, se descubrió por los inventores que todos los protocolos desarrollados para el aislamiento y purificación de EpSC de humano o equino se podían extrapolar fácilmente a las otras especies (de humano a equino y viceversa). En segundo lugar, las muestras de piel equina son fáciles de obtener a través de recogida en matadero. En tercer lugar, en caballos así como en humanos, la cicatrización por segunda intención consiste en 4 fases comparables (inflamación-granulación-contracción-epitelización) (Singer y Clarck, 1999; Wilmink *et al.*, 1999a&b). Por último, en lo que se refiere al uso de las EpSC derivadas de equino: las heridas extendidas de las extremidades distales son una de las patologías dermatológicas más comunes en caballos y tienden a tener un largo período de recuperación y una respuesta mala a tratamientos convencionales (Wilmink *et al.*, 1999a). Por todos estos motivos, se consideró el caballo como uno de los modelos ideales para la investigación de células madre epiteliales y posibles ensayos clínicos posteriores en general, y para aislar EpSC de acuerdo con la presente invención. La muestra obtenida se puede derivar de diversas partes del cuerpo, por ejemplo, extremidades, el tronco, el prepucio, la cabeza, epitelio pulmonar e intestinal, epitelio olfativo, etc.

En otro aspecto, la composición celular o células diferenciadas de la misma pueden servir como tratamiento de lesiones de tejidos y/u órganos y/o para regeneración de tejidos y/u órganos. Preferentemente, dicho tejido u órgano

es de origen ectodérmico, mesodérmico o ectomesodérmico. Los ejemplos de posibles tejidos u órganos son, pero no se limitan a, tejido cutáneo, tejido mamario, glándula mamaria, nervios, tejido óseo, tejido cartilaginoso, tejido muscular, tejido de tendón o ligamento. La composición celular o células diferenciadas de la misma obtenidas por la presente invención permitirán, por ejemplo, intervenciones de medicina regenerativa y cosmética, por ejemplo, para la regeneración tisular y/o regeneración capilar. Otros propósitos podrían incluir la revitalización de tejido cicatricial o tratamiento de quemaduras. En otro aspecto, la composición celular o células diferenciadas de la misma de acuerdo con la presente invención se pueden usar en el tratamiento de una gran cantidad de enfermedades. La disfunción del epitelio de las vías respiratorias, por ejemplo, puede dar lugar a diferentes patologías pulmonares; se han sugerido las células madre como posible tratamiento para bronconeumonía bacteriana, fibrosis quística, síndrome de dificultad respiratoria aguda, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar y edema pulmonar (Roomans, 2010). Puesto que en el pasado las células madre epiteliales eran demasiado difíciles de obtener e identificar, los investigadores prefirieron tratar estas enfermedades con células madre mesenquimales, porque son bien conocidas y están ampliamente caracterizadas. También se han puesto células madre intestinales (epiteliales) en el origen de patologías intestinales, tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (Gersemann *et al.*, 2011), pero hasta la fecha solo se ha informado de tratamientos con células madre mesenquimales para estas enfermedades (Dalal *et al.*, 2012). Además, el uso de células madre mesenquimales incluso se ha descrito para la reparación de la epidermis durante cicatrización en ratones (Chen *et al.*, 2012). Sin embargo, para regenerar completamente todo tipo de tejidos epiteliales, el aislamiento, purificación y después las aplicaciones clínicas de las células madre epiteliales son indispensables.

Otros campos de aplicación de la presente invención implican el tratamiento de displasias ectodérmicas, moniletrix, síndrome de Netherton, enfermedad de Menkes, epidermólisis ampollosa hereditaria y alopecias. Además, los aumentos o reconstituciones de pecho se podrían tratar por la composición celular descrita en la presente invención. Otra posible aplicación terapéutica implica el tratamiento de trastornos cartilaginosos y musculares (líneas mesodérmicas).

Por lo tanto, la composición celular de acuerdo con la presente invención o células diferenciadas de la misma se pueden usar para la fabricación de un medicamento frente a las enfermedades y afecciones mencionadas anteriormente. La composición de EpSC se puede diferenciar en células de linaje diferenciado, tales como queratinocitos, miocitos, melanocitos o adipocitos, dependiendo de la adición de medio celular específico complementado con factores de crecimiento y agentes de diferenciación adecuados.

En un modo de realización, dichas EpSC de la composición celular se pueden diferenciar hacia queratinocitos, miofibroblastos, melanocitos y adipocitos. Por lo tanto, la presente invención se refiere igualmente a queratinocitos, melanocitos, adipocitos y/o miofibroblastos derivados de una composición celular de acuerdo con la presente invención, por lo que la composición celular es obtenible preferentemente de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.

Dichos queratinocitos se pueden caracterizar porque expresan CK18, Pan CK, Wide CK y p63. Preferentemente, dichos queratinocitos presentan una morfología adoquinada. Además, la presencia del marcador CK2 β (normalmente presente en las EpSC) disminuye considerablemente tras diferenciación (figura 17). Dichos adipocitos se pueden caracterizar por que presentan una morfología redonda o redondeada con la presencia de gotitas de lípidos en las células (visualizadas por tinción con Oil Red O, figura 7). Dichos miofibroblastos de acuerdo con la presente invención son positivos para los marcadores moleculares vimentina y actina del músculo liso (figura 6). Preferentemente, presentan una morfología tubular o similar a tubular.

Esto prueba la naturaleza multipotente de las células madre obtenidas. Como tal, la composición celular de acuerdo con la presente invención permite la regeneración de una amplia gama de tipos celulares que se puede usar en una gran cantidad de aplicaciones.

La invención se describe además por los siguientes ejemplos no limitantes que ilustran además la invención, y no se pretende, ni se debe interpretar, que limiten el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

Aislamiento y purificación de células madre epiteliales cutáneas, por ejemplo, aisladas del cuello

Protocolo de aislamiento

- Tomar al menos 1 cm² de piel de mamífero, después del recorte y la preparación quirúrgica (lavado con yoduro y desinfección con etanol al 70 %) del sitio de muestreo.

○ Tratar la muestra de tejido con una solución de tripsina-EDTA al 0,25 % a una temperatura igual a o inferior a la temperatura ambiente, durante un mínimo de 1 hora o hasta que las células hayan obtenido el intervalo de disociación deseado (suspensión celular individual, liberación de uniones dermoepidérmicas).

- 5 • Pelar la piel (retirar la epidermis de la dermis) y retirar el pelo si está presente
- Cortar la epidermis en piezas pequeñas
- 10 • Opcionalmente: segunda etapa de disociación enzimática con collagenasa III al 0,2 % -2 % (168,000 unidades/g). Esto incrementará el porcentaje de aislamiento.
- Inactivar la collagenasa III añadiendo medio celular (por ejemplo, medio EpSC: DMEM/F12, 20 % FBS, 2 % P/S/F, 10-20 ng/ml hr-bFGF, 10-20 ng/ml EGF) Filtrar la suspensión a través del filtro con un intervalo de diámetro de $\geq 10 \mu\text{m}$ y $\leq 100 \mu\text{m}$. La selección basada en el diámetro mejora la pureza de la suspensión celular.
- 15 • Lavar las células con medio EpSC. Repetir varias veces si se desea.

Protocolo de purificación

- 20 • Filtrar la solución celular con un filtro que varía en diámetro de $\geq 10 \mu\text{m}$ y $\leq 100 \mu\text{m}$.
- Contar y sembrar las células (aproximadamente 10^6 células) directamente en un pocillo de una placa de fijación ultrabaja en medio EpSC para la purificación de las EpSC (pocillo A) (figura 1, suspensión).
- 25 • El día 2:
- ⇒ Actualizar el medio EpSC por centrifugación a 350G durante 7 minutos y retirar el sobrenadante.
- ⇒ Resuspender las células y sembrar en placa de fijación ultrabaja
- 30 ⇒ Repetir al menos una vez
- ⇒ Si no hay suficientes EpSC después de la purificación, cultivar todas las EpSC directamente en una placa de cultivo de tejido para la multiplicación de las EpSC antes de poder realizar más experimentos (figura 1, adherencia).
- 35 De otro modo, disociar las epidermoesferas usando tripsina-EDTA al 0,25 % y posteriormente filtrarlas a través de un filtro estéril con un intervalo de diámetro de $\geq 10 \mu\text{m}$ y $\leq 100 \mu\text{m}$ para experimentos adicionales.

Caracterización de EpSC derivada de piel

40 1) Reactivos necesarios para la diferenciación

- Medio de diferenciación de queratinocitos:
 - 45 ○ DMEM/F12
 - 20 % FBS
 - 2 % P/S/F
 - 50 ○ 5 $\mu\text{g/ml}$ insulina
 - 1 $\mu\text{g/ml}$ hidrocortisona 0,1 mM beta-mercaptoetanol
- Medio inductor adipogénico:
 - 55 ○ DMEM
 - Suero de conejo al 15 %
 - 60 ○ 2 % P/S/F
 - Dexametasona 10 μM

- 0,5 mM 3-isobutil-1-metil-xantina 10 µg/ml insulina humana recombinante (rh)
- 0,5 mM indometacina

2) Crear suspensión de células sueltas

Llevar las epidermoesferas de la placa de fijación ultrabaja a un tubo de 15 ml. Las siguientes pruebas se pueden realizar con o sin amplificación en un recipiente de cultivo adherente primero para incrementar el número de células si hubiera una escasez de EpSC. La figura 9 representa la tasa de proliferación notable de EpSC cuando se cultiva en condiciones normales que permiten la unión del sustrato. Simplemente después de 3 horas de cultivo, la propagación de las células es observable.

Si existen suficientes epidermoesferas:

- Tripsinizar las EpSC con tripsina-EDTA al 0,25 % durante 10 minutos a 37 °C.
- Pasar las células a través de un filtro estéril con un intervalo de diámetro de $\geq 10\mu\text{m}$ y $\leq 100\mu\text{m}$ para experimentos adicionales.
- Contar las células para su uso posterior

2a) Ensayo de UFC

Cultivar 10 EpSC/6 pocillos en 3 pocillos de un recipiente de cultivo adherente y 10 EpSC/6 pocillos en 3 pocillos de una placa de fijación ultrabaja Corning (placa ULA).

- Para las UFC adheridas: fijar y teñir con violeta cristal si se desea visualización.
- Para las UFC tanto adheridas como esféricas: contar las UFC.
- Frecuencia de UFC = $n.^{\circ} \text{ UFC} / n.^{\circ} \text{ células cultivadas} \times 100$.

Al sembrar un pequeño número de células (10-100, pero en este caso 10) en una superficie relativamente grande, después de aproximadamente 1 semana (6-9 días) es posible contar el número total de unidades formadoras de colonias (UFC) que se formaron. Puesto que se supone que cada célula madre puede formar una UFC, el número total de UFC representa el índice de autorrenovación de las EpSC y el número de células madre presentes. Para cultivar 10 EpSC se descubrió que aproximadamente 10 UFC se formaron en adherencia (figura 2: el comienzo de una UFC arriba a la izquierda, y la fase final abajo a la izquierda), así como en suspensión. Estas pruebas se realizaron en tres mamíferos, cada una por triplicado. Las barras presentan 100 µm.

2b) Ensayo de amplificación

Cultivar 1000 células/6 pocillos en 3 pocillos de una placa de fijación ultrabaja Corning (placa ULA). Evaluar (recuento de epidermoesferas/pocillo y recuento de EpSC/epidermoesfera) los días 1, 4 y 7.

Se propone un procedimiento para potenciar la proliferación de las EpSC derivadas de epidermoesferas en un recipiente de cultivo no recubierto. Después de cultivar 1000 EpSC, el primer día, ya se notó un gran número de epidermoesferas y cada esfera contenía varias EpSC (figura 3). Aunque el número promedio de esferas permaneció igual durante el período de cultivo de una semana, el número de EpSC varió considerablemente (figura 3). Al sembrar las epidermoesferas en superficies recubiertas de cultivos celulares, las esferas se unieron y parecieron multiplicarse de forma más rápida que en suspensión (figura 9).

2c) Diferenciación

Diferenciación hacia células epiteliales adultas y miocitos

Cultivar 5000 células por placa de cultivo de 4 o 24 pocillos (esto también se puede realizar en recipientes de cultivo más pequeños o más grandes, siempre y cuando la concentración inicial permanezca igual).

