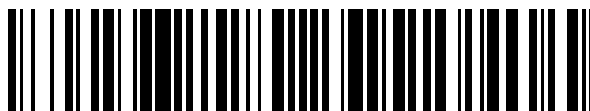


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 300**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/36** (2015.01)

**C12M 3/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2002 E 15159890 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2957288**

54 Título: **Dispositivo de preparación de suspensión celular**

30 Prioridad:

**07.02.2001 AU PR298901**

**04.04.2001 US 281527 P**

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

**10.03.2020**

73 Titular/es:

**AVITA MEDICAL LTD (100.0%)**

**Unit B1, Beech House, Melbourn Science Park,  
Cambridge Road, Melbourn, Royston  
Hertfordshire SG8 6HB, GB**

72 Inventor/es:

**STONER, MARIE y  
WOOD, FIONA**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 747 300 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**

Dispositivo de preparación de suspensión celular

5 Esta descripción se refiere a una técnica simple, rápida y rentable para el injerto de células, y en particular a un dispositivo para preparar una suspensión de células a partir de una muestra de tejido obtenida de un sitio donante y aplicar esa suspensión de células a un sitio receptor.

Antecedentes

10 Existen muchos métodos para el tratamiento de heridas conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, existen técnicas de injerto de piel cuyo objetivo es reconstruir la piel que cubre áreas del cuerpo donde existe ya sea daños o defectos en la piel. En general, estos tipos de injertos se clasifican de acuerdo con su relación huésped-donante y por su grosor. El injerto más aplicado clínicamente es el injerto autólogo, en el cual se toma tejido de un área del cuerpo y se aplica a otra área. El tejido injertado desarrolla a continuación un nuevo suministro de sangre y se une a los tejidos subyacentes.

20 Actualmente se usan varios tipos de injertos de piel, lo que incluye los injertos de grosor parcial, de grosor total y los microinjertos. Cada uno de estos tipos de injerto debe prepararse mediante el uso de ciertas técnicas, y cada una tiene sus ventajas y desventajas inherentes. Los injertos de grosor parcial a menudo requieren una experiencia y tiempo considerables y equipamiento costoso para realizarlos. Además, los sitios donantes son dolorosos, resultan en cicatrices y limitan el área que puede cubrirse. Aunque pueden ser más exitosos que los injertos de grosor total, son menos atractivos generalmente desde el punto de vista cosmético. Los injertos de grosor completo requieren menos experiencia o equipamiento menos costoso, y su apariencia cosmética es mejor que la de los injertos de grosor parcial. Sin embargo, los injertos de grosor completo no "cogen" tan bien como los injertos de grosor parcial. Los microinjertos se logran más fácilmente y no requieren instrumentos especiales. Sin embargo, su apariencia cosmética no es tan buena como otras técnicas, ya que la cicatrización resultante resulta inaceptable.

30 Una variación de las técnicas de injerto anteriores es el injerto de malla, que es un tipo de injerto de piel de grosor parcial o de grosor total en el que se cortan hileras paralelas de hendiduras en el tejido que se trata. Algunas de las ventajas de los injertos de malla incluyen: una mayor cobertura del área afectada, drenaje de sangre o suero desde debajo del injerto y mayor conformidad del injerto con las áreas no uniformes del receptor. Esta técnica ha sido muy exitosa, con un "agarre" del 90 al 100 por ciento cuando los injertos se han aplicado sobre lechos de granulación sanos.

35 Una alternativa al injerto de piel parcial es formar una ampolla bajo succión en un sitio donante y trasplantarla al sitio receptor. La producción de ampollas para tratar heridas se ha usado desde la década de 1960. Las ampollas se producen por un dispositivo de succión, tal como Dermovac™, a una presión de succión de aproximadamente 250-300 mmHg durante 1-2 horas. A continuación, se cortan las ampollas y se colocan sobre la herida. El tiempo de curación es de alrededor de 10-14 días. Existen varias desventajas de este método, tales como que la cantidad de tiempo requerida para preparar el injerto es demasiado larga y el injerto puede no resultar en la repigmentación del área; o es frecuente una pigmentación desigual alrededor de los bordes del área de tratamiento.

45 El microinjerto se ha convertido en un enfoque más común para cubrir un área grande e implica "recortar" varias secciones muy pequeñas de tejido de un sitio donante y aplicarlas después a un vendaje, que a su vez se aplica al área de la herida.

50 La tecnología más avanzada para la generación de un tejido in vitro es el cultivo de epidermis. Los autoinjertos epiteliales cultivados (CEA) son un complemento importante en la cobertura de quemaduras y otras situaciones en las que grandes áreas de la superficie del cuerpo experimentan una pérdida de piel. Existen muchos centros en todo el mundo con instalaciones de cultivo de tejidos cuyo objetivo es producir injertos epiteliales autólogos para su uso en una amplia variedad de aplicaciones. La utilidad y aplicación de los CEA se relaciona con su capacidad para lograr láminas de células confluentes adecuadas para el injerto. Esta técnica supera muchas de las desventajas de los tratamientos previos descritos anteriormente. Por ejemplo, los autoinjertos epiteliales cultivados reducen la demanda de sitios donantes. No obstante, estos autoinjertos son de crecimiento lento y requieren tiempo para el cultivo de los injertos, que a menudo excede el tiempo de preparación de los sitios receptores.

55 La presente descripción proporciona una suspensión celular junto con un método para preparar esa suspensión y un dispositivo para su preparación, cada uno de los cuales busca mejorar una o más de las desventajas asociadas con la tecnología de injertos de la técnica anterior.

60 Resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

65 Esta descripción se refiere a una suspensión celular única y a un método para su preparación que es rápido, eficiente y simple de preparar y aplicar. Además, se refiere a un método para el tratamiento de un paciente mediante el uso de la suspensión celular única y a un aparato adecuado para su uso en la preparación del método. Se ha encontrado que el

uso del dispositivo descrito, aunque no es esencial, reduce significativamente la complejidad asociada con el uso de la tecnología de injerto convencional tal como CEA.

