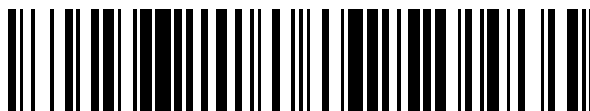


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 938 334**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12M 1/42 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2017** **PCT/GB2017/000081**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.11.2017** **WO17198989**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2017** **E 17728911 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2022** **EP 3457844**

54 Título: **Mejoras aportadas y relativas a la viabilidad de muestras de piel**

30 Prioridad:

20.05.2016 GB 201608899

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

10.04.2023

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF DUNDEE (100.0%)
11 Perth Road
Dundee DD1 4HN, GB

72 Inventor/es:

HICKERSON, ROBYN PATRICIA y
CONNELLY, MICHAEL JOHN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 938 334 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

Mejoras aportadas y relativas a la viabilidad de muestras de piel

Introducción

- 5 La presente invención se refiere a mejoras aportadas y relativas a la viabilidad de muestras de piel y, en particular, para mejorar la viabilidad de muestras de piel que se usan para estudiar la biología de la piel y para evaluar la administración de fármacos, metabolismo, toxicidad y eficacia de agentes terapéuticos.

Antecedentes de la invención

La piel es el recubrimiento externo fuerte de los animales vertebrados. Otros recubrimientos de animales tal como el exoesqueleto de artrópodos tienen un origen de desarrollo, una estructura y una composición química diferentes.

- 10 En los mamíferos, la piel es un órgano formado por varias capas de tejido ectodérmico que cubre el tejido subyacente, los ligamentos, los huesos y los órganos internos. Actúa como un órgano sensorial, protege el cuerpo contra patógenos, daño por radiación ultravioleta, pérdida excesiva de agua, proporciona aislamiento, regulación de la temperatura y produce vitamina D.

- 15 El grosor de la piel varía de un lugar a otro en un organismo. En los seres humanos, por ejemplo, la piel situada debajo de los ojos y alrededor de los párpados es la piel más fina del cuerpo con 0,5 mm de espesor, mientras que la piel de las palmas y las plantas de los pies es de 4 mm de espesor y es de alrededor de 1,4 mm de espesor en la espalda.

- 20 La piel de los mamíferos se compone de dos capas primarias, la epidermis y la dermis. La epidermis es un epitelio estratificado y queratinizado con funciones de barrera específicas que se soporta con el entorno complejo de la matriz extracelular de la dermis. Para que la piel conserve su apariencia normal y funcione con total normalidad, deben estar presentes ambas capas de la piel.

La epidermis forma una barrera protectora sobre la superficie del cuerpo, es responsable de mantener el agua en el cuerpo, proteger de la luz UV y prevenir la entrada de patógenos.

- 25 La epidermis no contiene vasos sanguíneos y las células de las capas más profundas se nutren por difusión desde los capilares sanguíneos que se extienden a las capas superiores de la dermis.

- 30 La dermis comprende tejido conjuntivo y amortigua el cuerpo frente a la tensión y la distensión muscular. La dermis proporciona resistencia a la tracción y elasticidad a la piel a través de una matriz extracelular compuesta de fibrillas de colágeno, microfibrillas y fibras elásticas. La dermis está estrechamente conectada a la epidermis a través de una membrana basal y se divide estructuralmente en dos áreas: un área superficial adyacente a la epidermis, llamada región papilar, y un área profunda más espesa conocida como la región reticular.

- 35 Se pueden extirpar muestras de piel del cuerpo de un animal con el fin de analizarlas o para cultivar una muestra de piel cuando se requiera un injerto de piel. Los tipos de muestras de piel usados comúnmente incluyen piel humana, porcina y murina. El injerto de piel es un componente esencial de la cirugía reconstructiva tras sufrir quemaduras, traumatismos, escisión de tumores y corrección de anomalías congénitas. La mejor piel posible disponible para injertar es la piel del mismo paciente tomada de un sitio donante en otra parte del cuerpo, conocido como autoinjerto. Los sitios donantes de injertos de piel adecuados están limitados por el área de superficie corporal y también pueden verse afectados por la extracción de injertos o traumatismos previos. En pacientes que sufren quemaduras grandes con sitios donantes de piel limitados, se usan comúnmente aloinjertos de cadáveres como cobertura de piel temporal.

- 40 En todos los casos, existe la necesidad de mantener la muestra de piel en un estado sano y frenar o detener completamente el deterioro de la calidad de la muestra mientras se almacena.

- 45 Son esenciales modelos de piel fiables que reúnan las características de la piel viva para la investigación de la biología cutánea y el descubrimiento de fármacos. Se han usado mucho los sistemas de cultivo cutáneo *ex vivo* de espesor completo. El mercado global de modelos de piel *ex vivo* incluye investigadores académicos y la industria cosmética con respecto a la evaluación de seguridad y eficacia para el creciente número de productos desarrollados para aplicación tópica. Dentro de un mercado global de toxicidad *in vitro*, que se espera que alcance los \$27 billones para 2021, existe una creciente demanda de modelos de piel *ex vivo*. Además, el desarrollo de un sistema modelo de este tipo es cada vez más prioritario debido a la regulación de la Comunidad Europea que prohíbe el uso de ensayos con animales para principios activos cosméticos.

- 50 US 2015/0018948 A1 describe dispositivos y métodos útiles para cultivar, acondicionar y/o estirar tejidos en los que el tejido se coloca sobre una membrana expandible. WO 01/93771 A1 describe un dispositivo de expansión de tejido, que puede comprender motores eléctricos para suministrar niveles alternos de fuerza a un conjunto de abrazaderas y sensores para medir fuerzas y distancias de estiramiento. Otros dispositivos de estiramiento de tejido se describen en US 2011/0172683 A1 y US 5.914.264. US 2010/0323438 A1 describe un método para cultivar y
55 acondicionar células en una muestra, como la piel, en el que se aplica una carga seleccionada a la muestra.

Explicación resumida de la invención

Según la invención, se proporciona un método como se define en la reivindicación 1.

En la presente solicitud, *ex vivo* significa cualquier proceso realizado fuera del organismo vivo e incluye procesos *in vitro* que ocurren en un tubo de ensayo, placa de cultivo o similar y procesos de explante donde las células, tejidos u órganos vivos se transfieren de los animales a un medio nutritivo.

- 5 Los valores de la tensión de la piel comprenden un intervalo continuo.

Preferiblemente, la etapa de aplicar tensión comprende estirar la muestra de piel y mantenerla en posición sobre el soporte de muestras de piel.

Preferiblemente, la etapa de medir la tensión comprende aplicar una fuerza medible a la superficie de una muestra de piel que se mantiene en el soporte de muestras de piel.
- 10 Preferiblemente, la fuerza se aplica poniendo en contacto una sonda con la superficie de la muestra de piel desplazando la piel una cantidad predeterminada para estirar la piel, donde la cantidad de fuerza para un desplazamiento dado proporciona una medida de la tensión de la piel.

Preferiblemente, cuando se usa un soporte de muestras de piel anular, se aplica un factor de corrección a la medición de fuerza para tener en cuenta el efecto del radio del soporte de muestras de piel.
- 15 Preferiblemente, la etapa de medir la capacidad de la primera muestra u otra para mantener características de la piel viva comprende herir la piel y medir la expresión de queratina 17 como una indicación de viabilidad tisular.

Preferiblemente, la etapa de herir la piel se lleva a cabo usando un dispositivo que asegura que las heridas tengan una profundidad y cobertura uniformes a través de la piel.

Preferiblemente, en la etapa de herir la piel se usa una fuente de láser que hiere la piel. Preferiblemente, la etapa de medir la capacidad de la primera muestra u otra para mantener las características celulares de la piel viva comprende medir la activación de Nrf2 en respuesta a moléculas pequeñas midiendo los niveles de ARNm de NQO1.
- 20 Preferiblemente, la etapa de medir la capacidad de la primera muestra u otra para mantener las características mitocondriales de la piel viva comprende medir la actividad metabólica mitocondrial.
- 25 Preferiblemente, el soporte de muestras de piel comprende una placa de cultivo con un soporte de muestras de piel que sostiene la muestra de piel y aplica tensión a la muestra de tejido cutáneo.

Preferiblemente, el soporte de muestras de piel está adaptado para aplicar diferentes niveles de tensión a la muestra de piel.
- 30 Preferiblemente, el soporte de muestras de piel comprende un bastidor de base con una superficie de recepción de muestras de piel sobre la que se puede colocar al menos parte de una muestra de piel y que se extiende a través de un área definida por la forma del bastidor; y un elemento de sujeción que se puede conectar al bastidor de base de forma que se pueda soltar y un agarre que mantiene la muestra de piel en tensión.

Preferiblemente, el tipo de tejido cutáneo es porcino, murino o humano.
- 35 Preferiblemente, para piel porcina y humana el uno o más valores de tensión de la piel comprenden un intervalo de 0,22 a 0,57 N, suponiendo un diámetro específico y constante y una distancia de desviación.

Más preferiblemente, el intervalo comprende de 0,29 a 0,46 N, suponiendo un diámetro específico y constante y una distancia de desviación.

Puede proporcionarse un soporte de muestras de piel para mantener una muestra de piel *ex vivo* en tensión, determinándose la tensión de la muestra de piel mediante el método de la presente invención.
- 40 También se puede proporcionar un método para medir la tensión en un aparato de cultivo de muestras de piel según el método de la invención, comprendiendo el aparato:

un espaciador que acopla el medidor de fuerza al aparato de cultivo de muestras de piel;
una sonda que puede extenderse desde el espaciador para el contacto con una muestra de piel y que aplica una fuerza a la muestra de piel;
- 45 un medidor de fuerza para medir la fuerza aplicada
donde la cantidad de fuerza para un desplazamiento dado, definido por la longitud del espaciador, proporciona una medida de la tensión de la piel.