A) CONTROL EPITELIAL

Cultivar durante 10 días y actualizar dos veces por semana con el medio EpSC en la placa de 4 o 24 pocillos.

B) DIFERENCIACIÓN DE QUERATINOCITOS

- Cultivar durante 10 días y actualizar dos veces por semana con medio de diferenciación de queratinocitos en la placa de 4 o 24 pocillos.

5 • Inmunocitoquímica

⇒ PanCK (ratón, 1:50)

⇒ Wide CK (conejo, 1:50)

10 ⇒ CK18 (ratón, 1:30)

⇒ SMA (ratón, 1:200)

15 ⇒ Vimentina (ratón, 1:100)

⇒ Caseína cinasa 2β (conejo, 1:50)

⇒ p63 (conejo, 1:200)

20 ⇒ Isotipo PRRSV (ratón, 1:50)

⇒ Isotipo HSA (conejo, 1: 200)

25 La inmunocitoquímica realizada en las EpSC indiferenciadas mostró una monocapa confluyente de células fusiformes sin una señal positiva convincente para citoqueratina (CK)18, PanCK y Wide CK (figura 4A, C y E) y una señal positiva fuerte para caseína cinasa 2β (figura 8).

Los controles de isotipos relevantes también fueron negativos. Las barras presentan 50 μm.

30 Después del cultivo en el medio inductor de diferenciación de queratinocitos, las células adquirieron una forma más estrellada con una fuerte positividad para los marcadores de células epiteliales adultas, CK18, PanCK y Wide CK (figura 4B, D y F). En suspensión, se pudo notar la misma tendencia (figura 5). Después de la diferenciación de queratinocitos, la expresión de Ki67 y caseína cinasa 2β disminuyó claramente (figura 17). Se ha informado previamente de que las células madre embrionarias regulan por incremento fuertemente la expresión de CK18 durante la diferenciación epitelial. En el presente estudio, las EpSC y las células diferenciadas expresaron p63, que es un factor de transcripción esencial para el desarrollo epitelial, la proliferación y la diferenciación (figura 18). El control de isotipos relevantes permaneció negativo lo que indicó una unión específica de los anticuerpos mencionados anteriormente. Las barras presentan 50 μm.

40 En el medio de diferenciación de queratinocitos, algunas EpSC se estiraron longitudinalmente con la presencia de actina del músculo liso (SMA) y vimentina (Vim), probablemente debido a la adición de beta-mercaptoetanol. Estos marcadores confirmaron que estas células eran probablemente miocitos (figura 6). Las barras presentan 50 μm.

45 • Diferenciación hacia adipocitos

- *Cultivar 5×10^4 células/cm² en 4 pocillos de una placa de cultivo de 4 pocillos.*

50 ○ A) CONTROL EPITELIAL

- Cultivar durante 3 días en medio EpSC en la placa de 4 o 24 pocillos.

• B) DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA

55 ○ Cultivar durante 3 días en medio inductor adipogénico en la placa de 4 o 24 pocillos.

El cultivo en un medio inductor de diferenciación adipogénico, transformó las EpSC en células redondas con muchos gránulos que ya se podían observar con luz microscópica (LM). Después de realizar una tinción con Oil Red O (ORO), se confirmó la presencia de lípidos (figura 7). Como control, las EpSC se cultivaron en su medio de mantenimiento normal durante el mismo período y también se realizó el mismo procedimiento de tinción (figura 7).

60 **2d) Citometría de flujo**

Cultivar al menos 5×10^4 EpSC/matraz T_{75} en un matraz.

- Tripsinizar a una confluencia de un 70-80 % y realizar la CITOMETRÍA DE FLUJO con los siguientes MARCADORES: Ki67, CD29, CD44, CD49f, CD90, MHC I, MHC II y CD105

Las células derivadas de epidermoesferas fueron considerablemente positivas (aproximadamente 99 ± 1 %) para los siguientes marcadores de EpSC: CD29, CD44, CD49f y CD90. Puesto que estos marcadores también pueden estar presentes en las células madre mesenquimales (MSC), se sometieron a prueba con un marcador específico para MSC, CD105. Este marcador fue negativo en nuestras EpSC. Las EpSC también fueron negativas para MHC II, bajas en MHC I (figura 19) y positivas para el marcador de proliferación Ki67, lo que indicó la baja inmunogenicidad de las células aisladas y el estado de alta división en que estaban las células aisladas. Todos los marcadores se sometieron a prueba en paralelo a los controles de isotipos relevantes para excluir una unión específica de anticuerpos.

Ejemplo 2: Purificación de EpSC de una muestra de piel de caballo de las extremidades

Al usar el procedimiento como se explica en la presente invención y el protocolo detallado en el ejemplo 1, las EpSC se podrían purificar de una muestra de piel equina. Las capas de células epiteliales y dérmicas se separaron antes de la disociación de las células. Se obtuvo un rendimiento puro de EpSC, como se confirmó por la presencia de los marcadores de células madre epiteliales Ki67, CD29, CD44, CD49f, CD90, p63 y/o CK2 β . Las células fueron bajas en MHC I y negativas para los marcadores CD105, MHC II y CK18 que reaccionaron de forma cruzada con células madre mesenquimales equinas. Por otra parte, se descubrió que el marcador p63, típicamente ausente en las MSC, estaba presente en las EpSC (figura 18). Por lo tanto, esto último demostró nuevamente la naturaleza epitelial específica de las células aisladas.

Ejemplo 3: Purificación de EpSC de tejido epitelial olfativo de ratones y ratas adultos

Las EpSC se pueden purificar a partir de órgano vomeronasal y epitelio olfativo de ratones y ratas adultos usando los procedimientos descritos en los ejemplos 1 y 2.

Los ratones y ratas adultos se anestesiaron con una sobredosis de somnitol y a continuación se decapitaron. Los epitelios de órganos olfativos y vomeronasales se extrajeron del cornete y tabique nasal y se incubaron en medio EpSC antes del resto del procedimiento de purificación. Los epitelios se disociaron enzimática y mecánicamente como se describe en el ejemplo 1. Las células se sembraron en placas en condiciones de fijación ultrabaja. Se formaron pequeñas agrupaciones de epidermoesferas y se vieron flotando en el medio. Las células purificadas de epitelios olfativos adultos son autorrenovadoras y multipotentes, y por tanto son EpSC.

Ejemplo 4: Purificación de EpSC de lengua de ratón

Las EpSC también se podrían derivar de los epitelios de la lengua. La lengua se diseccionó para retirar la capa epitelial que contiene los receptores sensitivos y sus células basales subyacentes. Esta capa de tejido se disoció para producir células individuales y las células individuales se sembraron en matraces que contenían medio EpSC, como se describe en el ejemplo 1. Después de dos a tres días en una estufa de incubación de cultivos de tejido con CO₂ al 5 % a 37 °C, más de un 99 % de las células en el cultivo estaban muertas o muriendo. Finalmente, se obtuvo una composición pura de EpSC. Estas EpSC se pueden pasar usando las mismas técnicas que se usan para las células madre multipotentes derivadas de la piel de mamíferos como en el ejemplo 1.

De manera similar, las EpSC se pueden diferenciar en queratinocitos o adipocitos usando las técnicas descritas en el presente documento.

Ejemplo 5: Purificación de EpSC de piel de ratón

Se aisló piel de ratones neonatales de 3-15 días, la capa epidérmica se retiró de la capa dérmica, se disoció y se cultivó en matraces de fijación ultrabaja con medio EpSC. Una pequeña población de células proliferó y formó agrupaciones celulares pequeñas que crecían en suspensión, las epidermoesferas.

Posteriormente, estas agrupaciones más grandes se aislaron, se disociaron y se pasaron. Por este proceso de adherencia selectiva, se obtuvieron poblaciones sustancialmente puras de agrupaciones flotantes. Estas agrupaciones finalmente dieron lugar a una población pura de EpSC como se confirmó por algunos de los marcadores como se analiza en el ejemplo 1. Se obtuvieron resultados similares usando piel de ratones adultos.

Ejemplo 6: Purificación de EpSC de piel humana adulta

Las EpSC se purificaron de la piel de un antebrazo humano y del cuero cabelludo humano o piel abdominal. Se usaron muestras cutáneas de un total de 1 cm² o menos de cada uno de los ocho individuos. La piel incluyó tejido

dérmico y epidérmico. Antes de la purificación, la capa epidérmica se separó de la capa dérmica. Las EpSC se purificaron específicamente de la capa epidérmica.

El tejido se cortó en piezas más pequeñas y se disoció enzimáticamente de acuerdo con el ejemplo 1. Las células se sembraron en condiciones de fijación ultrabaja y se aislaron las epidermoesferas resultantes. La presencia de EpSC en la suspensión celular resultante se confirmó por los marcadores apropiados como se describe en la presente invención. Las células se pudieron diferenciar, por ejemplo, en queratinocitos y adipocitos, confirmando el estado multipotente de las EpSC purificadas. Las figuras 10 a 12 representan la detección de marcadores de EpSC derivadas de humano acuerdo con la presente invención. Se demostró que las EpSC humanas fueron positivas para caseína cinasa 2 β , vimentina y Ki67 (figura 11, figura 12 para vimentina solo) y para p63 (datos no mostrados). Se demostró que las EpSC purificadas fueron negativas para citoqueratina 18 (figura 12) y CD105, al contrario que con las células madre mesenquimales (figura 13). Las células madre mesenquimales fueron positivas tanto para citoqueratina 18 como para vimentina (figura 13).

Ejemplo 7: Estudio *in vivo*

a) Administración de EpSC

Después de la anestesia local y la preparación quirúrgica, se indujeron 6 heridas cutáneas de espesor total de aproximadamente 4 cm² en un caballo castrado de 5 años dorsalmente desde el músculo glúteo medio (3 en el lado izquierdo y 3 en el lado derecho). Tres heridas asignadas aleatoriamente recibieron EpSC putativas alógenicas (derivadas de una muestra de piel de caballo de acuerdo con el ejemplo 1) en combinación con PRP plasma rico en plaquetas autólogo (tratamiento EpSC/PRP) como vehículo, y las tres heridas restantes se trataron exactamente de la misma forma, pero sin EpSC putativas (inyección de PRP solo). El tratamiento EpSC/PRP consistió en 2 enfoques: primero, se realizó una inyección intradérmica (0,5 ml en cada uno de los 4 bordes de herida) de 1 ml de DMEM que contenía 8x10⁶ de EpSC putativas recién preparadas en el paso 3 en combinación con 1 ml de PRP (preparado como se describe previamente (Beerts *et al.*, 2013; Broeckx *et al.*, 2012)). Inmediatamente después, se realizó una aplicación tópica de 0,5 ml de DMEM que contenía 4x10⁶ de EpSC putativas y 0,5 ml de PRP. La aplicación tópica se repitió después de la absorción del líquido, que fue después de 24 horas. El tratamiento PRP se realizó exactamente de la misma forma; sin embargo, el DMEM no contenía EpSC en este grupo. Las heridas no se suturaron, sino que se cubrieron con un plástico adhesivo no absorbible en el que se hicieron microporos para permitir el acceso de oxígeno. El caballo estuvo atado en su establo durante 24 horas para evitar que se revuelque y se tomaron fotografías cada 3-4 días. Las heridas se midieron y las superficies se calcularon justo antes de los tratamientos y 30 días después del tratamiento por un veterinario con enmascaramiento doble. El diseño experimental se aprobó por el comité de ética.

b) Histología de secciones de tejido

El día 30, se tomaron muestras de tejido con una biopsia por punción de 8 mm en el centro de la herida (que cubre toda el área de herida). Posteriormente, las muestras se fijaron en formalina neutra tamponada al 10 %, se incluyeron en parafina, se seccionaron a un espesor de 4 μ m y se tiñeron con tinciones de hematoxilina y eosina, Van Gieson y elastina de acuerdo con los protocolos estándar.