5 En un primer aspecto de la invención, se proporciona un aparato para desarrollar perioperatoriamente a un paciente una suspensión celular a partir de una muestra de tejido de piel, y para aplicar inmediatamente la suspensión celular a un sitio de injerto del paciente, que comprende:

(a) un conjunto de herramientas requeridas para la recolección de células;

(b) un vaso de enzima y una solución estéril para la suspensión de la enzima;

10 (c) un medio de calentamiento adecuado para calentar la solución enzimática a la temperatura requerida y que es capaz de mantener esa solución a la temperatura deseada durante un período de tiempo adecuado, en donde la solución enzimática precalentada se usa para incubar una muestra de tejido de piel y contiene una cantidad de enzima suficiente para disociar el estrato celular en la muestra de tejido de piel;

(d) una cavidad de filtro que comprende un medio de filtro de un tamaño de filtro entre 50  $\mu\text{m}$  y 200  $\mu\text{m}$ , para retirar los congregados celulares de las células recolectadas de la muestra de tejido de piel, para formar la suspensión celular que es adecuada para la dispersión inmediata al sitio de injerto;

15 (e) un pocillo de contención de fluidos para el almacenamiento de la solución de nutrientes; y

(f) un reservorio para retener la muestra de tejido de piel y la solución de nutrientes.

20 Las modalidades preferidas de la invención en cualquiera de sus varios aspectos son como se describen más abajo o como se definen en las sub reivindicaciones.

Cuando la solución enzimática se pone en contacto con el medio de calentamiento se calienta, preferentemente, de manera que evita el calentamiento localizado dentro de la solución.

25 Otros aspectos y ventajas de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la descripción que sigue, que procede con referencia a las siguientes figuras ilustrativas.

Breve descripción de las figuras

30 La Figura 1 ilustra una vista en perspectiva del aparato con la tapa abierta y el segundo miembro en su lugar.

La Figura 2 ilustra una vista en perspectiva del aparato con la tapa abierta y el segundo miembro retirado e invertido.

La Figura 3a ilustra una vista en perspectiva del primer miembro del aparato.

La Figura 3b ilustra una vista en perspectiva desde atrás del primer miembro del aparato.

35 La Figura 4 ilustra una vista en perspectiva de la base del aparato.

Descripción detallada

General

40 Los expertos en la técnica apreciarán que lo que se describe en la presente descripción es susceptible a variaciones y modificaciones distintas a las descritas específicamente. Debe entenderse que la presente descripción incluye todas dichas variaciones y modificaciones. Incluye, además, todas las etapas, características, composiciones y compuestos referidos a o indicados en esta descripción, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones o cualquiera de dos o más de las etapas o características.

45 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones siguientes, a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra manera, la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros declarados pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

50 Descripción

Visto lo anterior, esta descripción proporciona un método y/o dispositivo único adecuado para producir una suspensión celular trasplantable de tejido vivo adecuada para injertar en un paciente. Al aplicar el método y/o al usar el dispositivo, se recolecta tejido donante, se somete a un medio de disociación de tejido, se recolectan las células adecuadas para injertarlas de nuevo en un paciente y se dispersan en una solución que es adecuada para la dispersión inmediata sobre el sitio receptor del injerto.

60 La descripción en la presente descripción tiene muchas ventajas sobre la técnica anterior, algunas de las cuales se ilustran en los siguientes párrafos.

1. Proporciona un método eficiente en tiempo para suministrar una cobertura celular a un tejido en un contexto clínico. Es decir, las células están disponibles cuando se necesitan en el momento de la cirugía. Esto puede lograrse porque el período de preparación de las células es muy corto, lo que permite que el injerto se realice perioperatoriamente o en las consultas de un médico especialista o médico general.