Preferiblemente, la etapa de medir la tensión comprende aplicar una fuerza medible a la superficie de una muestra de piel que se mantiene en el soporte de muestras de piel.
- 50 Preferiblemente, la fuerza se aplica poniendo en contacto una sonda con la superficie de la muestra de piel y desplazando la piel una cantidad predeterminada para estirar la piel, donde la cantidad de fuerza para un desplazamiento dado proporciona una medida de la tensión de la piel.

Preferiblemente, cuando se usa un soporte de muestras de piel anular, se aplica un factor de corrección a la medición de fuerza para tener en cuenta el efecto del radio del soporte de muestras de piel.

Preferiblemente, la sonda comprende además medios de cálculo para calcular el factor de corrección.

5 Por ejemplo, el medio de cálculo puede estar contenido en la sonda como hardware, firmware y/o software o puede ser un módulo o dispositivo separado.

Preferiblemente, la sonda es esférica.

Opcionalmente, la sonda es cónica.

Opcionalmente, la sonda es cilíndrica.

10 También se proporciona un método para cultivar una muestra de tejido cutáneo con una tensión determinada mediante el método de la invención.

Preferiblemente, el tipo de tejido cutáneo es porcino, murino o humano y se cultiva con una tensión en el intervalo de 0,22 a 0,57 N, suponiendo un diámetro específico y constante y una distancia de desviación. Más preferiblemente, el intervalo comprende de 0,29 a 0,46 N.

Breve descripción de los dibujos

15 La presente invención se describirá ahora con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

la Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra un ejemplo de un método según la presente invención;

la Figura 2A es una vista en perspectiva de un ejemplo de un dispositivo usado en el método de la presente invención; la Figura 2B es una vista lateral del dispositivo de la Figura 2A;

20 la Figura 3 es una vista lateral de un medidor de fuerza equipado con un manguito espaciador usado para medir la tensión de una muestra de piel;

la Figura 4 es una representación esquemática de una medición de la tensión de la piel;

la Figura 5 es una representación esquemática de una medición de la tensión de la piel para un dispositivo que tiene un primer radio;

25 la Figura 6 es una representación esquemática de una medición de la tensión de la piel para un dispositivo que tiene un segundo radio;

la Figura 7 es una representación esquemática de una medición de la tensión de la piel para un dispositivo que tiene un tercer radio;

la Figura 8 es un ejemplo de una curva de calibración para corregir mediciones de la tensión de la piel medida con respecto al radio del dispositivo;

30 la Figura 9a muestra niveles de K17 en una gran sección de piel herida sin tensión, y la Figura 9b muestra niveles de K17 en una gran sección de piel herida con tensión;

las Figuras 10a a 10f muestran niveles de queratina 17 de una muestra de piel porcina en niveles variables de tensión en una piel no herida, y las Figuras 10g a 10p muestran niveles de queratina 17 de una muestra de piel porcina en niveles variables de tensión en una piel herida;

35 las Figuras 11a a 11c muestran niveles de queratina 17 de una muestra de piel humana en niveles variables de tensión en una piel herida;

la Figura 12a muestra una colección de portaobjetos a partir de los cuales se han determinado niveles de K17 para piel de cerdo no herida y herida, la Figura 12b muestra una colección de portaobjetos a partir de los cuales se han determinado niveles de K17 para piel humana herida y la Figura 12c es un gráfico que representa niveles estimados de queratina 17 frente a la tensión;

40 las Figuras 13a a 13c muestran muestras de piel no herida que están *in vivo*, de una fuente estándar industrial y mantenidas en tensión según un ejemplo del método de la presente invención, y las Figuras 13d a 13f muestran muestras de piel herida con láser que están *in vivo*, vienen de una fuente estándar industrial y se mantienen en tensión según el método de la presente invención;

45 la Figura 14 es un gráfico que representa niveles de ARNm de NQO1 como una medida de la actividad de Nrf2 que indica la viabilidad celular de la piel; y

la Figura 15 es un gráfico que representa la actividad metabólica mitocondrial de piel fresca, piel en tensión según un ejemplo del método de la presente invención, piel sin tensión y piel desvitalizada.

Descripción detallada de los dibujos

50 La Figura 1 es un diagrama de flujo 1 que ilustra un ejemplo de un método según la presente invención. El método de la presente invención permite ensayar con muestras *ex vivo* de un tipo de piel, tal como piel porcina, humana o murina, con el fin de determinar los niveles de tensión de la piel preferidos y/u óptimos.

55 Como se muestra en la Figura 1, se monta 3 una primera muestra de un tipo de tejido cutáneo en un soporte de muestras de piel tal como, por ejemplo, el dispositivo mostrado en las figuras 2A y 2B. Usando el dispositivo de las Figuras 2A y 2B, se aplica una tensión a través de la muestra de piel y se mide 5 usando un medidor de fuerza o por otros medios. En este ejemplo de la presente invención, la tensión se mide usando el medidor de fuerza de la Figura 3.

Se determina 7 la capacidad de la primera muestra para mantener características de la piel viva. En este ejemplo de la presente invención, las características de viva de la muestra de piel se miden hiriendo la piel usando un láser y midiendo la excreción de queratina 17 (K17) en respuesta a la herida como se describe en las Figuras 3 a 12.

A continuación, una o más muestras distintas del tipo de tejido cutáneo se montan 9 por separado en el soporte de muestras de piel y se aplican tensiones distintas 11 a cada una de las muestras posteriores. En cada caso, se mide 13 la capacidad de la muestra de tejido cutáneo para mantener características de la piel viva, de manera que, para el tipo de tejido cutáneo, se determina un valor o intervalo de valores de tensión de superficie que mejoran la viabilidad *in vitro* del tipo de muestra de piel.

El margen de tensión óptimo puede determinarse entonces (15) en base a la capacidad de respuesta a la herida. Se apreciará que el método descrito anteriormente muestra mediciones de muestras que se realizan una tras otra, estas mediciones se pueden realizar al mismo tiempo usando soportes de muestras de piel distintos para cada muestra.

La Figura 2A es una vista en perspectiva de un ejemplo de un dispositivo usado en el método de la presente invención, y la Figura 2B es una vista lateral del dispositivo de la Figura 2A. Se muestra una placa de cultivo 21 con piel que contiene un medio de cultivo 25. El dispositivo 23 tiene una base 33 sobre la que se coloca una muestra de piel 27 en uso, y una tapa 29 que se coloca en la parte superior de una muestra de piel, extendiéndose la piel a la circunferencia exterior 26 de la tapa 29 y la base 33. Las fijaciones 31 se extienden a través de orificios en la tapa 29 y orificios correspondientes en la base 33 y se usan para unir la tapa 29 a la base 33. Las fijaciones proporcionan la fijación de forma separable de la tapa 29 a la base 33. En uso, la muestra de piel 27 se estira a través de la base y se asegura a la base 33 y a la tapa 29 usando fijaciones 31.

La Figura 3 muestra un aparato para medir la tensión en una muestra de piel que se ha colocado en el dispositivo de las Figuras 2a y 2b. El aparato comprende un medidor de fuerza 41, un manguito espaciador 43 que se desliza sobre el eje de la sonda que se extiende hacia abajo desde el cuerpo del medidor de fuerza 41. El manguito 43 es un tubo cilíndrico con un diámetro y circunferencias que coinciden con el de la tapa de manera que el extremo del manguito descansa sobre la tapa 57 del dispositivo de la Figura 4. El indentador esférico 45 ejerce una fuerza sobre la muestra de piel.

La Figura 4 es una representación esquemática 51 de una medición de la tensión de la piel. Muestra un indentador esférico 53, un dispositivo de cultivo de muestras de piel 55 similar al de las Figuras 2a y 2b que tiene una tapa 57, fijaciones avellanadas 59 que se extienden a través de la tapa 57 dentro de la base 63 para mantener una muestra de piel en su lugar y en tensión. Tanto la tapa como la base comprenden anillos de radio interior y exterior prácticamente idénticos. También se muestran el radio de la tapa 67 medido en el diámetro interior y el desplazamiento vertical 65. Cuando se ejerce un desplazamiento h 65 conocido sobre la muestra de piel 61, se registra una lectura de fuerza. Esto proporciona una medida de la tensión de la piel.

En los casos en los que el dispositivo sea anular, pueden usarse dispositivos que tengan radios diferentes.

La Figura 5 es una representación esquemática de una medición de la tensión de la piel para un dispositivo que tiene un tamaño 71 con un primer radio 79, una tapa 73, una base 75. Se muestra el desplazamiento vertical 81 de la muestra de piel 77 causado por el indentador 83.

La Figura 6 es una representación esquemática de una medición de la tensión de la piel para un dispositivo que tiene un tamaño 91 con un primer radio 99, una tapa 93, una base 95. Se muestra el desplazamiento vertical 101 de la muestra de piel 97 causado por el indentador 103.

La Figura 7 es una representación esquemática de una medición de la tensión de la piel para un dispositivo que tiene un tamaño 111 con un primer radio 119, una tapa 113, una base 115. Se muestra el desplazamiento vertical 121 de la muestra de piel 117 causado por el indentador 123.

Cuando los radios son diferentes como se muestra en las Figuras 5 a 7, es necesario tener en cuenta el efecto del radio sobre el valor medido de la tensión.

El módulo elástico E de la membrana montada en el dispositivo de cultivo, definido como la relación entre la tensión (fuerza por unidad de área) y la deformación (deformación proporcional), se utilizará para relacionar las mediciones de tensión en dispositivos de diferentes diámetros utilizando distancias de indentación variables.

En esencia, cuando la membrana se monta en el dispositivo de cultivo a la tensión correcta, poseerá un determinado módulo elástico.