Todas las muestras se analizaron con enmascaramiento por un anatomopatólogo (SM) certificado por ECVF usando un sistema de puntuación modificado, adaptado de Abramov (2007) y Babaeijandaghi (2010). En resumen, la epidermis se puntuó de acuerdo con el espesor (0-3), formación de costra (0-1), separación dermoepidérmica (0-2) y la reepitelización completa (0-3) (tabla I). Las secciones de piel de control positivo se originan en el mismo caballo y se hicieron a partir de muestras obtenidas en el momento de la inducción de la herida (y deberían obtener una puntuación máxima). La dermis se evaluó usando 6 parámetros principales: (i) edema (0-3); (ii) cantidad y morfología del estroma (espesor medido y puntuado 0-3, cantidad de colágeno y morfología de fibras de colágeno (finas/inmaduras, intermedias o gruesas/maduras) usando tinción de Van Gieson (VG) y puntuada 0-2, cantidad de elastina usando tinción elástica de Van Gieson (eVG) y puntuada 0-1), (iii) grosor y morfología del tejido de granulación (espesor medido y puntuado 0-3, maduración de fibroblastos puntuada 0-3), (iv) neovascularización (puntuada 0-3 y número promedio de capilares contados por 200 aumentos en el campo en la tinción inmunohistoquímica para el factor von Willebrand (vWF), (v) inflamación aguda/infiltrado neutrófilo (0-3), y (vi) inflamación crónica/infiltrado linfoplasmocitario (0-3). De nuevo, las muestras de control positivo obtendrían una puntuación máxima. El promedio de 3 campos se usó para evaluar diferentes parámetros histopatológicos y todas las mediciones se realizaron con un programa basado en ordenador (LAS V4.1, Leica Microsystems).

Tabla 1 Diferentes parámetros de cicatrización que se puntuaron en el presente estudio (adaptado de Abramov y Babaeijandaghi)

	PARÁMETRO		PUNTUACIÓN
EPIDERMIS	Acantosis		0 = grave (> 15 capas) o

	PARÁMETRO		PUNTUACIÓN
			moderado irregular,
			1 = moderado regular (10-15 capas),
			2 = leve (5-10 capas),
			3 = ninguno
	Costra		0 = presente,
			1 = ausente
	Separación dermoepidérmica		0 = multifocal a difusa,
			1 = focal,
			2 = ninguna
	Reepitelización		0 = ninguna,
			1 = escasa,
			2 = completo pero inmadura/fina,
			3 = completa y madura
DERMIS	Edema		0 = grave,
			1 = moderado,
			2 = leve,
			3 = ninguno
	Estroma	Cantidad de colágeno (tinción VG) + espesor dermis	0 = muy elevado,
			1 = moderadamente elevado,
			2 = levemente elevado,
			3 = normal
		Morfología del colágeno (tinción VG)	0 = mayormente amorfo,
			1 = mayormente fino ondulado,
			2 = mayormente grueso ondulado
		Cantidad de elastina (tinción eVG)	0 = no/escaso en tejido en reparación,
			1 = poco en tejido en reparación/reparado,
			2 = distribución normal y cantidad
		Fibroblastos en maduración	0 = ninguno,
			1 = leve,
			2 = moderado,
			3 = total
	Tejido de granulación	Cantidad + espesor medido	0 = abundante,
			1 = moderado,
			2 = leve,
			3 = ninguno

	PARÁMETRO		PUNTUACIÓN
	Neovascularización	Número de capilares por 200x de campo, (vWF IHQ)	0 = abundante (25-35 por 200x),
			1 = moderado (15-25 por 200x),
			2 = leve (hasta 15 vasos por 200x),
			3 = ninguno
	Inflamación aguda		0 = abundante,
			1 = moderada,
			2 = leve,
			3 = ninguna
	Inflamación crónica		0 = abundante,
			1 = moderada,
			2 = leve,
			3 = ninguna
VG = Van Gieson; vWF = Factor de Von Willebrand			

c) Inmunohistoquímica en secciones de tejido

Para localizar las células epiteliales dentro de la epidermis, se usaron glándulas cutáneas y folículos pilosos, Pan CK y Wide CK. La caseína cinasa 2 β y Ki67 indicaron dónde se localizaron las células epiteliales en proliferación. Para examinar el papel de las EpSC en la producción de elastina y la neovascularización, se tiñeron secciones de tejido con anti-IgG1 elastina bovina de ratón (Leica, clon BA-4, 1: 100) y anti-vWF humano de conejo (Dako, 1: 6400), respectivamente. Finalmente, se usaron vimentina y actina del músculo liso (SMA) para localizar los miofibroblastos. El inmunomarcado se logró con un kit de diaminobencidina de ratón o conejo de peroxidasa de rábano picante de alta sensibilidad (Envision DAB + kit, Dako) en un dispositivo de autoinmunotinción (Cytomation S/N S38-7410-01, Dako). Este kit también bloqueó la peroxidasa endógena. Se usó un diluyente de anticuerpo disponible comercialmente (Dako) con componentes reductores de fondo para bloquear las interacciones hidrófobas. Todas las muestras cutáneas (incluyendo controles positivos y negativos) se enviaron a la misma tinción inmunohistoquímica.

d) Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando la prueba de la t de Student bilateral para las comparaciones de grupo de variables distribuidas normalmente. Los valores se dan como medias $\pm$ desviación estándar (barras). Los valores de p se calcularon usando una hoja de cálculo de Excel (2007; Microsoft Corp., Redmond, WA, EE. UU.), y P < 0,05 se consideró una probabilidad de diferencia significativa entre grupos de muestras comparados.

f) Resultados

Las heridas se midieron el día de la inducción y de nuevo 30 días después (figura 14). A pesar de que el veterinario no percibió ninguna diferencia, se realizaron cálculos de superficie dividiendo el tejido de reparación restante en mm² entre el área de herida inicial en mm² x100. Esto reveló un promedio de un 79 % (100 % - cálculo de superficie) de la superficie de la herida que se llenó (granulación y epitelización) en el grupo tratado con EpSC/PRP, lo que fue significativamente diferente (P = 0,0083) de un 72 % para el grupo tratado con PRP (figura 14).

En todas las muestras cutáneas se constituyó una epidermis madura acantótica de normal a leve, con formación de costra (figura 15B, C, E y F) el día 30. Las mediciones de longitud basadas en imágenes revelaron una cantidad considerablemente mayor de colágeno y una dermis significativamente más gruesa (P = 0,017) en las muestras tratadas con PRP (7,4 $\pm$ 0,6 mm, figura 15B y E) en comparación con las muestras tratadas con EpSC/PRP (5,6 $\pm$ 0,9 mm, figura 15C y F) y de control positivo (5,7 $\pm$ 0,4 mm, figura 15A y D). Las heridas tratadas con PRP también contenían una cantidad considerablemente mayor de tejido de granulación (6,4 $\pm$ 0,4 mm) en comparación con las heridas tratadas con EpSC/PRP (5,1 $\pm$ 0,8 mm). En todas las muestras cutáneas, estaba presente una inflamación aguda leve (células polimorfonucleares) y en 5 de 6 casos se observó una inflamación crónica de leve (figura 15G) a moderada (figura 15H) (linfocitos y células plasmáticas) que se limitó principalmente a la región perivascular, aunque en algunos casos se extendió a las regiones intersticiales. En una muestra del grupo tratado con PRP, se pudo observar un número abundante de células inflamatorias en un área localizada (figura 15I). No

existieron diferencias significativas en la puntuación histopatológica en relación con el grado de edema y la morfología del estroma dérmico o tejido de granulación.

5 Cuando se evaluó la caseína cinasa 2 β y Ki67 (que fueron positivas en las EpSC y disminuyeron durante la diferenciación) solo algunas células en la capa de células basales epidérmicas y la transición de la papila dérmica a las regiones protuberantes del folículo piloso se tiñeron positivamente (figura 16A y D). Además, las heridas tratadas con EpSC/PRP revelaron áreas con muchas EpSC potenciales que se tiñeron positivamente para caseína cinasa 2 β (figura 16C) y Ki67 (figura 16F), mientras que las heridas tratadas con PRP contenían a lo sumo una única célula positiva por 400x de aumento de campo (figura 16B y E). Al evaluar diferentes marcadores de queratinocitos (Wide CK y Pan CK) en las secciones cutáneas intactas, las células epidérmicas y las células del folículo piloso y glándula aneal se tiñeron sin duda positivas (figura 16G). Al evaluar estos marcadores en estructuras similares a folículos, quedó claro que estas estructuras estaban más desarrolladas en el grupo tratado con EpSC/PRP (figura 16I) que en el grupo tratado con PRP (Figura 16H). La neovascularización se evaluó por medio de tinción del factor de Von Willebrand y, de forma considerable, pero no significativa ($P = 0,26$), se observó un mayor promedio de 31 ± 4 vasos sanguíneos por 200x de aumento de campo en las heridas tratadas con EpSC/PRP (figura 16L) en comparación con 23 ± 4 vasos en las heridas tratadas con PRP (figura 16K).

Mientras que la tinción con elastina general no reveló diferencias considerables entre las muestras cutáneas tratadas con EpSC/PRP y PRP (datos no mostrados), la inmunohistoquímica reveló una producción de elastina notablemente mayor alrededor de estructuras foliculares, que se parecen mucho a las estructuras de piel intactas (figura 16M) en el grupo tratado con EpSC/PRP (figura 16O), en comparación con una cantidad escasa de elastina en el grupo tratado con PRP (figura 16N). La tinción de actina del músculo liso (SMA) reveló una línea fina de células miógenas alrededor de los folículos pilosos y los vasos sanguíneos (figura 16P). Sorprendentemente, las heridas tratadas con PRP contenían áreas densas de células positivas para SMA en la dermis (figura 16Q), mientras que las heridas tratadas con EpSC/PRP solo revelaron una lámina fina de células miogénicas alrededor de las estructuras similares a folículos (figura 16R). La tinción de vimentina (datos no mostrados) confirmó que estas áreas positivas para SMA en el grupo tratado con PRP probablemente representaban áreas ricas en miofibroblastos.

REFERENCIAS

- Abramov Y, B Golden, M Sullivan, SM Botros, JJ Miller, A Alshahrour, RP Goldberg y PK Sand, 2007. Histologic characterization of vaginal vs abdominal surgical wound healing in a rabbit model. *Wound Repair Regen* 15:80-6.
- Babaeijandaghi F, I Shabani, E Seyedjafari, ZS Naraghi, M Vasei, V Haddadi-Asl, KK Hesari y M Soleimani, 2010. Accelerated epidermal regeneration and improved dermal reconstruction achieved by polyethersulfone nanofibers. *Tissue engineering. Part A* 16:3527-36.
- Beerts C, C Seifert, M Zimmerman, E Felix, M Suls, T Mariën, S Broeckx y JH Spaas. (2013). Desmitis of the accessory ligament of the equine deep digital flexor tendon: a regenerative approach. *Journal of Tissue Science & Engineering*. 4(1), 1-7.
- Broeckx S, M Zimmerman, D Aerts, B Seys, M Suls, T Mariën y JH Spaas. (2012). Tenogenesis of equine peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: in vitro versus in vivo. *Journal of Tissue Science & Engineering* S11-001, 1-6.
- Chen JS, Wong VW, Gurtner GC, 2012. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cutaneous wound healing. *Front Immunol*. 2012, 3:192.
- Dalal J, Gandy K, Domen J, 2012. Role of mesenchymal stem cell therapy in Crohn's disease. *Pediatr. Res*. 2012, 71 (4 Pt2): 445-51.
- Deshiere A, Duchemin-Pelletier E, Spreux E, Ciais D, Combes F, Vandenbrouck Y, Couté Y, Mikaelian I, Giusiano S, Charpin C, Cochet C, Filhol O, 2012. Unbalanced expression of CK2 kinase subunits is sufficient to drive epithelial-to-mesenchymal transition by Snail1 induction. *Oncogene*. May 7. doi: 10.1038/onc.2012.165.
- Draheim KM, Lyle S, 2011. Epithelial stem cells. *Methods Mol Biol* 750, 261-274. Fujimori Y, Izumi K, Feinberg SE, Marcelo CL, 2009. Isolation of small-sized human epidermal progenitor/stem cells by Gravity Assisted Cell Sorting (GACS). *J Dermatol Sci* 56, 181-187.
- Gerseman M, Stange EF, Wehkamp J, 2011. From intestinal stem cells to inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol*. 2011, Jul 21; 17(27):3198-203.
- Grandi F, Firmo BF, Colodel MM, Rocha RM, Werner J, Rocha NS, 2012. The importance of follicular stem cells in veterinary medicine in the context of skin tumours. *Vet Dermatol* 23, 81-82.