65

2. Proporciona un método y un aparato que reduce significativamente la complejidad asociada con el uso de CEA convencionales y es particularmente útil en casos de lesiones por quemadura que han acudido tarde. En algunos casos, no se dispone de las células en el momento de la cirugía, ya sea debido al retraso en la remisión de un paciente con una quemadura sin curar, o simplemente porque el tiempo necesario para el cultivo de los injertos ha superado el requerido para la preparación del lecho de herida del receptor. La presente descripción mejora el problema del tiempo de preparación del injerto.
3. Ayuda a lograr una cobertura celular rápida en áreas de lesiones y sitios donantes. Proporciona un medio para reducir el tamaño de los sitios donantes: el sitio para la biopsia del donante es notablemente menor que un sitio donante de injerto de piel parcial y reduce o elimina el uso de sitios donantes para el injerto de piel parcial; mejora la tasa de expansión de la cobertura celular; mejora la tasa de curación de quemaduras pequeñas; es útil para áreas pequeñas de reconstrucciones de la piel, tales como cicatrices; y mejora la calidad de la cicatriz.
4. Mejora los problemas asociados con el uso de las soluciones usadas durante el proceso de cultivo de tejidos convencional. De acuerdo con el método de preparación y tratamiento, las células usadas en un injerto se suspenden en una solución de nutrientes libre de suero xenogénico. A continuación, esa suspensión se coloca directamente en el sitio receptor.
5. Proporciona un medio para el tratamiento de diversos trastornos o enfermedades de la piel. Por ejemplo, puede usarse para lo siguiente: renovación epidérmica, reemplazo después de la pérdida de piel, coincidencia del sitio durante la repigmentación de un área de piel, tratamiento de heridas por quemaduras, leucodermia, vitiligo, piebaldismo, en el tratamiento de cicatrices, por ejemplo, causadas por una incorrecta cicatrización de la herida, dirección inadecuada de la cicatriz o distorsión de la cicatriz por contracción de la herida, cicatrices de acné; dermoabrasión cosmética para renovación, renovación después del tratamiento con láser y en asociación con reconstrucción dérmica. Adicionalmente, el método puede usarse para la terapia de reemplazo celular, lo que incluye, por ejemplo, el tratamiento de reemplazo de células nerviosas, el tratamiento de reemplazo de células epiteliales (tales como células uroteliales, células de la mucosa bucal y células epiteliales respiratorias), el tratamiento de reemplazo de células endoteliales y el tratamiento de reemplazo de células precursoras osteogénicas.
6. Proporciona un medio para producir una suspensión de células en una relación entre sí comparable a las observadas in situ. Es decir, debido a la forma de preparación de la suspensión celular, las células tales como las células basales queratinocitos, las células de Langerhans, los fibroblastos y los melanocitos tienen típicamente tasas de supervivencia mejoradas en comparación con las técnicas de cultivo de tejidos estándar, de manera que el cultivo celular selectivo puede resultar en la pérdida de ciertos tipos de células. Esto tiene la ventaja de permitir la correcta repigmentación de la piel después de un injerto de piel.
7. Permite una cirugía y curación más rápidas, lo que reduce de esta manera el trauma para los pacientes durante la fase de su atención médica.
- Se proporciona un método para preparar una suspensión celular adecuada para su uso en la renovación y regeneración de tejido dañado.
- De acuerdo con este método, el tejido (preferentemente, de naturaleza autóloga) se obtiene de un paciente por medios conocidos en la técnica de injerto tisular. Preferentemente, esto se logra al obtener una biopsia tisular. Durante la obtención de la biopsia debe considerarse la profundidad de la biopsia y el tamaño del área de superficie. La profundidad y el tamaño de la biopsia influyen en la facilidad con la que puede realizarse el procedimiento y la velocidad con la que un paciente se recupera del procedimiento. En una forma muy preferida de la invención, el sitio donante debe elegirse para que coincida adecuadamente con el sitio receptor, por ejemplo, postauricular para cabeza y cuello, muslo para las extremidades inferiores, parte interna del brazo para las extremidades superiores o palma de las manos para la planta del pie o viceversa.
- Una vez que se ha recolectado una biopsia de un paciente, la muestra de tejido se somete a un medio de disociación físico y/o químico capaz de disociar el estrato celular en la muestra de tejido.
- Los métodos para disociar las capas celulares dentro de los tejidos se conocen bien en el campo. Por ejemplo, el medio de disociación pueden ser ya sea un medio de ruptura físico o uno químico. El medio de disociación física puede incluir, por ejemplo, raspar la muestra de tejido con un escalpelo, triturar el tejido, separar las capas mediante cortes físicos o perfundir el tejido. El medio de disociación química puede incluir, por ejemplo, digestión con enzimas tales como tripsina, dispasa, colagenasa, tripsina-EDTA, termolisina, pronasa, hialuronidasa, elastasa, papaína y pancreatina. Además, pueden usarse soluciones no enzimáticas para la disociación de tejido.
- Preferentemente, la disociación de la muestra de tejido se logra al colocar la muestra en una solución enzimática precalentada que contiene una cantidad de enzima suficiente para disociar el estrato celular en la muestra de tejido. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante el uso de una solución de tripsina, sin embargo, puede usarse para este propósito cualquier otra enzima tal como dispasa, colagenasa, tripsina-EDTA, termolisina, pronasa, hialuronidasa, pancreatina, elastasa y papaína que haga que las células se separen de otras células o de superficies sólidas. Cuando la enzima usada

es tripsina, la solución enzimática usada en el método está, preferentemente, libre de calcio y magnesio. Una de dichas soluciones es, preferentemente, solución salina tamponada con fosfato libre de iones de calcio y de magnesio.

5 Cuando la biopsia tisular se deriva de la piel de un paciente (que comprende células epiteliales-dérmicas), la cantidad de tripsina que podría usarse en el método es, preferentemente, entre aproximadamente 5 y 0,1 % de tripsina por volumen de solución. Es conveniente que la concentración de tripsina de la solución sea aproximadamente de 2,5 al 0,25 %, donde la más preferida es aproximadamente 0,5 % de tripsina.

10 El período de tiempo durante el cual la muestra de tejido se somete a la solución de tripsina puede variar en dependencia del tamaño de la muestra de biopsia tomada. Preferentemente, la muestra de tejido se coloca en presencia de la solución de tripsina durante un tiempo suficiente para debilitar la unión cohesiva entre el estrato de tejido. Por ejemplo, cuando la muestra de tejido se toma de la piel de un paciente, la muestra puede colocarse en tripsina durante un período de 5 a 60 minutos. Preferentemente, la muestra de tejido se sumerge en la solución de tripsina durante entre 10 y 30 minutos, y el período óptimo es de 15 a 20 minutos para la mayoría de las muestras de tejido.

15 Después que la muestra de tejido se ha sumergido en la solución de tripsina durante un período de tiempo adecuado, la muestra se retira de la tripsina y se lava con la solución de nutrientes. El lavado de la muestra de tejido puede implicar ya sea una inmersión parcial o completa de la muestra tratada en la solución de nutrientes. Alternativamente, y con mayor preferencia, la solución de lavado se hace gotear sobre la muestra de tejido en un volumen suficiente para eliminar y/o diluir significativamente cualquier exceso de solución de tripsina de la superficie de la muestra. Preferentemente, cualquier dilución que pudiera producirse conduciría a menos del 0,05 % de tripsina en la solución de nutrientes.

20 La solución de nutrientes usada en el método debería ser capaz de reducir significativamente y, con mayor preferencia, eliminar el efecto de la tripsina, ya sea por dilución o por neutralización. La solución de nutrientes usada en el método tendrá además, preferentemente, las características de (i) estar libre de al menos suero xenogénico, (ii) ser capaz de mantener la viabilidad de las células hasta que se aplican a un paciente y (iii) ser adecuada para la aplicación directa a una región en un paciente sometido a injerto tisular. La solución puede ser cualquiera desde una solución salina básica hasta una solución de nutrientes más compleja. Preferentemente, la solución de nutrientes está libre de todo suero, pero contiene diversas sales que simulan las sustancias que se encuentran en los fluidos corporales; este tipo de solución se denomina a menudo solución salina fisiológica. El fosfato u otras sustancias no tóxicas pueden, además, tamponar la solución para mantener el pH a aproximadamente niveles fisiológicos. Una solución de nutrientes adecuada preferida particularmente es la solución de Hartmann.