Se supone que la sonda está en contacto sin fricción y, para simplificar, que la membrana deformada se ajusta a una geometría cónica con una deformación uniforme. También se supone que la membrana es un material linealmente elástico.

La sonda aplica una tensión media sobre la membrana dada por,

$$\sigma = \frac{F}{A_{CS}}$$

Donde F es la fuerza normal aplicada por la sonda y A_{CS} es el área en sección transversal de la membrana.

Debido a esta tensión, la membrana se deforma en una geometría aproximadamente cónica con un área de superficie definida como,

$$A_{cono} = \pi r \sqrt{r^2 + h^2}$$

Donde r es el diámetro de la membrana y h es la distancia de indentación, o también la altura del cono formado por la membrana estirada. La deformación del área ϵ sobre la membrana estirada está dada por,

$$\epsilon = \frac{\Delta A}{A_0}$$

Donde ΔA , el cambio en el área de la membrana, viene dado por,

$$\Delta A = A_{cono} - A_0$$

$$\Delta A = \pi r \sqrt{r^2 + h^2} - \pi r^2$$

Por lo tanto, ϵ puede escribirse como,

$$\epsilon = \frac{\sqrt{r^2 + h^2} - r}{r}$$

Ahora el módulo elástico E puede definirse completamente como.

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon}$$

En los ejemplos de la presente invención descritos en la presente memoria, el soporte de muestras de piel tiene un dispositivo de cultivo de 15 mm de diámetro con una indentación de 3 mm/profundidad de empuje (15-3) para caracterizar la tensión óptima F_0 requerida en nuestra membrana.

Por lo tanto, esta será nuestra referencia a partir de la cual se calcularán los factores de conversión, sin embargo, este enfoque se puede aplicar generalmente a cualquier valor de diámetro/profundidad utilizado para la caracterización de la membrana.

Para encontrar la lectura de la fuerza de la sonda requerida F_x en un dispositivo de diámetro diferente, igualamos los módulos elásticos.

$$E_0 = E_x$$

$$\frac{\sigma_0}{\epsilon_0} = \frac{\sigma_x}{\epsilon_x}$$

$$\frac{F_0 / A_{CS_0}}{\epsilon_0} = \frac{F_x / A_{CS_x}}{\epsilon_x}$$

$$F_0 = \frac{F_x A_{CS_0} \epsilon_0}{A_{CS_x} \epsilon_x}$$

Utilizando los valores para nuestra caracterización de membrana (15-3), podemos generar una matriz de factores de conversión/corrección para permitir el ensayo de dispositivos de diferentes diámetros y también utilizando diferentes profundidades/distancias de indentación.

El factor de corrección (A) relaciona la fuerza medida de la siguiente manera,

$$F_{15-3} = \lambda F_{x-y}$$

Aquí, vemos que, como se esperaba, el factor de corrección para un dispositivo de 15 mm de diámetro con una profundidad de indentación de 3 mm es la unidad o 1.

Manteniendo el diámetro del dispositivo en 15 mm pero aumentando la profundidad de indentación, vemos que el factor disminuye, lo que es lógico considerando que la membrana se estira en mayor medida con un aumento de la indentación. De manera similar, con un dispositivo/membrana de diámetro más pequeño, el factor de corrección disminuye para una profundidad de indentación dada.

Debido a la suposición de un material linealmente elástico, se aconseja que la deformación esté por debajo del 10 % durante las mediciones de tensión, es decir, la sonda no estira la membrana en una cantidad superior al 10 %.

La Figura 8 muestra un gráfico de superficie en 3D 131 de una sección de la matriz del factor de conversión-corrección calculado. Los factores de corrección 137 están relacionados con las profundidades de indentación 133 y el diámetro del dispositivo 135 con el uso de una escala de color 139.

Resultados del experimento

Se cultivó piel desgrasada con una tensión definida por el usuario en el dispositivo de la Figura 2. La tensión experimentada a través de la superficie de la muestra de piel se midió a través de una medición de indentación usando el medidor de fuerza de la Figura 3. Se aplicó fuerza perpendicular a la superficie de la piel y el tejido cutáneo se estiró una distancia fija definida por el usuario (en este caso 3 mm).

En este ejemplo, el proceso para asegurar que la piel se montase con una tensión específica era un proceso repetitivo que requería que la muestra de piel se montase completamente en el dispositivo de cultivo antes de medir la tensión de la muestra. Después del montaje, el medidor de fuerza 41 de la Figura 3, equipado con una sonda esférica 45 y un manguito espaciador 43 para fijar la distancia de indentación, se colocó centralmente sobre el soporte de muestras de piel. El manguito espaciador se puso en contacto firme con la parte superior del dispositivo de cultivo, empujando la sonda en contacto con la piel, desplazándola así una distancia definida. A continuación se registró la fuerza pico impartida sobre la sonda como una medida de tensión. Con el fin de afinar la tensión, el dispositivo de cultivo se desmontó parcialmente aflojando las fijaciones de tornillo lo que permitía realizar pequeños ajustes en la piel. Usando este método, la tensión se reguló con un grado de precisión relativamente alto.

Con el fin de determinar la manera en la que podría mejorarse la viabilidad *ex vivo* de un tipo de tejido cutáneo, se realizaron mediciones de la capacidad de la muestra de piel para mantener características de la piel viva tales como actividad metabólica, respuesta a fármacos de molécula pequeña y la capacidad para responder a una lesión.

1. Viabilidad de un tejido (expresión de queratina 17 después de la herida)

Se cultivó piel humana y porcina en un intervalo de tensiones (es decir, desde sin tensión hasta completamente estirada) durante 24-48 horas antes de exponerse a heridas usando un láser Er:YAG ajustado a una profundidad y cobertura de ablación constantes. Después de 48 h, la piel se recogió, se fijó con formol y se tiñó para la expresión de queratina 17, que es un marcador de la capacidad de la piel para responder a la herida. Se esperaba que una muestra de piel sana que exhiba características de piel viva expresara queratina 17 en respuesta a la herida. En las siguientes imágenes, las áreas blancas y/o sombreadas más claras en el portaobjetos muestran la expresión de K17.

La Figura 9 muestra niveles de queratina 17 en piel porcina con y sin tensión. La Figura 9a muestra que la expresión de queratina 17 se observa cerca del sitio de la herida cuando la piel se cultiva sin tensión. La Figura 9b muestra la expresión de queratina 17 a niveles uniformes en toda la muestra de piel que se cultiva con tensión. Los resultados muestran que la piel no herida expresa poca o ninguna queratina 17 hasta que la tensión de la piel alcanza un nivel en el que la piel se daña por el propio estiramiento en la Figura 9f. En el caso de piel herida sana, la expectativa sería que se produjera la expresión de queratina 17.

Para las Figuras 10 y 11, se tomaron imágenes de tejido cutáneo entre las heridas por láser. Las Figuras 10a a 10f muestran niveles de queratina 17 de una muestra de piel no herida con niveles variables de tensión, y las Figuras 10g a 10p muestran niveles de queratina 17 de una muestra de piel herida con niveles variables de tensión. En cada imagen, la tensión de la piel (en newtons; N) se muestra en la esquina superior derecha de la imagen.

Las Figuras 10g y 10h muestran muestras de piel sin tensión y con tensión de 0,13 N respectivamente. Con estos niveles de tensión, hay poca o ninguna expresión de queratina 17. La expresión de queratina 17 se observa en las figuras 10i, 10j y 10k que son de muestras de piel con tensiones de 0,29 N, 0,34 N y 0,45 N respectivamente. La mayor expresión aparente de queratina 17 se ve con una tensión de 0,29 N. La Figura 10i muestra poca o ninguna expresión de queratina 17 con una tensión de 0,57 N. Basándose en estos resultados, puede concluirse que existe un intervalo óptimo de valores de tensión en el que deben mantenerse muestras de piel *ex vivo* para maximizar su viabilidad. El intervalo de una determinada viabilidad está entre 0,29 y 0,45 N para la piel porcina. La piel cultivada con una tensión inferior o igual a 0,13 o mayor o superior a 0,57 N muestra una viabilidad considerablemente reducida.

Las Figuras 11a a 11i muestran niveles de queratina 17 de una muestra de piel humana herida preparada como se describió anteriormente en niveles variables de tensión. En cada imagen, la tensión de la piel (en newtons; N) se muestra en la esquina inferior derecha de la imagen.

Las Figuras 11a y 11b muestran muestras de piel sin tensión y con tensión de 0,22 N respectivamente. Con estos niveles de tensión, hay poca o ninguna expresión de queratina 17. La expresión de queratina 17 se observa en las Figuras 11c y 11d que son de muestras de piel con tensiones de 0,31 N y 0,46 N respectivamente. La Figura 11e muestra poca o ninguna expresión de queratina 17 con una tensión de 0,63 N. Basándose en estos resultados, puede concluirse que existe un intervalo óptimo de valores de tensión en el que deben mantenerse muestras de piel *ex vivo* para maximizar su viabilidad. El intervalo de una determinada viabilidad está entre 0,31 N y 0,46 N para la piel humana. La piel cultivada con una tensión inferior o igual a 0,22 N o superior a 0,63 N muestra una viabilidad considerablemente reducida.

Estos hallazgos están respaldados además por la Figura 12. La Figura 12a muestra una colección de portaobjetos a partir de los cuales se han determinado los niveles de K17 para piel porcina no herida y herida. La Figura 12b muestra una colección de portaobjetos a partir de los cuales se han determinado los niveles de K17 para piel humana herida. La Figura 12c es un gráfico que representa niveles 155 estimados de queratina 17 medidos según el valor del píxel medio normalizado de las imágenes frente a la tensión de la piel 153 en una muestra de control de piel porcina, una muestra de piel porcina herida y una muestra de piel humana herida. La clave 156 proporciona información para distinguir entre los resultados de las diferentes muestras utilizadas. El valor máximo está dentro del intervalo óptimo 157 mostrado en las Figuras 10 y 11. El segundo valor máximo está causado por la queratina 17 que se ha expresado debido al daño causado por el estiramiento excesivo 159 de la piel.