- Katwa LC, 2003. Cardiac myofibroblasts isolated from the site of myocardial infarction express endothelin de novo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H1132-H1139.
- Li JX, Zhang Y, Ma LB, Sun JH y Yin BY, 2009. Isolation and culture of bovine mammary epithelial stem cells. *Journal of Veterinary Medical Science*. Vol 71(1): 15-19.
- Li Juxue, Miao C, Jia L, Zhou J, Ma B, Pent S, Liu S, Cao Y y Duan E, 2008. Enrichment of putative human epidermal stem cells based on cell size and collagen type IV adhesiveness. *Cell Research* 18: 360-371.
- Lim MN, NH Hussin, A Othman, T Umapathy, P Baharuddin, R Jamal y Z Zakaria. (2012). Ex vivo expanded SSEA-4+ human limbal stromal cells are multipotent and do not express other embryonic stem cell markers. *Mol Vis* 18, 1289-300.
- Liu SC y Karasek M, 1978. Isolation and growth of adult human epidermal keratynocytes in cell culture. *Journal of Investigative Dermatology* Vol 71(2): 157-162.
- Marcelo CL, Peramo A, Ambati A y Feinber SE, 2012. Characterization of a unique technique for culturing primary adult human epithelial progenitor/stem cell. *BMC Dermatology* Vol 12(1): 8.
- Nowak JA, Fuchs E, 2009. Isolation and culture of epithelial stem cells. *Methods Mol Biol* 482, 215-232.
- Petersen OW, Ronnov-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ, 1992. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9064-9068.
- Reinshagen H, C Auw-Haedrich, RV Sorg, D Boehringer, P Eberwein, J Schwartzkopff, R Sundmacher y T Reinhard. (2011). Corneal surface reconstruction using adult mesenchymal stem cells in experimental limbal stem cell deficiency in rabbits. *Acta Ophthalmol* 89, 741-8.
- Roomans GM. 2010. Tissue engineering and the use of stem/progenitor cells for airway epithelium repair. *Eur Cell mater*. 2010 Jun 23; 19:284-99.
- Singer, A.J., Clark, R.A. (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341, 738-746.
- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM, 1999. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular Cell* Vol 4: 611-617.
- Sharifullina SZ, Teplyashin AS, Chupikova NI, Rotsovskaia MS, Vasyunina NY, Korjikova SV y Savchenkova IP, 2005. Comparative analysis of different cultures systems for the nong term cultivation of human epidermal stem cells. *Tissue Engineering*, Vol 12 (4): 1118.
- Spaas JH, Chiers K, Bussche L, Burvenich C, Van de Walle GR, 2012. Stem/progenitor cells in non-lactating versus lactating equine mammary gland. *Stem Cells and Development* 21, 3055-3067.
- Sundberg,P. (2004). "Skin and adnexa of the laboratory mouse,"in *The Laboratory Mouse*, edsH. Hedrich and G.Bullock (SanDiego, CA: Elsevier Academic Press), 195-206.
- Staniszewska M, Sluczanska-Glabowska S, Drukala J, 2011. Stem cells and skin regeneration. *Folia Histochem Cytobiol* 49, 375-380.
- Stingl J, Eaves CJ, Zandieh I, Emerman JT, 2001. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast cancer research and treatment* 67, 93-109.
- Wilmink, J.M., Stolk, P.W., van Weeren, P.R., Barneveld, A. (1999a). Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopic aspects. *Equine Vet J* 31, 53-60.
- Wilmink, J.M., van Weeren, P.R., Stolk, P.W., Van Mil, F.N., Barneveld, A. (1999b). Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. *Equine Vet J* 31, 61-67.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para obtener una composición celular que comprende células madre epiteliales (EpSC) de piel de mamífero, por lo que dichas EpSC se derivan de la capa epidérmica, que comprende las etapas de:

- separar al menos parcialmente la capa epidérmica de la capa dérmica; de una muestra cutánea
- obtener una suspensión celular de dicha capa epidérmica realizando al menos una etapa de disociación enzimática; y
- cultivar dicha suspensión celular en condiciones de fijación baja.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la etapa de seleccionar células en dicha suspensión celular en base al diámetro celular, antes de dicho cultivo de la suspensión celular.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** dicho diámetro celular de las células seleccionadas está entre 5 y 150 μm , más preferentemente entre 10 y 100 μm .

4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** dicha suspensión celular se cultiva en medio celular que comprende factores de crecimiento, elegidos del grupo que comprende FGF, bFGF y/o EGF.

5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la etapa de seleccionar células no adherentes.

6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado por que** dichas células no adherentes comprenden al menos un 90 % de células madre epiteliales.

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, que comprende la etapa de amplificar las células seleccionadas en condiciones adherentes.

8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por que** dicha composición celular comprende EpSC que expresan al menos un marcador molecular elegido del grupo de CD29, CD44, CD49f, CD90, Ki67, p63 y caseína cinasa 2 β y/o son negativas para el marcador molecular CD105, Wide CK, PAN CK y/o CK18.

9. Composición celular que comprende al menos un 90 % de EpSC viables derivadas de la capa epidérmica de piel de mamífero, **caracterizada por que** dichas células madre expresan p63 y al menos un marcador molecular elegido del grupo de CD29, CD44, CD49f, CD90, Ki67 y caseína cinasa 2 β y por lo que dichas EpSC son negativas para al menos un marcador molecular seleccionado de CD105, CK18, Pan CK y/o Wide CK.

10. Composición celular de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizada por que** dichas células madre epiteliales comprenden un diámetro de entre 5 y 150 μm , más preferentemente entre 10 y 100 μm .

11. La composición celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10 para su uso en el tratamiento de lesiones de tejidos y/u órganos y/o para la regeneración de tejidos y/u órganos.

12. La composición celular para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, por lo que dichas EpSC se diferencian hacia queratinocitos, adipocitos o miofibroblastos antes de dicho tratamiento o regeneración.

13. Epidermoesferas que comprenden EpSC, dichas EpSC expresan p63 y al menos un marcador molecular elegido del grupo de CD29, CD44, CD49f, CD90, Ki67 y caseína cinasa 2 β y por lo que dichas EpSC son negativas para al menos un marcador molecular seleccionado de CD105, CK18, Pan CK y/o Wide CK, por lo que dichas epidermoesferas forman cuerpos esféricos con un radio entre 10 y 1000 μm .

14. Epidermoesferas de acuerdo con la reivindicación 13, por lo que dichas epidermoesferas comprenden de 2 a 50 EpSC por epidermoesfera el día 7 del cultivo.

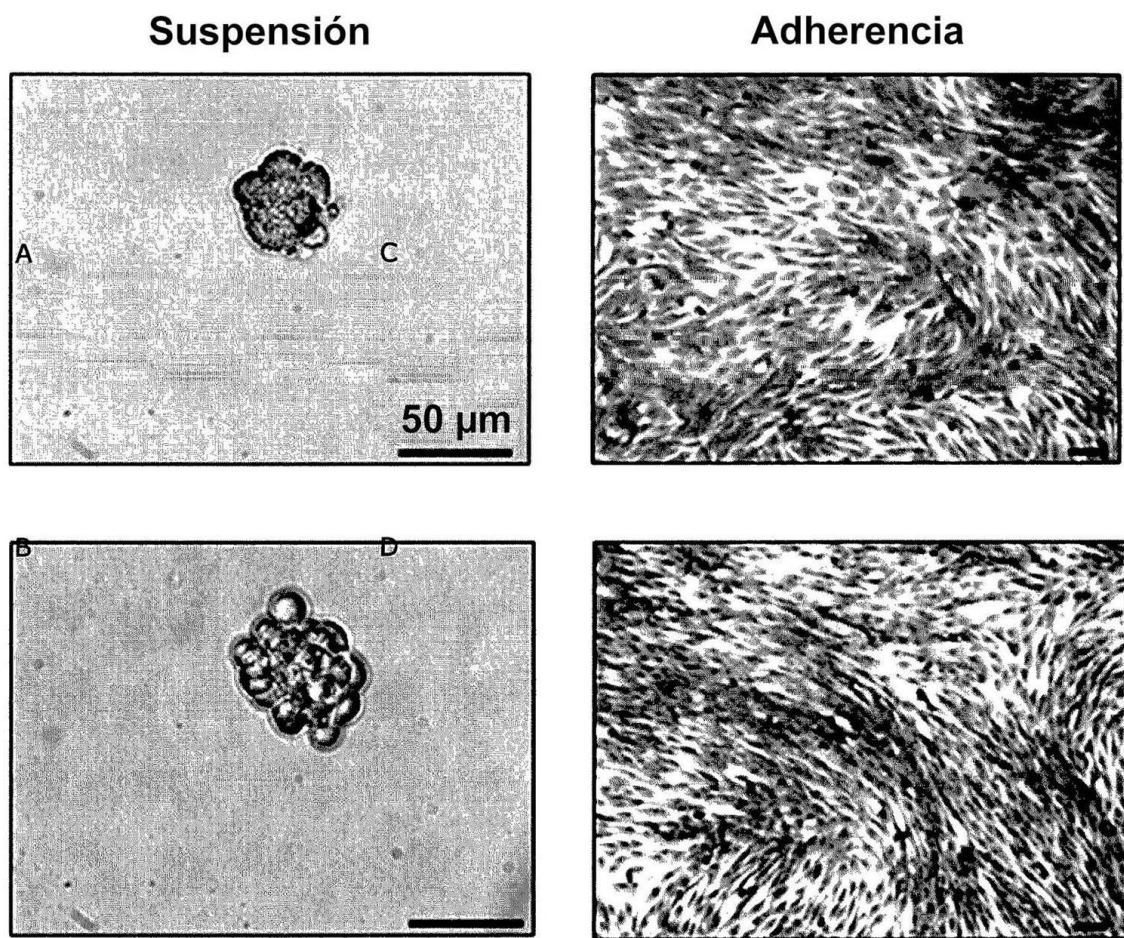
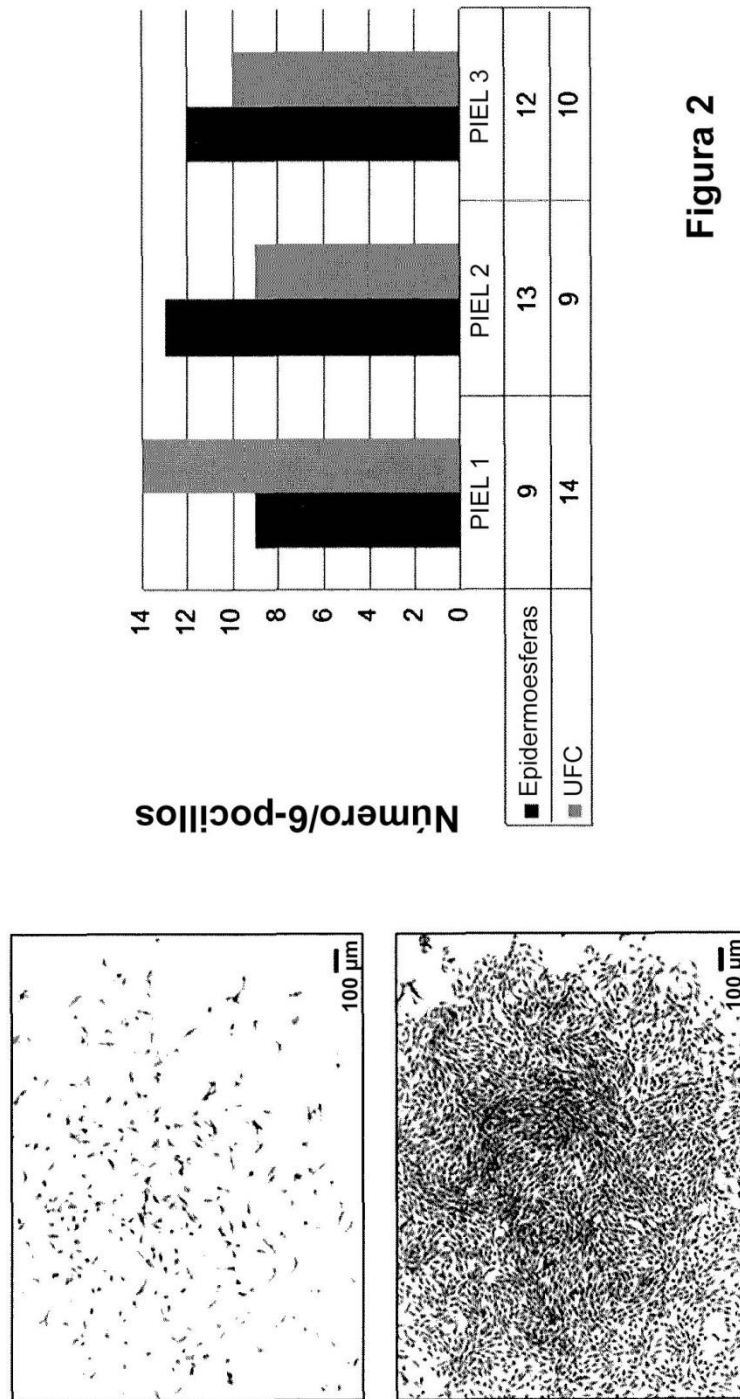