25 Después de la aplicación de la solución de nutrientes a la muestra de tejido, el estrato celular de la muestra se separa, lo que permite extraer del material celular las células capaces de reproducirse y suspenderlas en la solución de nutrientes. Cuando la muestra de tejido es piel, la dermis y la epidermis se separan, preferentemente, para permitir el acceso a la unión dermoepitelial de ambas superficies.

30 A continuación, las células capaces de reproducirse se extraen del estrato separado mediante cualquier medio conocido en la técnica. Preferentemente, las células reproductivas se raspan de la superficie del estrato mediante el uso de un instrumento tal como un escalpelo. Las células capaces de reproducirse dentro de la unión dermoepitelial incluyen, pero no se limitan a, células basales queratinocitos, células de Langerhans, fibroblastos y melanocitos. Después de la liberación de las células de la muestra de tejido, estas se suspenden en la solución de nutrientes. Preferentemente, solo se aplica un pequeño volumen de solución de nutrientes a la muestra de tejido durante esta etapa de recolección; de cualquier otra manera, la suspensión puede volverse demasiado fluida, lo que proporciona dificultades para aplicar la suspensión al injerto.

35 Preferentemente, para evitar congregados celulares excesivamente grandes en la suspensión celular, la suspensión se filtra. En esta etapa preferida, puede usarse cualquier filtro capaz de separar congregados celulares excesivamente grandes de la suspensión. En una forma muy preferida, el tamaño del filtro está entre 50  $\mu\text{m}$  y 200  $\mu\text{m}$ . Con mayor preferencia, está entre 75  $\mu\text{m}$  y 150  $\mu\text{m}$ , donde 100  $\mu\text{m}$  es un ejemplo específico.

40 Antes de la aplicación en el sitio de injerto o inmediatamente después del filtrado, la suspensión celular puede diluirse para producir una densidad celular apropiada adecuada para el propósito para el cual se usará la suspensión.

45 En consecuencia, se proporciona una suspensión celular acuosa producida mediante el método descrito en la presente descripción. La suspensión celular proporcionada mediante este método es muy adecuada para la regeneración tisular y las técnicas de injerto. Una ventaja importante de usar dicha suspensión en la tecnología de injerto es que puede usarse para expandir considerablemente el área o el volumen de una herida que puede tratarse rápidamente mediante la multiplicación in situ de un número limitado de células. El número y la concentración de células sembradas sobre el sitio de injerto pueden variarse mediante la modificación de la concentración de la células en suspensión, o mediante la modificación de la cantidad de suspensión que se distribuye en un área o volumen dado del sitio de injerto.

50 Al suspender las células en una solución de nutrientes que, al menos, (i) está libre de suero xenogénico, (ii) es capaz de mantener la viabilidad de las células hasta que se aplican a un paciente y (iii) es adecuada para la aplicación directa a una región en un paciente sometido a injerto tisular, los inventores han encontrado que se mejora el resultado de los

injertos en pacientes. Una explicación parcial de esto parece atribuirse a la eliminación del suero xenogénico y, con mayor preferencia, de todo el suero de la suspensión celular. El suero xenogénico es un aditivo común en el medio de cultivo de injerto y se conoce que produce problemas infecciosos y de hipersensibilidad potenciales. No obstante, dicho suero se requiere generalmente para la expansión in vitro de las células y para neutralizar la acción de la enzima si la enzima usada es la tripsina. La solución de nutrientes usada en la presente descripción no requiere dicho suero porque la población celular dentro de la suspensión no se expande antes de la aplicación al sitio de injerto. Más bien, se estimula la multiplicación celular en el paciente en lugar de en un sistema in vitro. Cuando se usa tripsina, la neutralización se logra por otros medios.

Otra característica única de la suspensión celular producida es que la composición de las células en la preparación celular es comparable a la observada in situ en comparación con la preparación celular de la técnica anterior. Una posible explicación para esto es que en la técnica anterior, el cultivo de la preparación celular usa cultivo selectivo para los queratinocitos, por lo tanto, se produce la pérdida de constituyentes celulares tales como fibroblastos y melanocitos, mientras que la suspensión celular producida de acuerdo con la presente descripción tiene una composición celular comparable a la de la población celular in situ. Otra característica de la suspensión celular es que las células del injerto son más viables ya que se recolectan en una solución de nutrientes, a diferencia de los procedimientos de recolección de células de la técnica anterior que usan técnicas en donde las células se cosechan mientras se exponen a potentes enzimas digestivas durante períodos de tiempo excesivos. Cuando las células se exponen a dichas enzimas durante períodos de tiempo excesivos, la viabilidad de la suspensión celular disminuye.

Además, se proporciona un método de tratamiento del paciente que requiere un injerto tisular. Mediante este método, la suspensión celular producida de acuerdo con la presente descripción se aplica a un sitio de injerto. Una suspensión líquida que contiene células puede distribuirse manualmente sobre el sitio de injerto mediante cualquiera de varias técnicas, lo que incluye pulverización, dispersión, pipeteo y pintura.

Preferentemente, la suspensión se pulveriza sobre un sitio de injerto. La suspensión puede pulverizarse mediante cualquier tipo de boquilla que transforma líquido en pequeñas gotas que se transportan por el aire. Esto es objeto de dos restricciones. Primero, no debe someterse las células en solución a fuerzas de cizallamiento o presiones que dañarían o matarían cantidades sustanciales de células. En segundo lugar, no debe requerirse que la suspensión celular se mezcle con un fluido propulsor que sea tóxico o perjudicial para las células o lechos de heridas. Una variedad de boquillas disponibles comúnmente satisface ambas restricciones. Dichas boquillas pueden conectarse de cualquier manera convencional a un reservorio que contiene la suspensión celular.

Alternativamente, la suspensión puede administrarse mediante una pipeta, "goteros" comunes, jeringa y aguja u otros dispositivos similares para colocar pequeñas cantidades de suspensión celular sobre un sitio de injerto.

Después que la suspensión celular se ha aplicado al sitio de injerto del receptor, la herida puede cubrirse con un vendaje para heridas. Preferentemente, el vendaje es Surfsoft™, un vendaje de nailon tejido. Preferentemente, la curación de la herida se monitorea por protocolos estándar para el tratamiento de injertos de piel conocidos por los expertos en la técnica.