Las Figuras 13a a 13c son imágenes de muestras de piel no herida que, respectivamente, están *in vivo*, vienen de una fuente estándar industrial y se mantienen en tensión según un ejemplo del método de la presente invención. Las Figuras 13d a 13f son imágenes de muestras de piel herida con láser que, respectivamente, están *in vivo*, vienen de una fuente estándar industrial y se mantienen en tensión según el método de la presente invención. La piel *in vivo* se preparó a partir de una biopsia tomada de un voluntario humano 24 h después de hierirla con el láser Er:YAG.

La tinción muestra una inducción uniforme de K17 en la piel *in vivo* herida. La piel humana cultivada con un nivel de tensión en el que se mejoró u optimizó la viabilidad de la muestra de piel *ex vivo* según el método de la presente invención mostró una respuesta a la herida similar a la que se observa *in vivo*. Esto se muestra claramente cuando se comparan las Figuras 13d y 13f. El modelo estándar industrial no mostró ninguna respuesta a la herida, como se muestra en la Figura 13e.

2. Viabilidad celular (expresión de NQO1)

La Figura 14 es un gráfico 163 que representa gráficamente los niveles de ARNm de NQO1 tras el tratamiento con un activador de Nrf2. La Figura 14 resume un experimento en el que, usando el método de la presente invención, la piel cultivada se trató con un activador de Nrf2 de molécula pequeña (TBE-31) con el fin de evaluar la viabilidad intracelular del tejido. Nrf2 regula transcripcionalmente múltiples genes que desempeñan funciones directas e indirectas en la activación de vías antioxidantes intracelulares.

Uno de los genes que se regula al alza tras la activación de Nrf2 es NAD(P)H deshidrogenasa [quinona] 1 (NQO1). La Figura 14 es un gráfico que muestra los niveles 167 de ARNm de NQO1 obtenidos a partir del ARN total aislado de la piel tratada con el compuesto TBE-31 (un potente activador de Nrf2) en las concentraciones 169 indicadas. Aquí se muestra que la viabilidad celular de la piel cultivada en este dispositivo responde a activadores de Nrf2 en mayor medida de lo que lo hace la piel estándar industrial.

3. Viabilidad mitocondrial (ensayo de transformación del MTT)

La Figura 15 es un gráfico 171 que representa la actividad metabólica 175 de la piel fresca 177, la piel en tensión según un ejemplo del método de la presente invención 179, la piel sin tensión 181 y la piel desvitalizada 183. El gráfico muestra respuestas similares de la piel fresca 177 y la piel en tensión según un ejemplo del método de la presente invención 179.

En la presente memoria se pueden incorporar mejoras y modificaciones sin desviarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Método para mejorar la viabilidad *ex vivo* de un tipo de tejido cutáneo, comprendiendo el método las etapas de:
 - 5 montar muestras del tipo de tejido cutáneo en un soporte de muestras de piel;
 aplicar tensiones distintas a, al menos, algunas de las muestras; y
 medir la capacidad de las, al menos, algunas de las muestras para mantener características de la piel viva de manera que, para el tipo de tejido cutáneo, las mediciones de características de la piel viva determinen valores de la tensión de la piel que mejoren la viabilidad *ex vivo* del tipo de tejido cutáneo, donde los valores de la tensión de la piel comprenden un intervalo continuo de valores de tensión y se realizan mediciones de

10 tensión en múltiples muestras del tipo de tejido cutáneo para llenar el intervalo de valores de tensión entre no estirado y un estiramiento máximo.
2. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la etapa de aplicar tensión comprende estirar la muestra de piel y mantenerla en posición sobre el soporte de muestras de piel.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la etapa de medir la tensión comprende

15 aplicar una fuerza medible a la superficie de la muestra de piel que se mantiene en el soporte de muestras de piel.
4. Método según la reivindicación 3 en el que la fuerza se aplica poniendo en contacto una sonda con la superficie de la muestra de piel que desplaza la piel una cantidad predeterminada para estirar la piel, donde la cantidad de fuerza para un desplazamiento dado proporciona una medida de la tensión de la piel.
- 20 5. Método según la reivindicación 3 o la reivindicación 4 en el que se usa un soporte de muestras de piel anular y se aplica un factor de corrección a la medición de fuerza para tener en cuenta el efecto del radio del soporte de muestras de piel.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la etapa de medir la capacidad de la primera muestra u otra para mantener características de piel viva comprende herir la piel y medir la expresión de queratina 17 como una indicación de viabilidad tisular.
- 25 7. Método según la reivindicación 6 en el que la etapa de herir la piel se lleva a cabo usando un dispositivo que asegure que las heridas tengan una profundidad y cobertura uniformes a través de la piel.
8. Método según la reivindicación 6 o la reivindicación 7 en el que la etapa de herir la piel utiliza una fuente de láser para herir la piel.
- 30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la etapa de medir la capacidad de la primera muestra u otra para mantener características celulares de piel viva comprende medir la activación de Nrf2 en respuesta a moléculas pequeñas midiendo los niveles de ARNm de NQO1.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el soporte de muestras de piel está montado en una placa de cultivo y aplica tensión a la muestra de tejido cutáneo.
- 35 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además cultivar una muestra de tejido cutáneo con una tensión determinada por el método de las reivindicaciones 1-10.
12. Método según la reivindicación 11 en el que, para piel porcina y humana, la muestra de tejido cutáneo se cultiva con una tensión en el intervalo de 0,22 N a 0,57 N, suponiendo un diámetro y una distancia de desviación específicos y constantes.
- 40 13. Método según la reivindicación 12 en el que el intervalo comprende de 0,29 N a 0,46 N, para un diámetro del soporte de muestras de piel y una distancia de desviación dados.