Figura 1



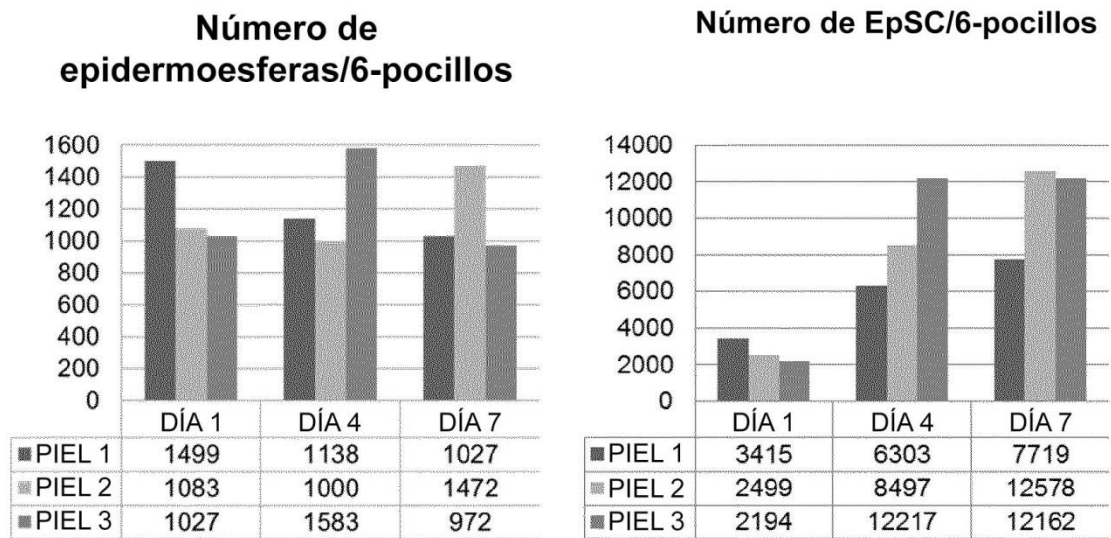


Figura 3

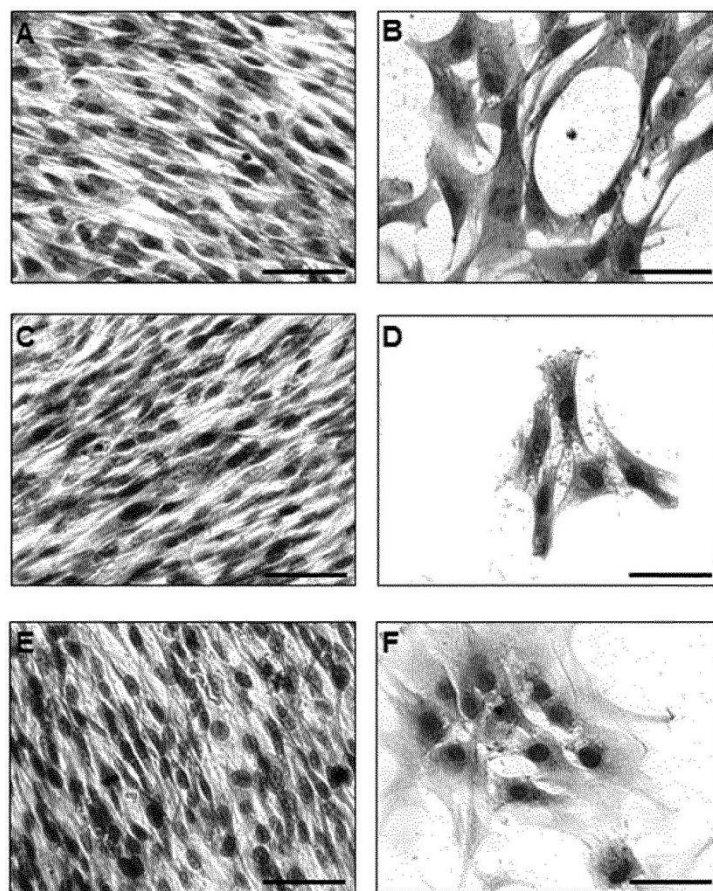


Figura 4

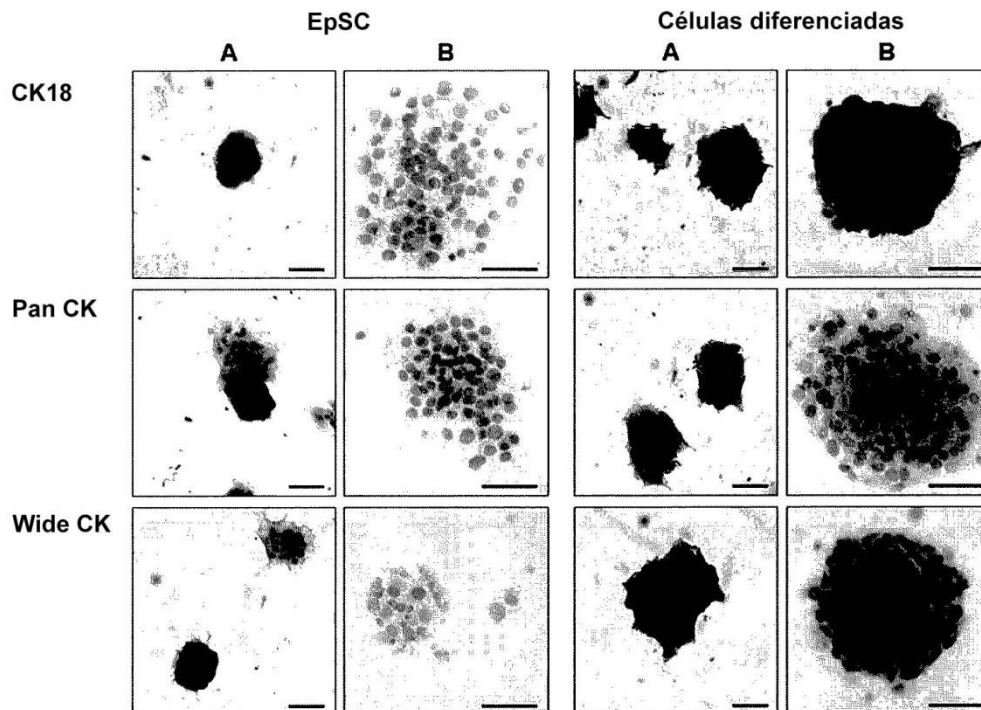


Figura 5

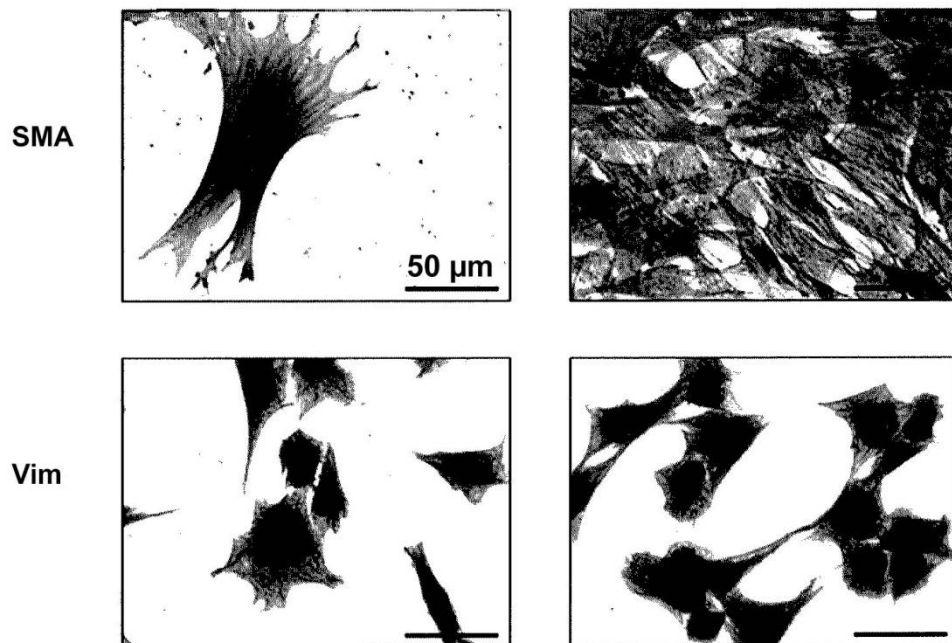
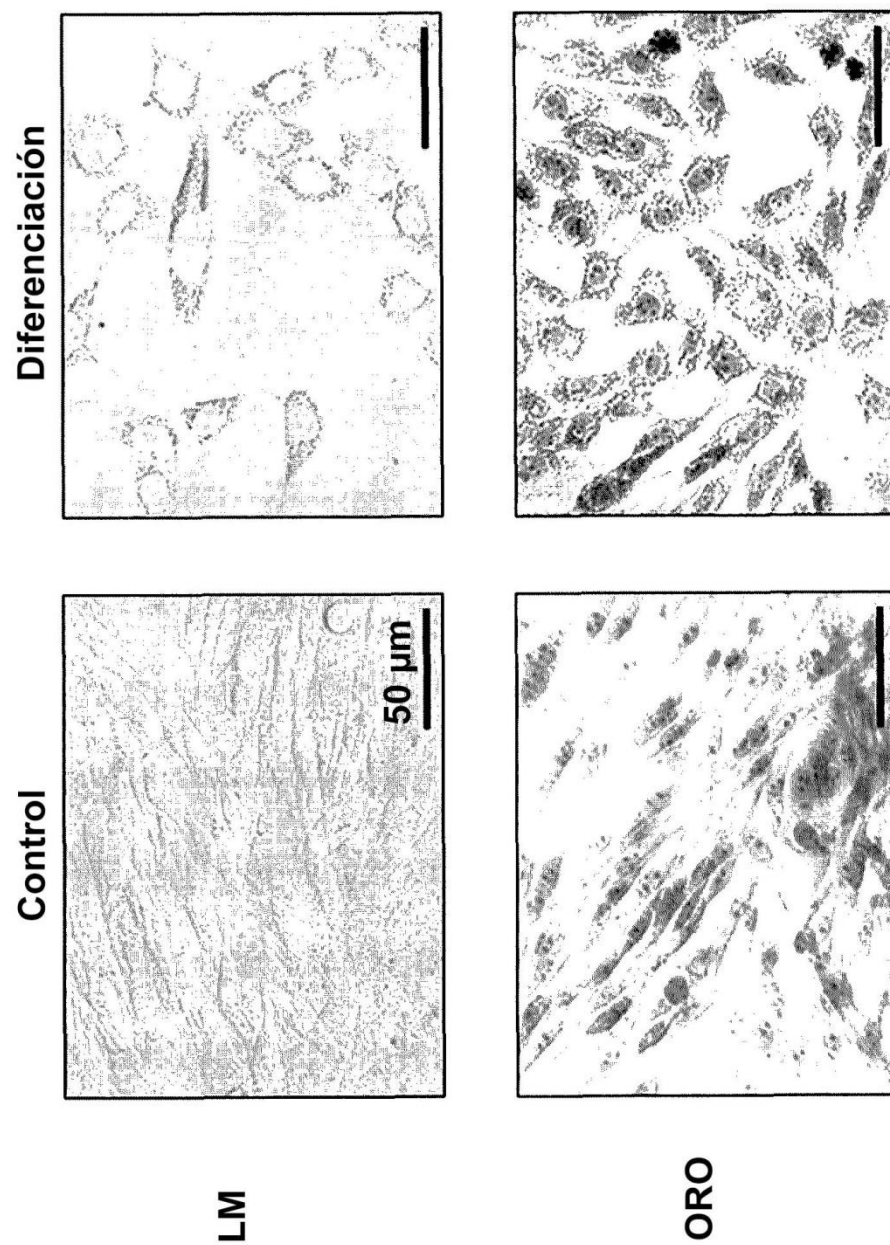
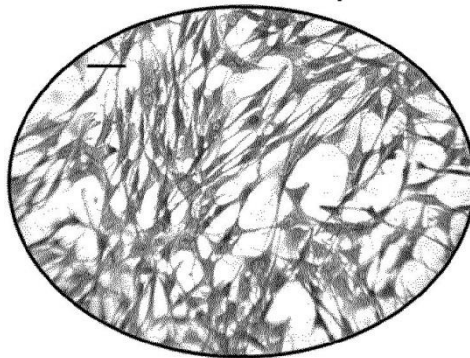