Además, se proporciona un aparato para desarrollar una solución de regeneración de tejido, que tiene un medio de calentamiento adecuado para calentar una solución enzimática a una temperatura requerida y que es capaz de mantener esa solución a la temperatura deseada durante una cantidad de tiempo adecuada; y una cavidad de filtro que comprende un medio de filtro capaz de separar congregados celulares grandes de una suspensión celular.

En una forma preferida, el aparato incluye, además, un reservorio capaz de retener una muestra de tejido y una solución de nutrientes, cuya solución es capaz, además, de mantener la viabilidad de las células en la muestra de tejido. Con mayor preferencia, el reservorio tiene un tamaño suficiente para permitir la manipulación de la muestra de tejido, lo que permite la separación del estrato celular de tejido y la recolección de las células del estrato adecuadas para el injerto.

El aparato puede incluir, además, uno o más pocillos de contención de fluidos para el almacenamiento de fluidos tales como la solución de nutrientes. Los pocillos pueden servir alternativamente como receptáculo para un recipiente tal como un vial de plástico o de cristal que contiene la solución de nutrientes. Preferentemente, el pocillo es capaz de contener al menos un volumen de 10 ml. Dichos pocillos permiten la fácil aplicación de fluidos a la muestra de tejido. El almacenamiento de dichos fluidos en estrecha proximidad con su sitio de aplicación proporciona, además, la ventaja de reducir el riesgo de fuga accidental del fluido y proporciona un medio fácil para acceder al fluido para suministrarlo con precisión a la muestra de tejido o la suspensión celular.

Preferentemente, el aparato comprende un primer y un segundo miembro en donde:

(1) el primer miembro incluye:

(a) al menos un medio de calentamiento adecuado para calentar una solución enzimática a una temperatura requerida y que es capaz de mantener esa solución a la temperatura deseada durante una cantidad de tiempo adecuada;

(b) al menos una cavidad de filtro que comprende un medio de filtro capaz de separar congregados celulares grandes de una suspensión celular;

(c) al menos un pocillo de contención de fluidos para el almacenamiento de la solución de nutrientes;

(2) el segundo miembro forma un reservorio capaz de retener una muestra de tejido y una solución de nutrientes en el contenedor de fluidos; y  
 5 en donde el primer miembro proporciona un asiento sobre el cual puede colocarse el segundo miembro durante la manipulación del tejido.

En una forma preferida adicional, el primer miembro proporciona un compartimiento de almacenamiento en el que pueden almacenarse las herramientas y soluciones usadas en el método descrito anteriormente. Cuando se proporciona dicho  
 10 compartimiento en el aparato, el segundo miembro puede proporcionar la tapa o cierre a ese compartimiento. Durante el uso, la tapa, preferentemente, se retira de la parte superior del compartimiento y se invierte. La parte inferior de la tapa forma, preferentemente, el reservorio que permite que el segundo miembro tenga un doble propósito. Puede accederse a las herramientas y soluciones usadas en el método desde el compartimiento. La tapa invertida puede después asentarse de nuevo sobre el compartimiento que  
 15 proporciona el reservorio para el aparato.

El aparato puede fabricarse de metal, plástico o cualquier otro material. Además, el contenedor puede tener cualquier tamaño. Preferentemente, el tamaño del contenedor solo se limita por su uso previsto y la necesidad de esterilización, tal como mediante el uso de irradiación gamma y/u óxido de etileno.

Se apreciará que el medio de calentamiento empleado en el aparato puede constituir simplemente una almohadilla o almohadillas de calentamiento en la parte superior del primer miembro. No obstante, existen problemas concomitantes con dichas disposiciones, la menor de las cuales no es la posibilidad de derrame accidental del contenedor sometido a calentamiento. Por lo tanto, uno o más medios de calentamiento pueden alojarse dentro de una cavidad en el primer  
 25 miembro. Además, se ubica dentro de esa cavidad al menos un contenedor en el que puede colocarse tejido para su exposición a la solución enzimática. Alternativamente, pueden alojarse uno o más medios de calentamiento en la base del aparato. En dicha configuración, el primer miembro contiene al menos una abertura adecuada para recibir un contenedor capaz de contener fluido, cuya abertura proporciona acceso para el contenedor al medio de calentamiento.

Se apreciará que si el aparato se diseña para más de un uso, el medio de calentamiento puede ser capaz de calentarse y enfriarse repetidamente. Alternativamente, cada unidad de calentamiento puede ser capaz de un solo uso, pero pueden proporcionarse múltiples unidades de calentamiento con el aparato para facilitar múltiples eventos de calentamiento.

En una configuración muy preferida del aparato, se ubica un collar de calentamiento dentro de una cavidad en el mismo, lo que forma una cavidad de calentamiento en el primer miembro dentro del cual se ubica un contenedor (por ejemplo, un vial) para la enzima. El contenedor se mantiene en su lugar, preferentemente, mediante al menos un medio de restricción, que rodea convenientemente parte de la porción superior del recipiente lo que impide la liberación accidental del contenedor del aparato. En circunstancias en las que el aparato se destina a un solo uso, el medio de restricción puede formarse como una parte integral del primer miembro, lo que significa que la extracción del contenedor solo puede lograrse  
 40 al romper físicamente el primer miembro.

El medio de calentamiento usado en el aparato se controla, preferentemente, mediante circuitos que permiten la activación del elemento de calentamiento cuando es necesario. Por ejemplo, el medio de calentamiento puede activarse al presionar el botón de inicio ubicado, por ejemplo, en la superficie del primer miembro. Alternativamente, el medio de calentamiento puede activarse al empujar el contenedor hacia abajo con la fuerza suficiente como para activar un interruptor ubicado en la base del aparato. Un experto en la técnica en el campo apreciará que puede usarse una amplia gama de medios electrónicos para activar la unidad de calentamiento proporcionada en el aparato.