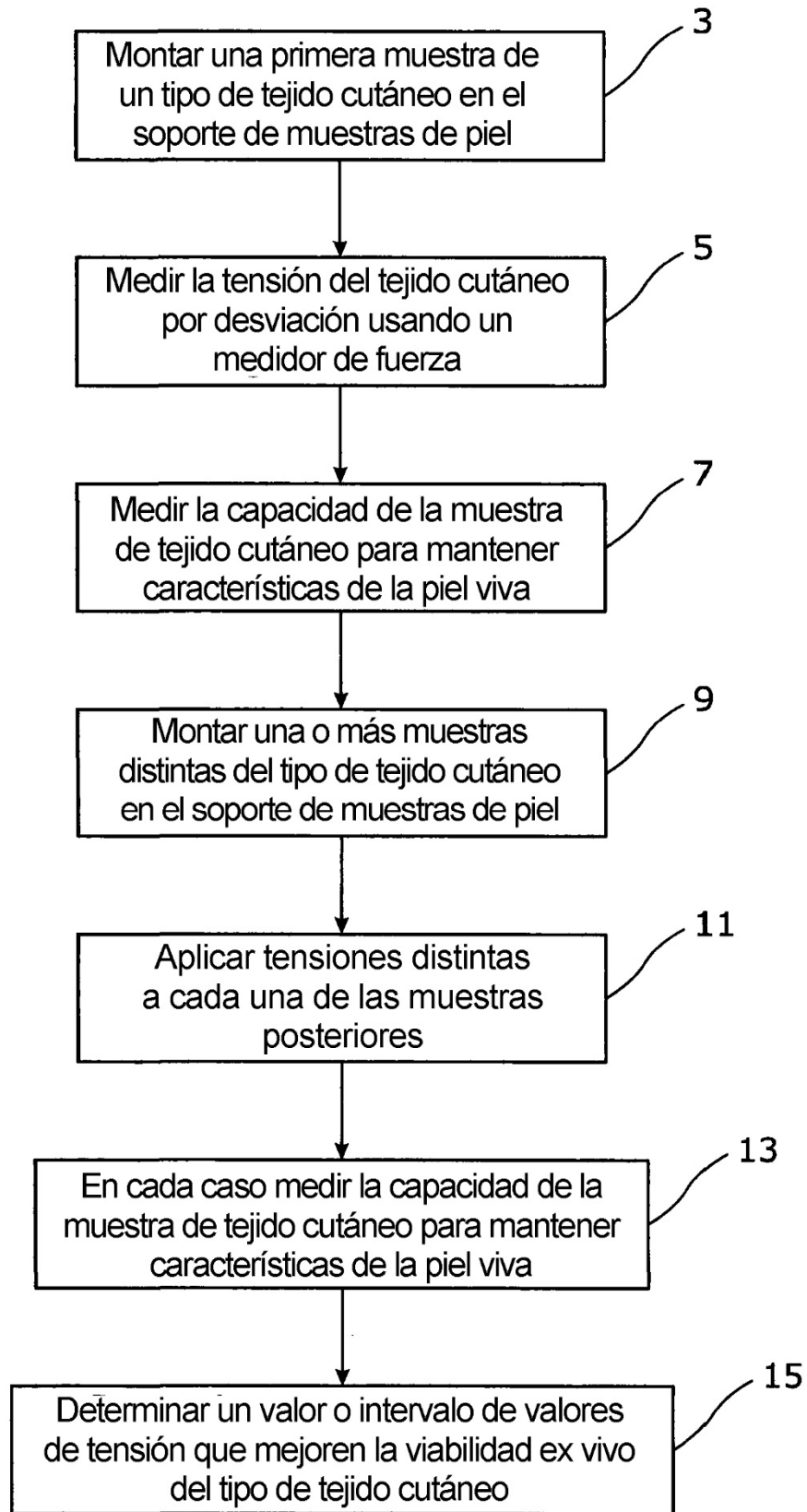


Fig. 1

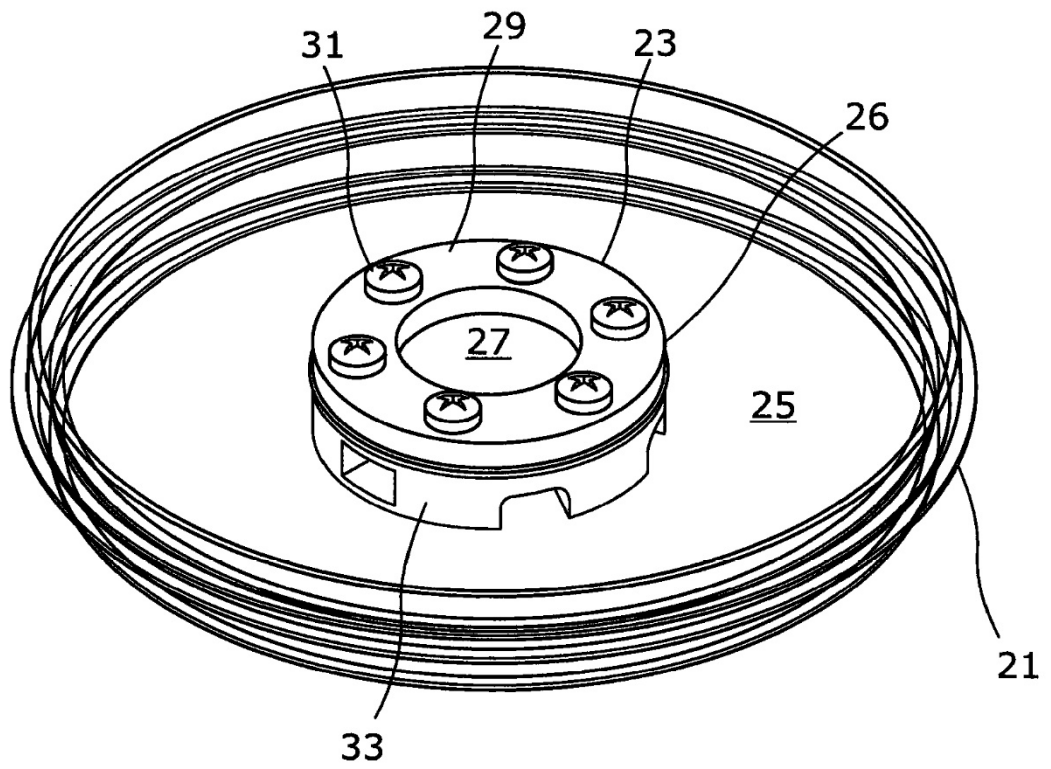


Fig. 2a

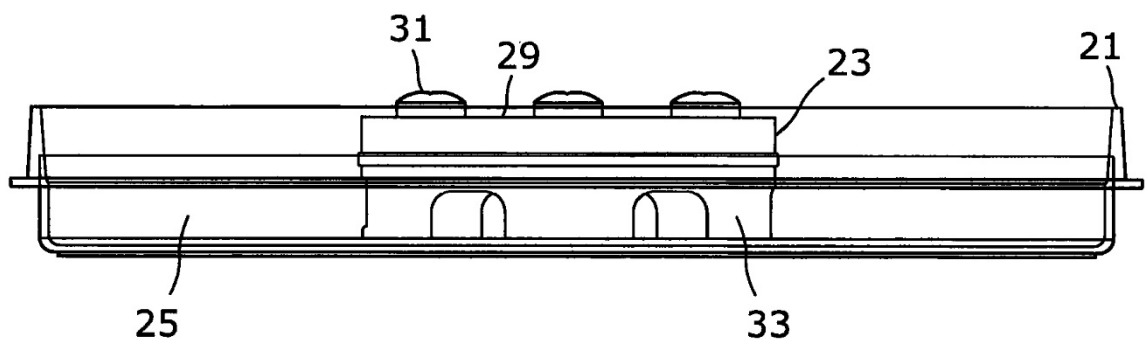


Fig. 2b

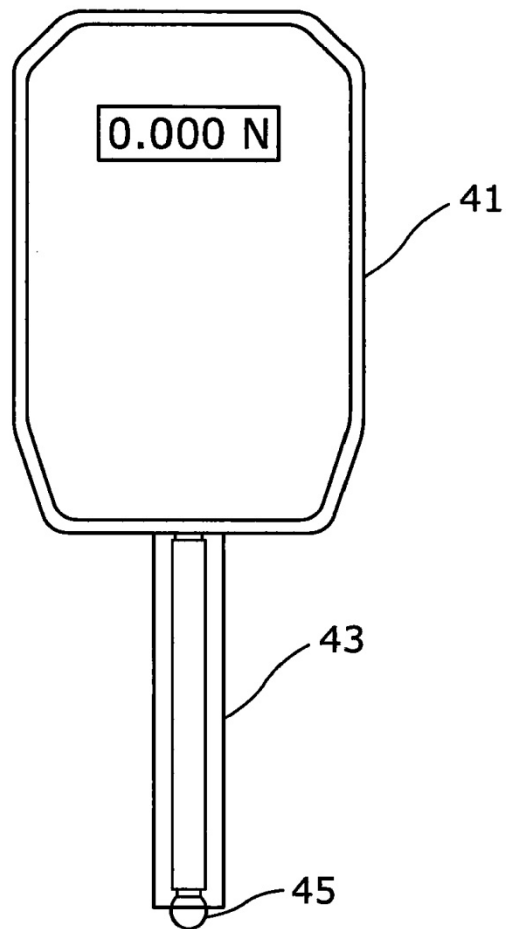


Fig. 3