Figura 6



Caseína cinasa 2 β



Isotipo de conejo

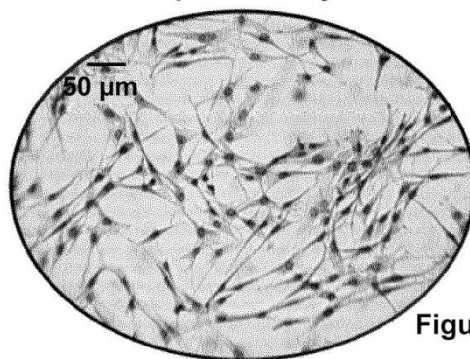


Figura 8

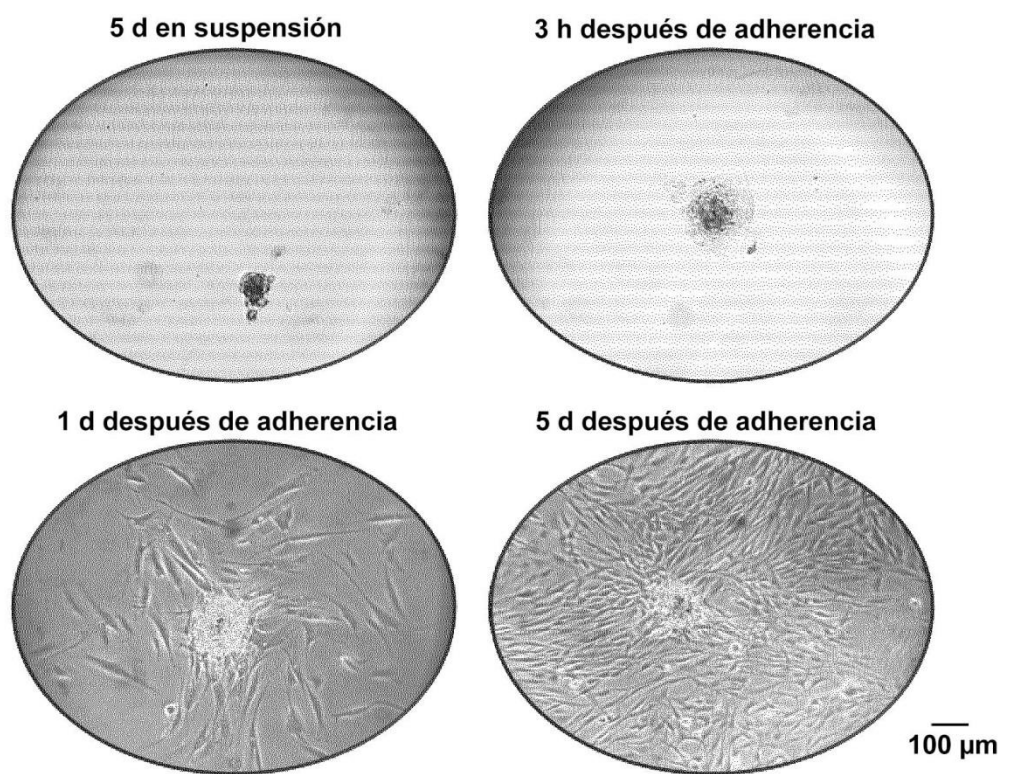


Figura 9

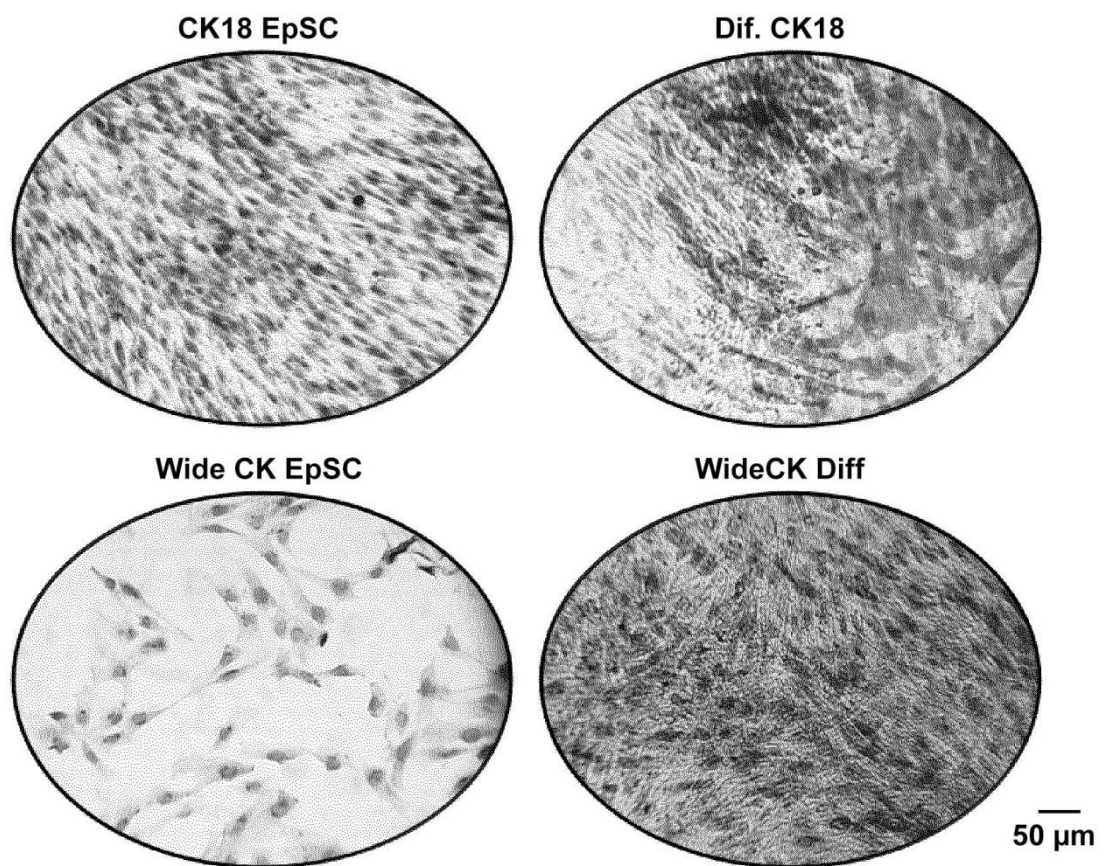


Figura 10

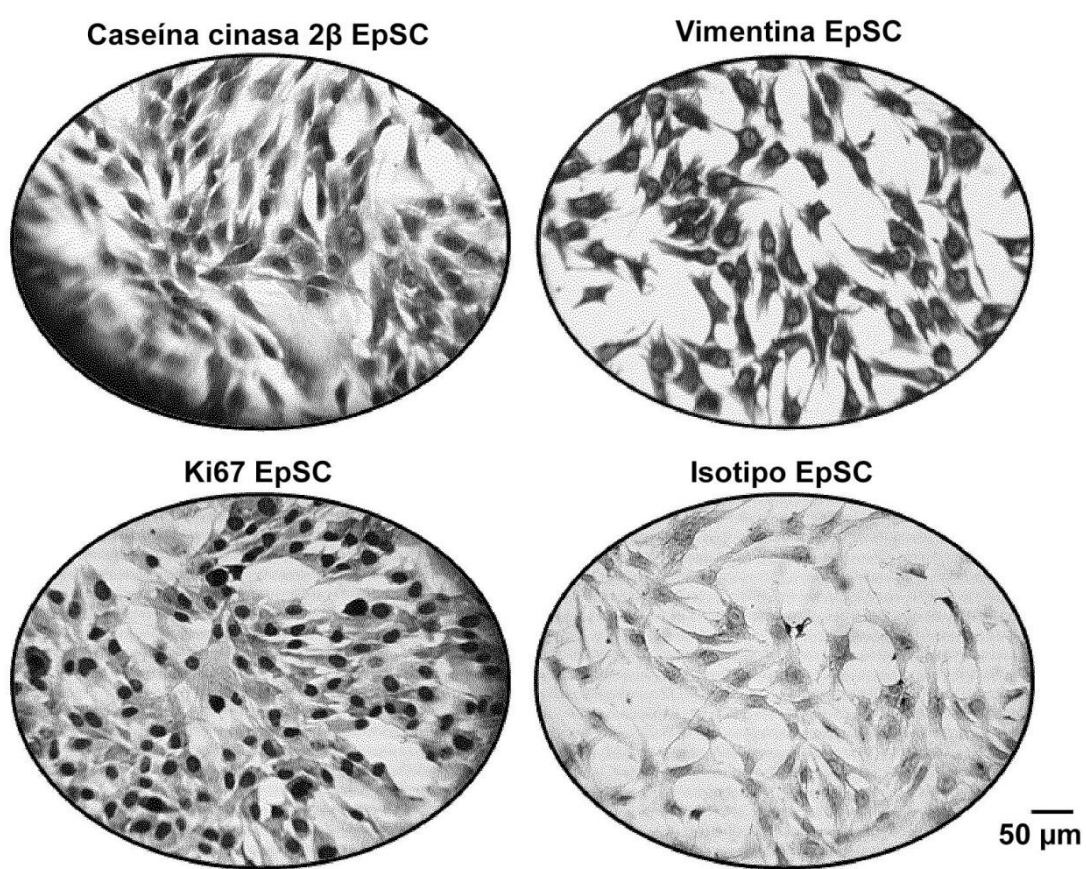