Convenientemente, la unidad de calentamiento se une operativamente, además, a un mecanismo temporizador, que se adapta para calentar la solución enzimática durante un período de tiempo predefinido. En circunstancias en las que el aparato se destina a múltiples usos, preferentemente, el temporizador puede configurarse para desactivar el elemento de calentamiento cuando se alcance una cantidad de tiempo particular. En ese momento, puede activarse una alarma para informar al usuario que se ha acabado el tiempo. La alarma puede ser audible o en forma de una pantalla lumínica.

Preferentemente, el medio de calentamiento puede proporcionarse con un control de temperatura ajustable. Cuando se requiere un ajuste de temperatura, dicha variación puede lograrse al adaptar los circuitos de control de calentamiento para incluir o comunicar con un mecanismo de control de temperatura que permita que la temperatura de la unidad de calentamiento varíe constantemente dentro de un intervalo constante, o puede presentar un intervalo de temperaturas seleccionadas a las que el medio de control de calentamiento puede fijarse. Se incluirá beneficiosamente un medio de control de temperatura en el aparato cuando el aparato se va a usar en la recolección y preparación de diferentes tipos de células y/o cuando se usan diferentes enzimas en el método de recolección para el cual el aparato tiene una aplicación  
 60 única.

En una forma alternativa más preferida, el aparato se diseña para un solo uso. En dichos casos, el mecanismo del temporizador es parte del circuito que controla el medio de calentamiento. Una vez que el medio de calentamiento se ha activado, calienta la solución durante un período de tiempo predefinido y después se autodestruye. Los expertos en la

técnica apreciarán que dicho aparato puede equiparse con diversos medios de monitoreo que son capaces de indicar cosas tales como que: la enzima ha alcanzado la temperatura requerida; la cantidad de tiempo durante el cual la enzima ha estado en la solución; y/o la cantidad de tiempo restante antes de que el circuito se autodestruya, etcétera. A manera de ejemplo únicamente, los medios de monitoreo pueden consistir en una serie de LED que se activan cuando se producen ciertos eventos. Preferentemente, el elemento de calentamiento permanece, preferentemente, en modo calentamiento durante un máximo de 45 minutos a 1 hora.

El medio de calentamiento puede alimentarse mediante cualquier medio conocido en la técnica. Preferentemente, el suministro de energía se proporciona por batería/baterías. En una forma, el suministro de energía es una batería o una pluralidad de baterías ubicadas en la base del aparato.

El aparato puede proporcionarse con uno o más medios para facilitar la mezcla de las soluciones usadas, tal como, por ejemplo, una solución enzimática. A este respecto, y solo a manera de ejemplo, el aparato puede incluir un medio para agitar en vórtice la solución; tal como un sistema electromagnético que se adapta para agitar una perla magnética. Cuando el aparato incluye un sistema de mezcla electromagnética, la perla magnética se proporciona, preferentemente, en el contenedor (por ejemplo, el vial) en el que la solución se almacena en el aparato. Alternativamente, la perla magnética puede añadirse a la solución cuando se desea mezclar.

En una forma muy preferida, el medio de mezcla se combina con el medio de calentamiento ya sea como una sola unidad o como unidades separadas para facilitar el calentamiento constante de la solución de manera uniforme. El uso de dicho medio de mezcla evita el posible sobrecalentamiento de la solución más cercana a la unidad de calentamiento mientras la solución se calienta. Dicho sistema proporcionará un calentamiento más constante de la solución. Los medios alternativos para mezclar la solución se conocerán en la técnica e incluyen medios mecánicos, físicos, eléctricos y electromagnéticos, como ejemplo. Si bien puede emplearse cualquier medio de mezcla en el aparato, preferentemente, el medio de mezcla se selecciona ya sea para minimizar la vibración del aparato o se incorpora al aparato de manera que minimice dicha vibración. A este respecto, el medio de mezcla puede alojarse en uno o más amortiguadores de vibraciones o el aparato puede incluir uno o más amortiguadores de vibraciones en su base.

Cuando se incorpora un medio de mezcla al aparato, el medio puede activarse automáticamente tras la activación de la unidad de calentamiento o, alternativamente, puede existir un sistema de activación aparte. Además, la velocidad de la mezcla puede ser fija o variable. Preferentemente, existe un sistema de activación aparte para el medio de mezcla.

La cavidad del filtro incorporada en el aparato puede ser de cualquier tamaño o forma que facilite el filtrado de una suspensión celular. Además, la cavidad puede adaptarse para recibir y sujetar al menos un tubo en el que puede filtrarse la suspensión celular. Preferentemente, la cavidad tiene una base cónica que proporciona un medio fácil para acceder al volumen total de la suspensión celular después que se ha filtrado.

Convenientemente, la tercera cavidad se diseña para alojar un filtro de células de 100  $\mu\text{m}$ . La tercera cavidad puede acomodar un filtro de células de 100  $\mu\text{m}$  conectado a un tubo cónico. Preferentemente, el tubo tiene graduaciones de área/volumen marcadas en el lateral.

El aparato puede incluir, además, un conjunto de herramientas necesarias para la recolección de células. Los expertos en la técnica apreciarán que puede incluirse con el dispositivo cualquier herramienta necesaria para la recolección de células. Preferentemente, el conjunto de herramientas están estériles. Solo como ejemplo, el conjunto de herramientas puede incluir un recipiente de cristal de enzima de separación; una solución estéril para la suspensión de la enzima; una solución de nutrientes estéril; escalpelo; pinzas; jeringuilla; gotero de medicina, filtro celular; apósitos para heridas y/o boquillas de pulverización. Preferentemente, el conjunto de herramientas se almacena en un compartimento formado en el primer miembro del aparato, que se cubre por el segundo miembro cuando no está en uso.

Preferentemente, el dispositivo se usa para recolectar una suspensión de células y para aplicar las células a un sitio receptor de la siguiente manera.