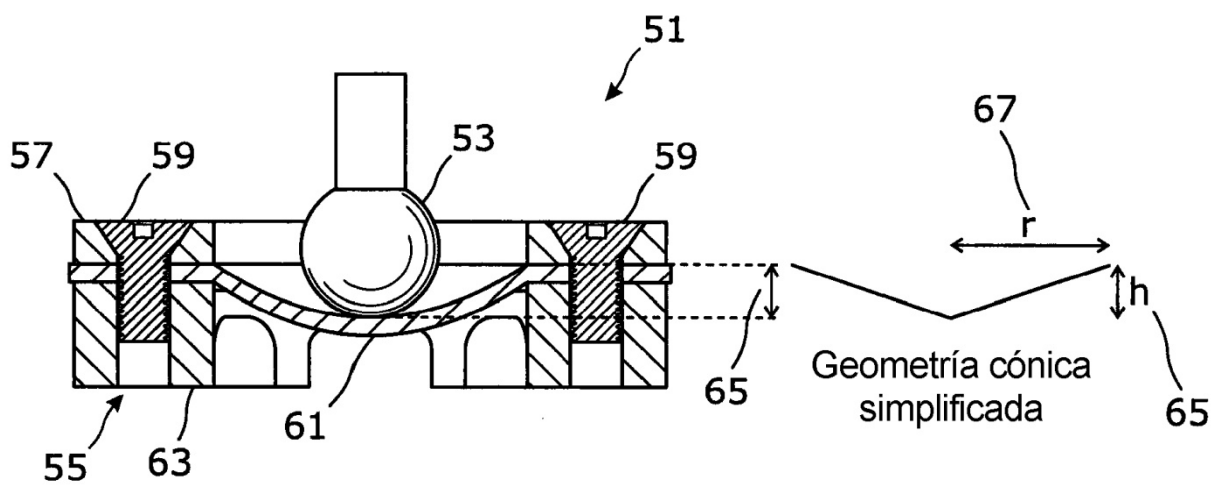


Fig. 4

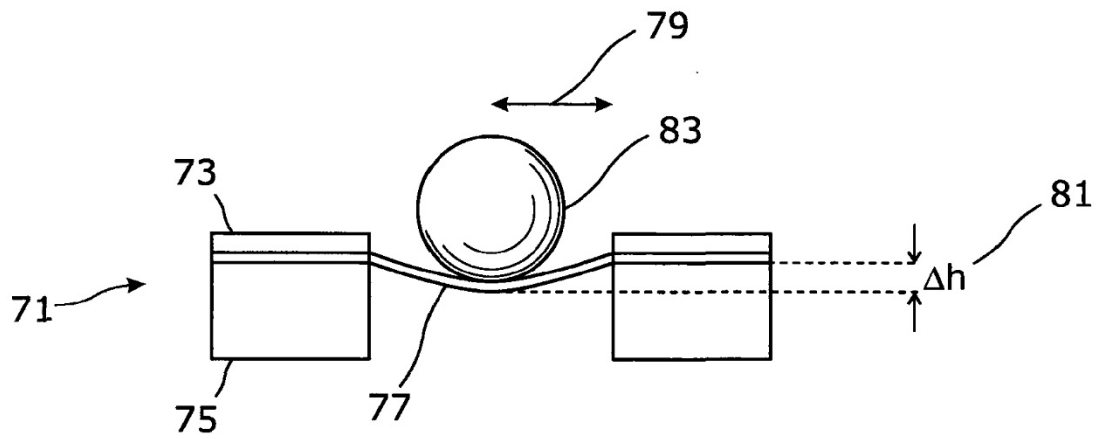


Fig. 5

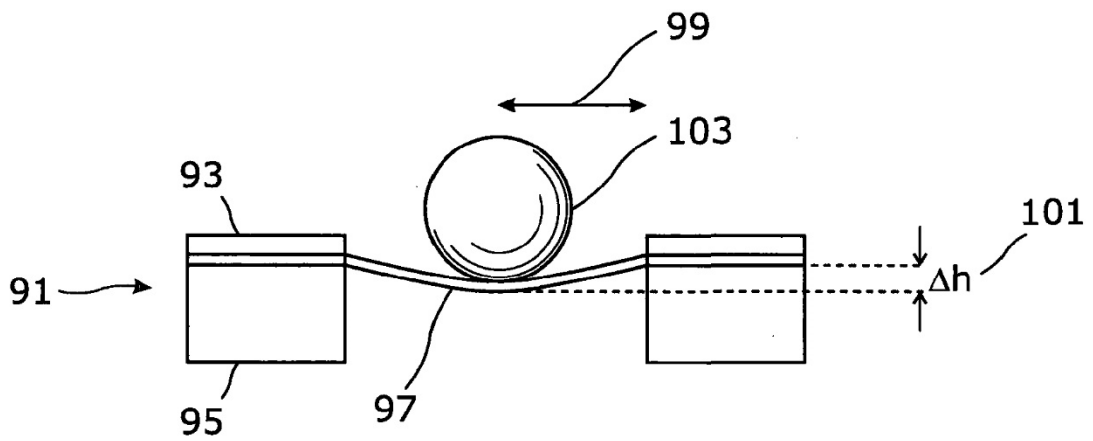


Fig. 6

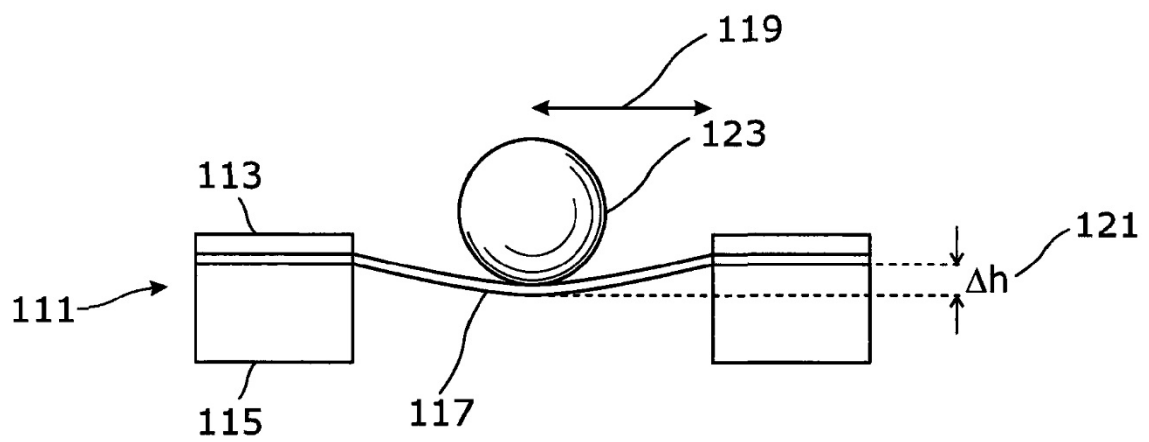


Fig. 7

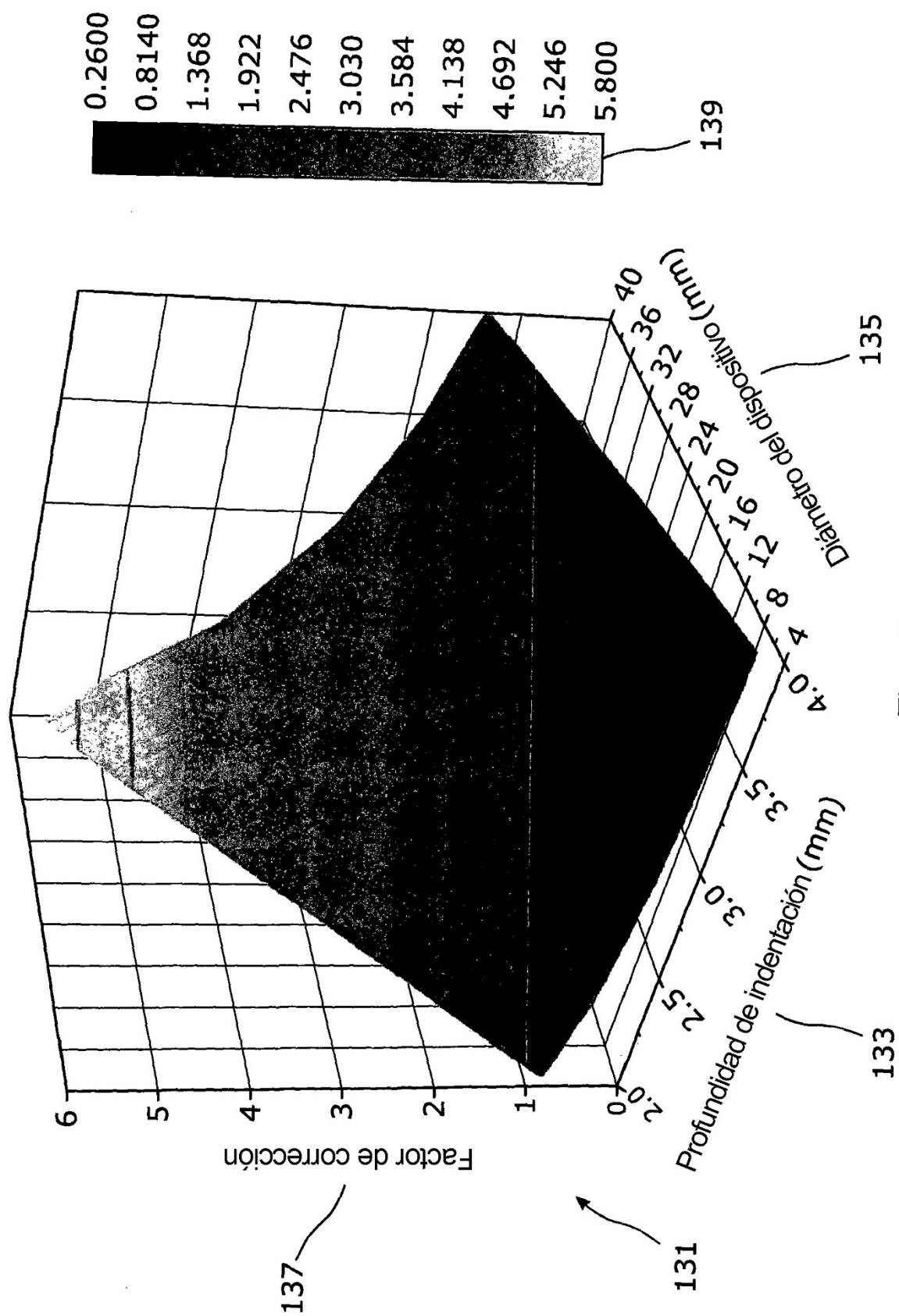