Figura 11

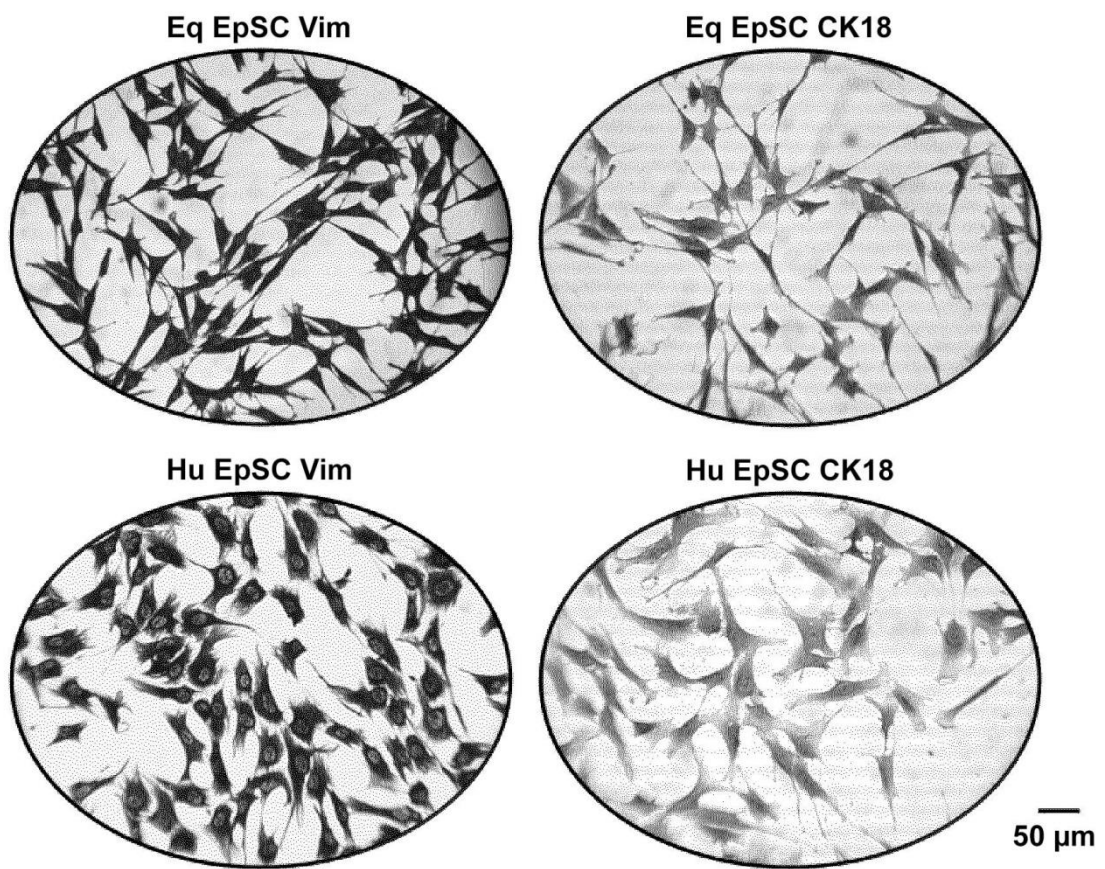


Figura 12

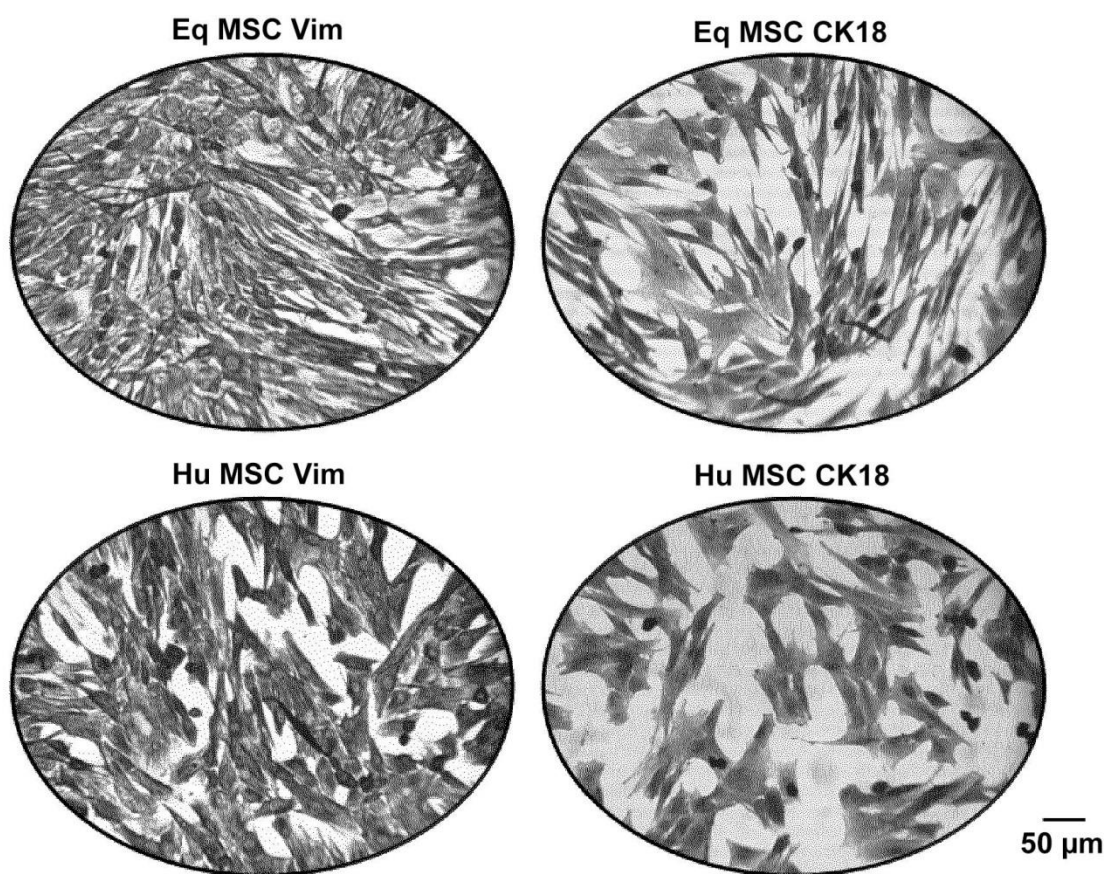


Figura 13

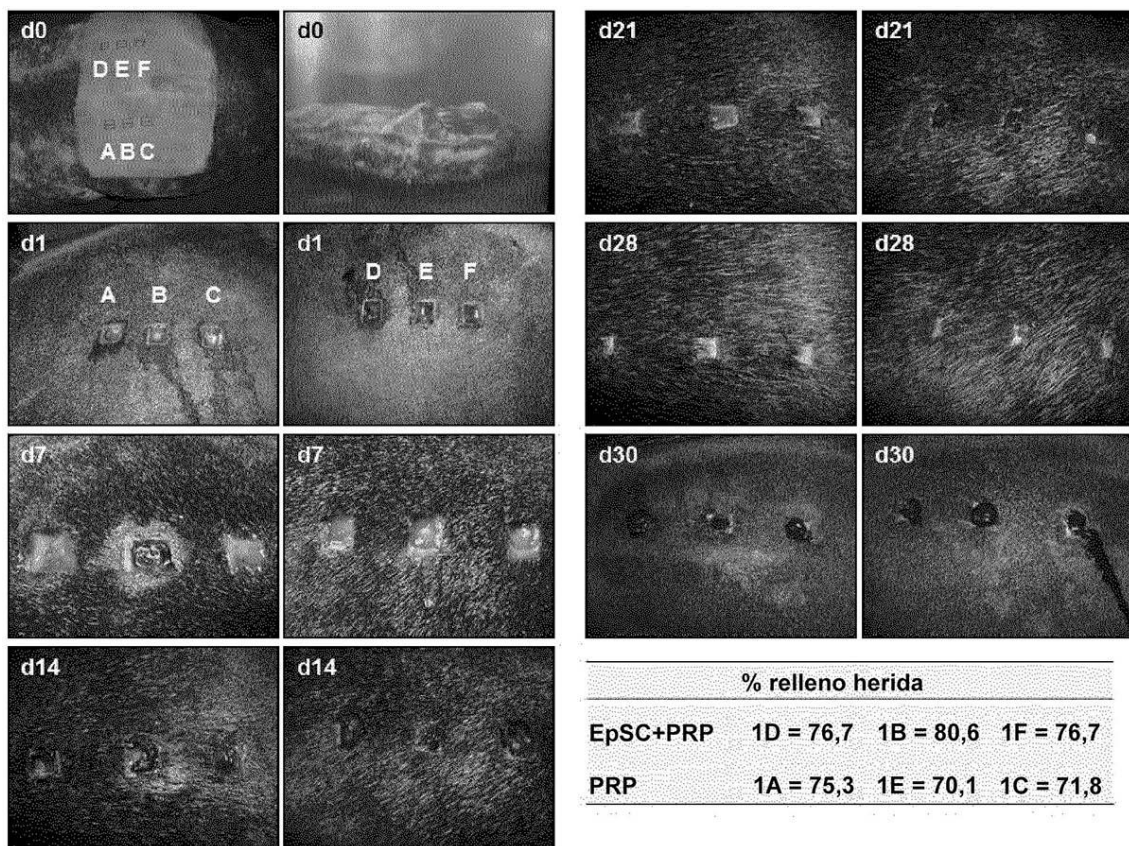


Figura 14

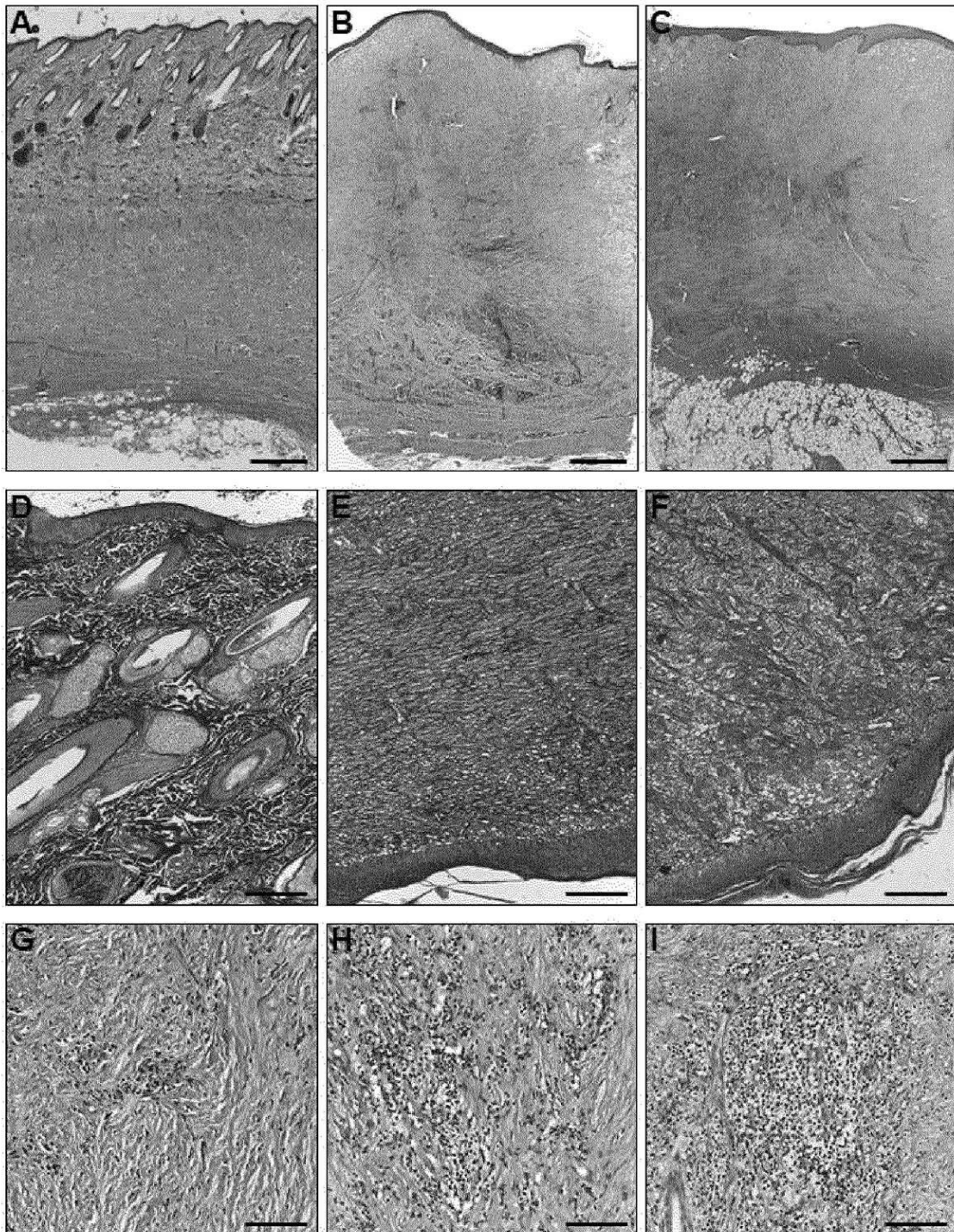


Figura 15