Una alícuota de agua estéril se mezcla con una porción de enzima de separación liofilizada y se coloca en la cavidad de calentamiento. A continuación, se activa el medio de calentamiento que calienta el contenido (es decir, la solución enzimática) del contenedor hasta una temperatura de trabajo de entre 30 y 37 °C, preferentemente, entre 33 y 37 °C y, a manera de ejemplo, de 37 °C en 2 minutos y mantiene la temperatura de trabajo durante al menos 45 minutos. Una vez que se ha alcanzado la temperatura operativa, una muestra de tejido tomada de un sitio donante se coloca en la solución enzimática y se incuba a la temperatura de trabajo. La muestra de tejido se incuba durante entre 5 a 45 minutos. Los expertos en la técnica apreciarán que el tiempo necesario para lograr la separación de las capas de la muestra de tejido depende del grosor y el tamaño de la muestra de tejido y la temperatura de incubación. Una vez que se logra la separación enzimática de las capas de tejido, la muestra de tejido se retira hasta el reservorio y las capas de tejido se separan mediante el uso de instrumento(s) quirúrgico(s).

Después, se extrae una alícuota cuidadosamente medida de la segunda solución del pocillo de contención de fluido por aspiración en una jeringa y después se aplica a las capas. Las células entre las capas de tejido se raspan y se suspenden



al mezclarlas con la solución de nutrientes. A continuación, se recolecta la suspensión celular, preferentemente, mediante el uso de una jeringa y una cánula.

5 La suspensión de células recolectadas se hace pasar a continuación a través de un filtro de células ubicado en la cavidad del filtro y la suspensión de células filtrada se recoge en la cavidad del filtro. El reservorio puede enjuagarse, opcionalmente, con un volumen adicional de la segunda solución y esta suspensión resultante de células también se filtra y se recoge en la cavidad del filtro.

10 La suspensión filtrada de células puede aspirarse después, opcionalmente, en una jeringa y aplicarse al sitio receptor.  
Mejor(es) modo(s)

15 Otras características de la presente descripción se describen más completamente en los siguientes ejemplos no limitantes. No obstante, debe entenderse que esta descripción detallada se incluye únicamente con el propósito de ejemplificar la presente descripción. No debe entenderse de ninguna manera como una restricción a la descripción general como se establece más abajo.

Ejemplo 1:

20 Preparación del sitio receptor

Para optimizar el éxito del injerto de piel, se limpió la herida y se evaluó que tenía la profundidad adecuada. Además, se estableció la hemostasia sanguínea y se comprobó la herida en busca de evidencia de celulitis o infección adyacente. Las técnicas para preparar el área incluyeron disección aguda, dermoabrasión o renovación con láser.

25 Biopsia del sitio donante

30 El sitio donante se eligió para que coincidiera adecuadamente con el sitio receptor. El sitio donante se infiltró con anestesia local y adrenalina debajo de la piel cerca del tejido subcutáneo. Esto permitió que el sitio donante estuviera firme y ayudó a tomar una biopsia fina de grosor parcial. Las dimensiones de la biopsia se determinaron por el tamaño del área superficial del sitio receptor a cubrir.

35 Típicamente, el tamaño de la biopsia tiene una relación de expansión de 1:10 - 1:80. En este caso, se tomó un tamaño de biopsia de 2 cm x 2 cm del sitio donante, lo que proporciona una relación de expansión de 1:60.

Renovación celular mediante el uso de la técnica rápida

40 El tratamiento de la herida se llevó a cabo mediante el uso del aparato de recolección de células de la técnica rápida Re-Cell®, que se explica con más detalle en el Ejemplo 2 más abajo. El aparato contenía todos los instrumentos, soluciones, enzimas y vendajes requeridos para el tratamiento de heridas.

45 El elemento de calentamiento se activó al presionar el "botón de inicio". La solución (agua estéril para inyección) (10 ml) se transfirió desde el vaso de plástico suministrado marcado como Solución A a un vaso de cristal que contenía la enzima de separación (tripsina liofilizada) para obtener una concentración final de tripsina al 0,5 %. A continuación, la solución enzimática se mezcló, se transfirió a un vaso ya ubicado en la cavidad del elemento de calentamiento y se calentó hasta 37 °C.

50 El vaso que contenía la Solución B (medio nutriente) se transfirió desde su vaso suministrado en el pocillo de contención de fluidos.

55 La muestra de tejido obtenida previamente se colocó después en la solución enzimática y se incubó a 37 °C durante entre 10 a 15 minutos. Después de este tiempo, la muestra de tejido se retiró de la solución enzimática con un par de pinzas, se enjuagó al sumergirla en el pocillo de contención de fluidos que contenía la Solución B y se colocó con el lado dérmico hacia abajo y el lado epidérmico hacia arriba en el reservorio.

La solución B se aspiró después del pocillo a una jeringa y se aplicó por goteo desde la jeringa sobre ambas capas de la biopsia.

60 Las capas de la piel se separaron mediante el uso de pinzas. Esto permitió el acceso a la zona de la unión dermis-epidermis de ambas superficies. Las células se rasparon de las superficies para desarrollar una columna de células en el reservorio. Las células se mezclaron después en la Solución B. La columna de células se extrajo entonces en la jeringa mediante una cánula de calibre 19.

65 El filtro suministrado (filtro de células de 100 µm) se montó en la cavidad del filtro y la columna de células en la Solución B se pasó a través del filtro. Después, se usó una pequeña cantidad adicional de Solución B para enjuagar el reservorio (por ejemplo, una placa Petri) y recoger las células restantes, que también se pasaron a través del filtro.

La suspensión resultante de células recogidas en la cavidad cónica se aspiró a una jeringa y se fijó una boquilla a la jeringa para rociar o gotear sobre el área de la herida.

5 La herida se volvió a verificar para asegurar que estaba limpia y libre de restos y que no existía evidencia de contaminación bacteriana. Además, se verificó la herida para determinar si se había logrado la hemostasia. Una vez que el sitio receptor estuvo listo, la suspensión de células se aplicó a la superficie de la herida mediante el uso de la boquilla.

10 La herida se cubrió con Surfsoft™, un vendaje de nailon tejido, que se suministró con el aparato. La curación de la herida se monitoreó mediante el uso de protocolos estándar para el tratamiento de injertos de piel.