Fig. 8

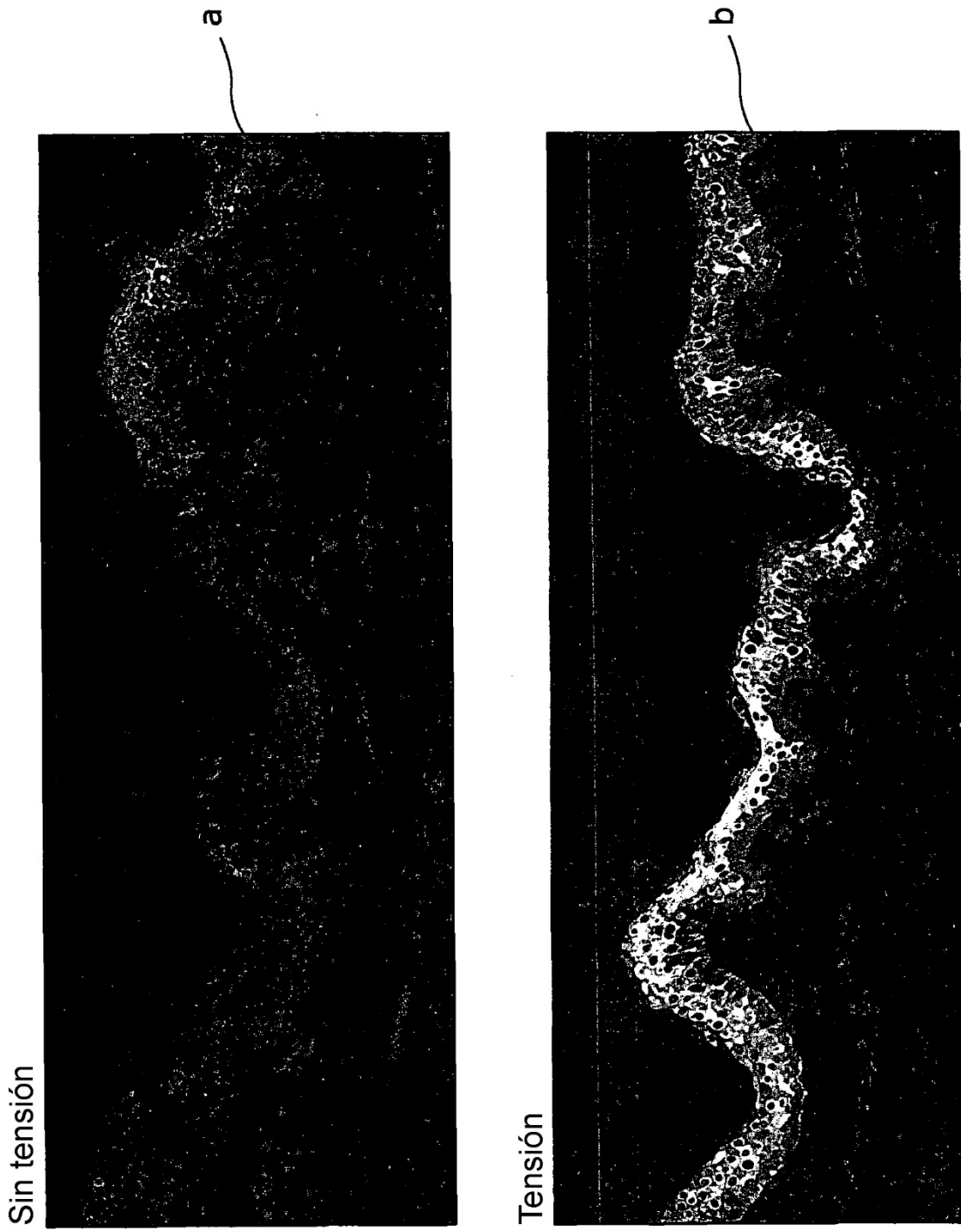


Fig. 9

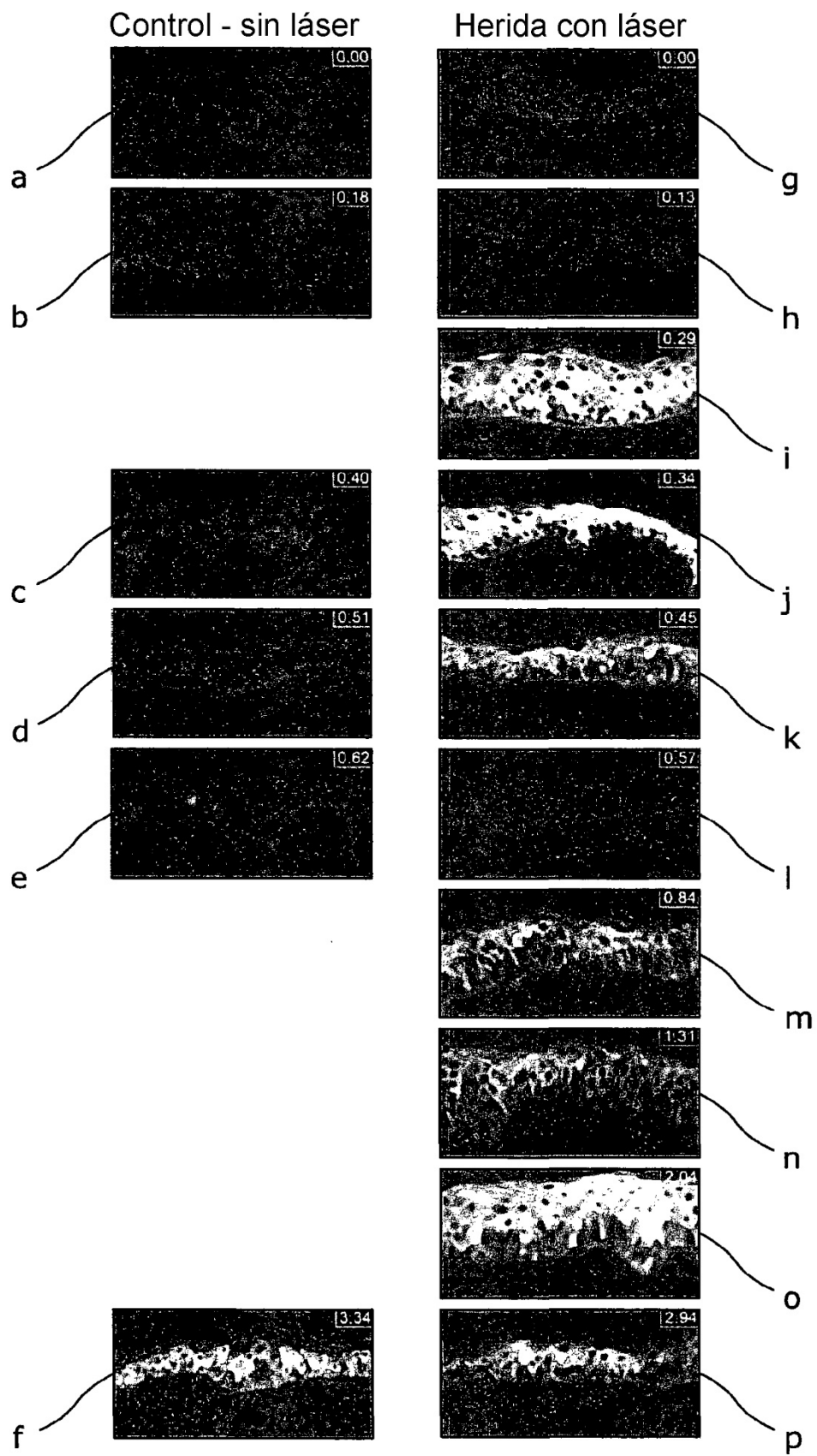


Fig. 10

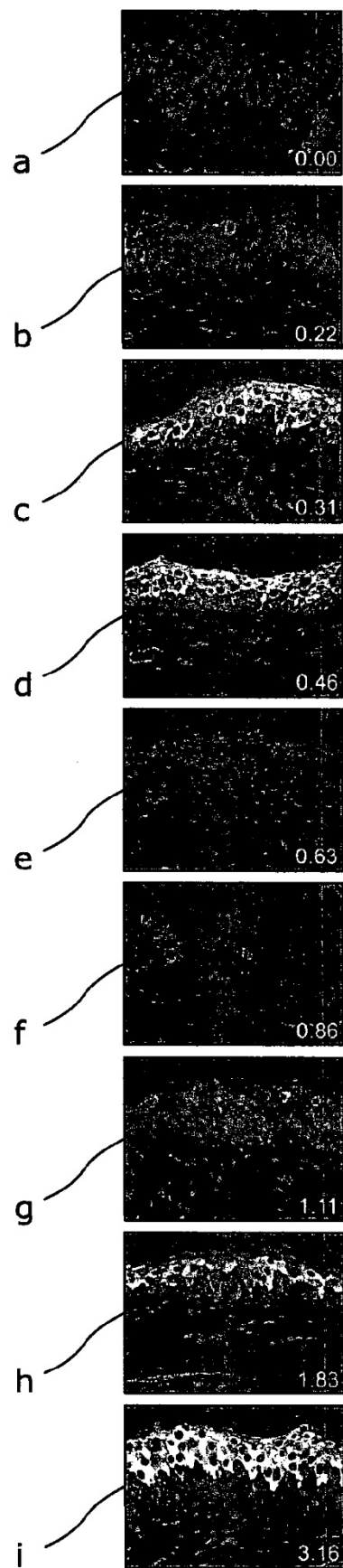
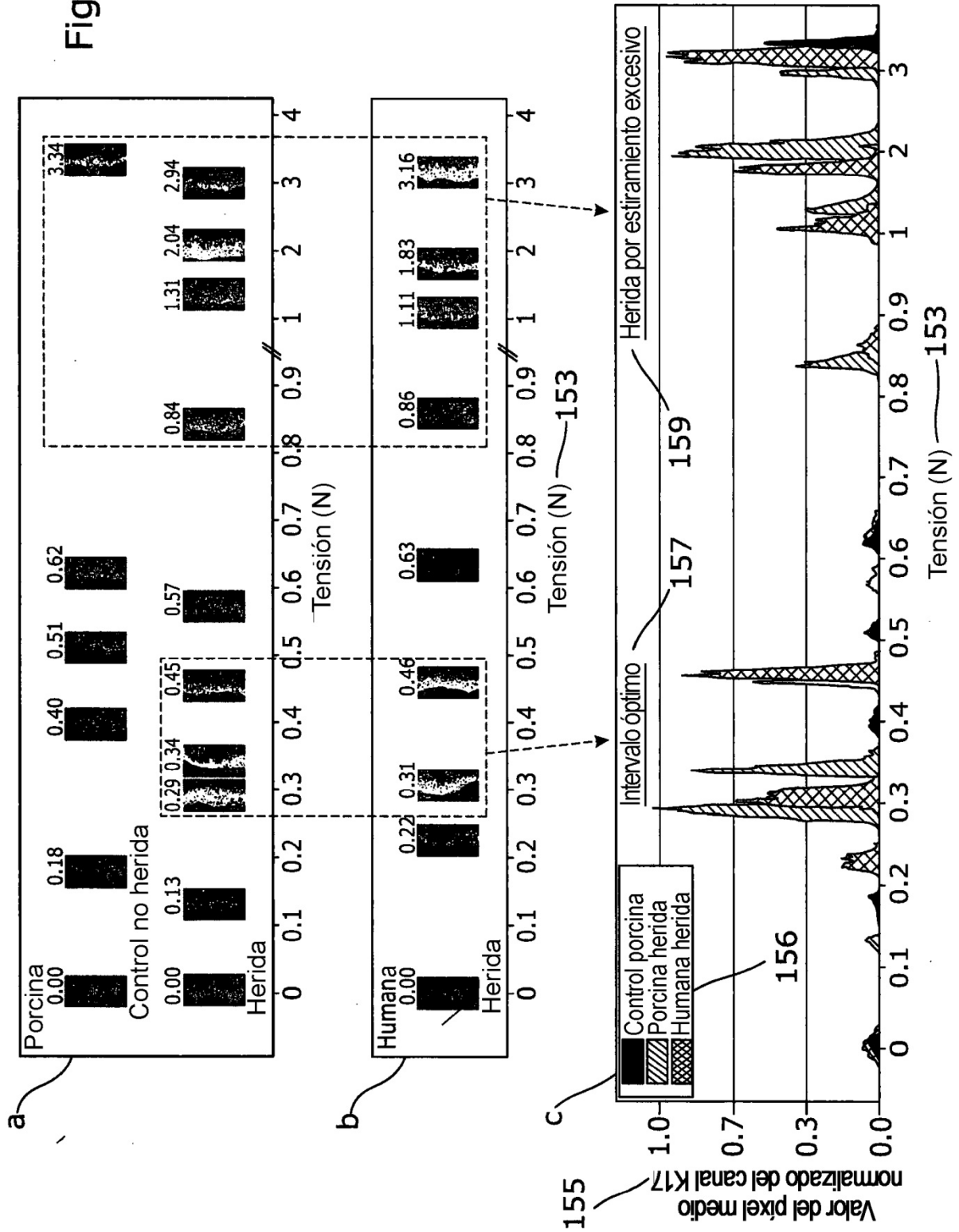