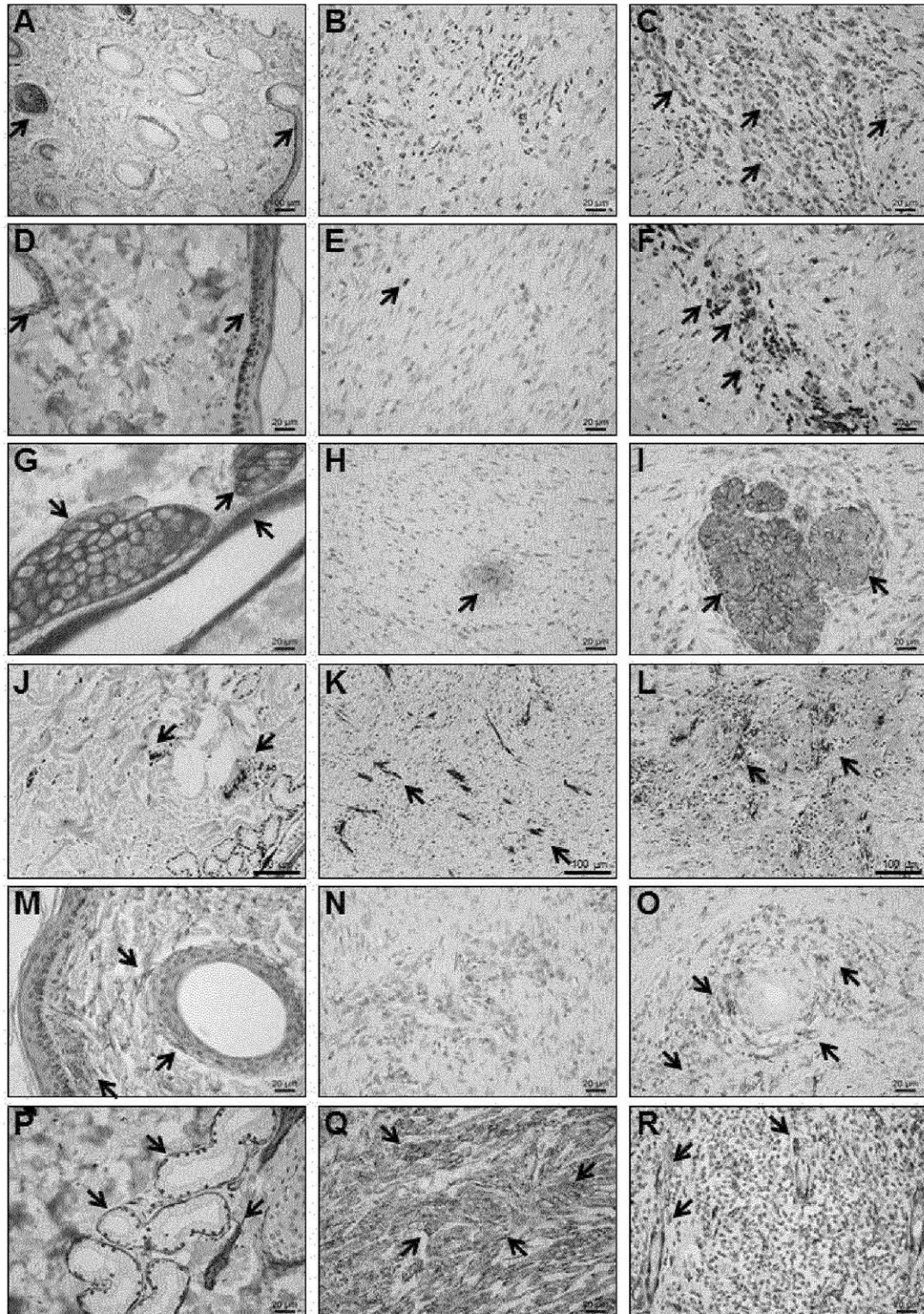


Figura 16

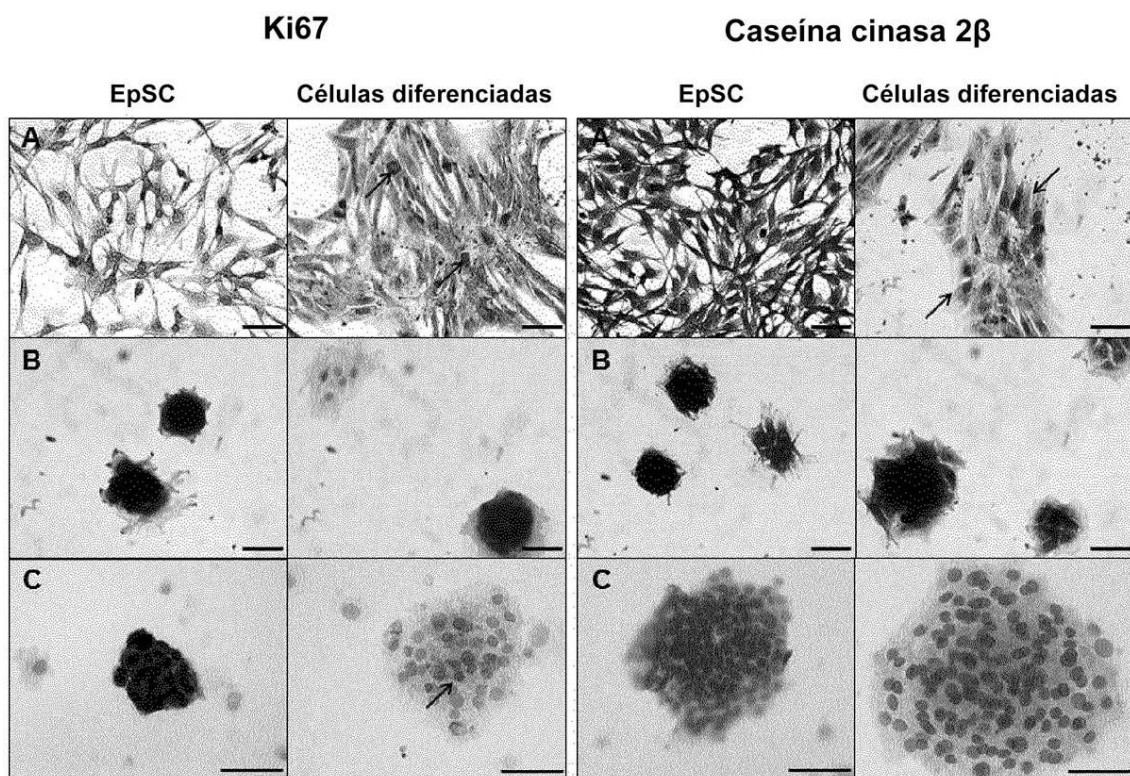


Figura 17

p63

EpSC

Células diferenciadas

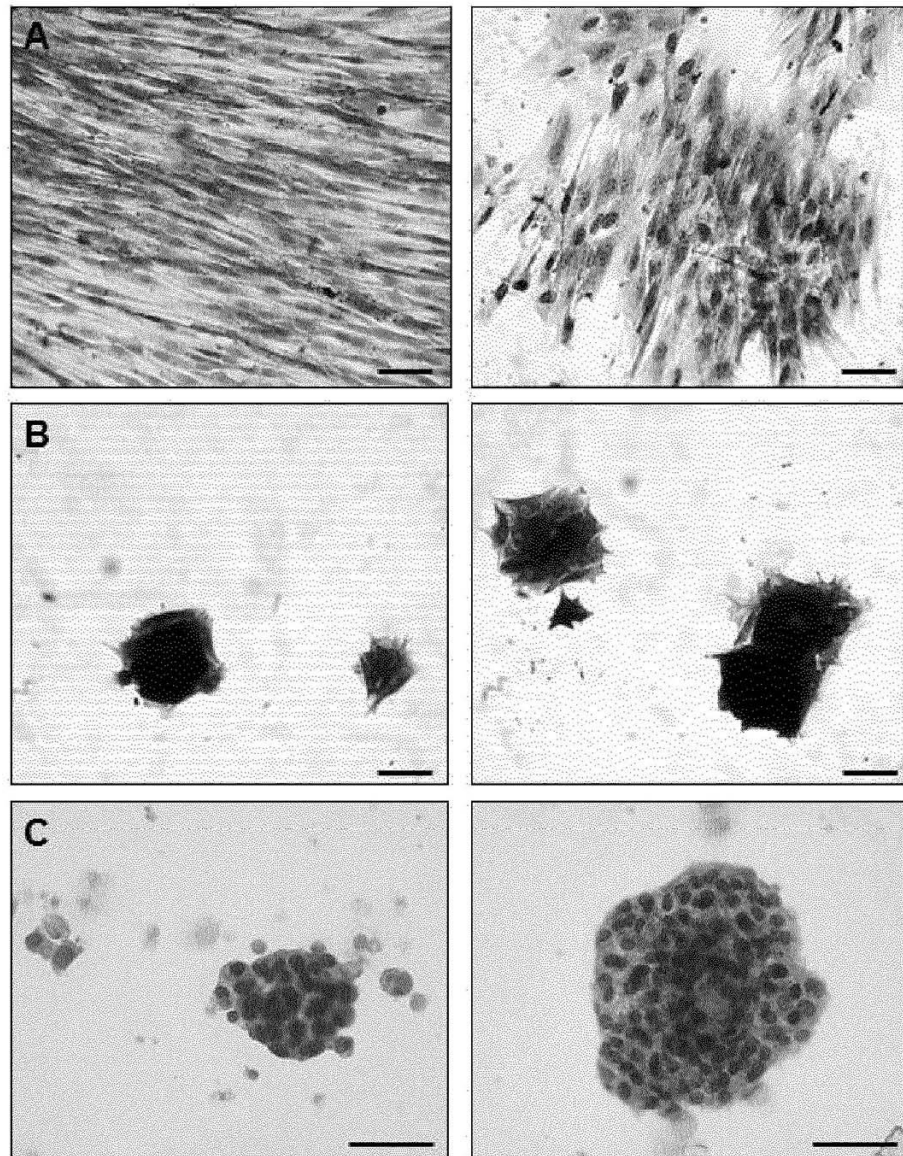


Figura 18

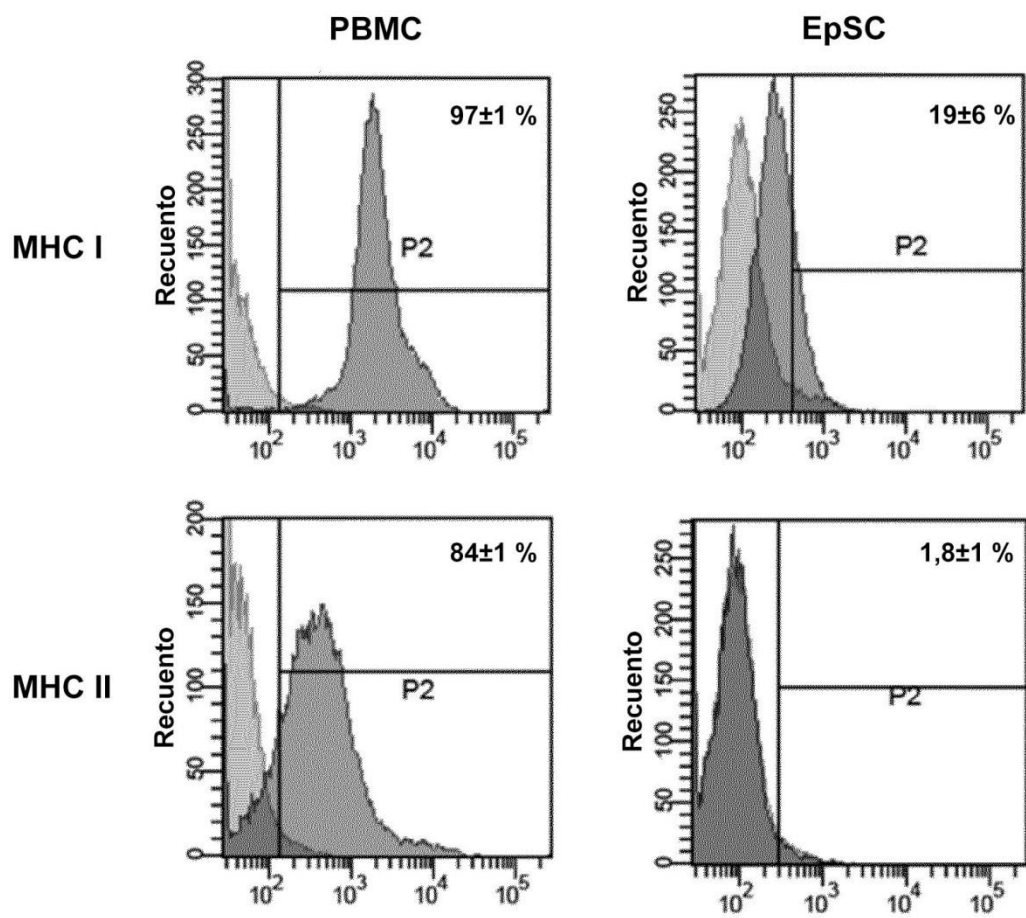


Figura 19