Fig. 11

Fig. 12



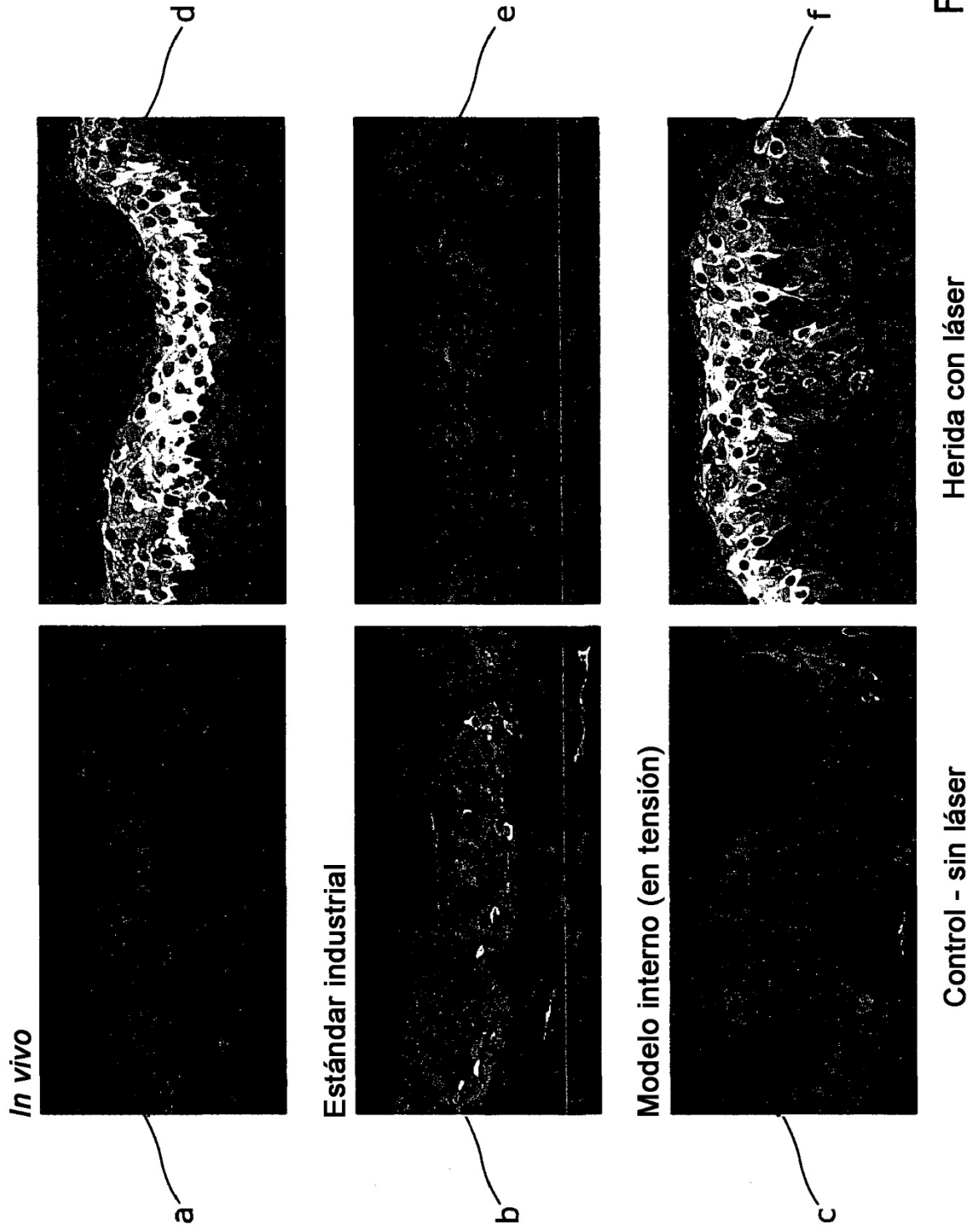


Fig. 13

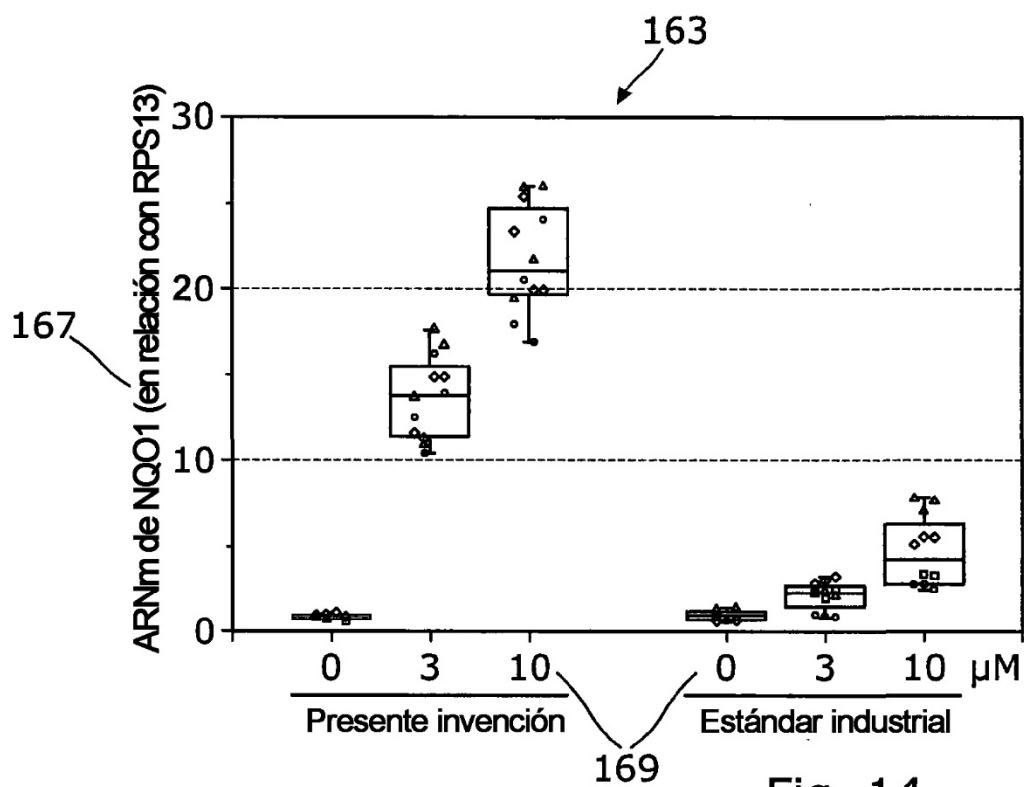


Fig. 14

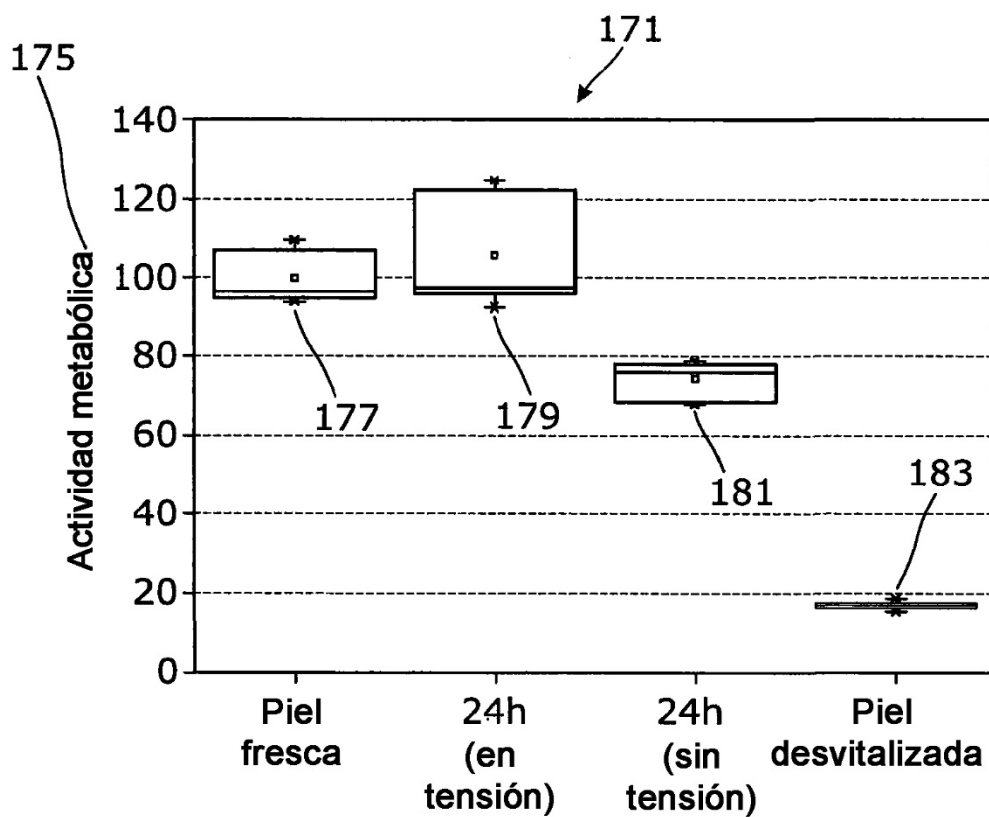


Fig. 15