## Ejemplo 2

15 La Figura 1 se dirige a un aparato de recolección de células de técnica rápida Re-Cell® 10 para su uso en la producción de una suspensión celular trasplantable de tejido vivo adecuada para injertar en un paciente.

20 Como se ilustra en la Figura 1, el aparato incluye una tapa de cierre 12 que posee un mecanismo de bloqueo 14 adaptado para acoplar de manera liberable una porción de base 16. El mecanismo de bloqueo 14 proporciona un medio para cerrar el aparato 16 cuando no está en uso. Ubicado dentro de la porción de base 16 hay un primer miembro 18 dentro del cual se proporciona una abertura 20 en la que se ubica un vial 22 para la enzima. Adyacente a la abertura se proporciona un interruptor de activación 24 capaz de activar el medio de calentamiento (no mostrado). El primer miembro proporciona, además, un pocillo de contención de fluidos 26 y una cavidad del filtro 28. Como se presenta en esta ilustración, el filtro 29 se muestra ubicado en la cavidad del filtro. Normalmente, el filtro es un elemento opcional incluido como un elemento aparte en el aparato.

25 La abertura 20 en el primer miembro 18 es convenientemente de tal diámetro que permite que el cuello del vial 22 sobresalga a través y por encima del primer miembro 18. La periferia de la abertura 20 se provee con un collar 21 que es ligeramente más pequeño que el diámetro del cuerpo del vial 22. Por lo tanto, cuando está en uso, el vial 22 no puede extraerse del aparato 10, ya que se mantiene en su lugar por el collar 21 ubicado alrededor de la periferia de la abertura 20.

30 Ubicado adyacente a la abertura 20, el pocillo de contención de fluidos 26 y la cavidad del filtro 28 está el segundo miembro 30 que se coloca en un asiento (no mostrado) ubicado dentro de un compartimiento de almacenamiento (no mostrado) dentro del primer miembro 18. Cuando se invierte, el segundo miembro 30 forma un reservorio dentro del cual pueden realizarse manipulaciones de tejido. Para facilitar la separación del segundo miembro 30 del primer miembro 18, se proporciona una muesca 32 en el lado de una porción del segundo miembro 30, que es de tal tamaño que una persona puede levantar el segundo miembro del asiento sobre el que yace en el primer miembro 18.

35 Dentro de la cavidad del filtro 28 se encuentra un filtro 29 (proporcionado por separado con los otros componentes) que tiene una malla en el mismo capaz de separar material celular de más de 100 µm de un sobrenadante celular.

40 La Figura 2 proporciona una vista en perspectiva parcialmente despiezada del aparato 10 en donde el segundo miembro 30 se extrae del primer miembro 18 y se invierte. La inversión del segundo miembro 30 revela las paredes laterales 32 del segundo miembro 30, que forman la barrera de contención de fluidos del depósito y un área de reservorio 34 en la que pueden realizarse las manipulaciones del tejido.

45 La extracción del segundo miembro 30 del primer miembro 18 revela, además, un compartimiento de almacenamiento 36 en el primer miembro 18 en el que pueden almacenarse soluciones y herramientas cuando el aparato 10 no está en uso. Dentro del compartimiento de almacenamiento 36 se encuentra un asiento 38 sobre el cual puede alojarse el segundo miembro 30. El asiento 38 se ubica, preferentemente, alrededor de la periferia del compartimiento de almacenamiento 36 a una profundidad debajo de la superficie del primer miembro 18 que es equivalente a la altura de las paredes laterales 32 del segundo miembro 30.

50 La Figura 3a proporciona una vista en perspectiva del primer miembro 18 que muestra el compartimiento de almacenamiento 36, el interruptor de activación del calentador 24, la abertura 20, el pocillo de contención de fluidos 26 y la cavidad del filtro 28 formada dentro del primer miembro. La Figura 3b proporciona una vista desde atrás del primer miembro 18 que muestra la cavidad del filtro 28, el pocillo de contención de fluidos 26, el interruptor de activación del calentador 24, el collar de apertura 21 y la pared posterior del compartimiento de almacenamiento 36. Como se ve en esta figura, la cavidad del filtro tiene una base cónica lo que proporciona de esta manera un medio para un fácil acceso a la suspensión celular que se filtra en él. Ubicado adyacente al pocillo de contención de fluidos y en el lado opuesto del pocillo de contención del filtro se proporciona, además, un miembro de posicionamiento de batería 40 que sobresale hacia la base 16 del aparato (no mostrado) y proporciona un medio para mantener las baterías en su lugar, que se requieren para activar el medio de calentamiento.

55 La Figura 4 proporciona una vista en perspectiva de la base 16 del aparato 10 que muestra el vial 22 ubicado dentro de un campo de contención 42. Entre el campo de contención 42 y el vial 22 se ubica un(unos) collar(es) de calentamiento

44, que rodea(n) el cuerpo del vial. Adyacente al campo de contención existe una placa de circuitos 46, que se mantiene en su posición mediante los medios de contención de placa de circuitos 48, 50 y 52. Dicha placa de circuitos 46 está en comunicaciones eléctricas con el(los) collar(es) de calentamiento 44 mediante cables 54. La placa de circuitos está en comunicación eléctrica, además, mediante cables 58 con el interruptor de activación del calentador (no mostrado).

5 Adyacente a la placa de circuito 46 se proporciona un medio de contención de baterías 58, que contiene 4 baterías AA en posición de inmovilización (no mostrado). Las baterías están en comunicación eléctrica con la placa de circuitos 46 mediante cables 60. Cuando el primer miembro 18 se coloca en la base 16, las baterías se mantienen en su lugar mediante los medios de contención de baterías 58, el medio de posicionamiento de baterías 40 y la base de cada uno de los pocillos de contención de fluidos 26 y la cavidad del filtro 28. Preferentemente, la base cónica de la cavidad del filtro 28 también sobresale entre las baterías, lo que proporciona un medio adicional para asegurar las baterías en posición de inmovilización.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un aparato para desarrollar de forma perioperatoria a un paciente una suspensión celular de una muestra de tejido de piel, y para aplicar inmediatamente la suspensión celular a un sitio de injerto del paciente, que comprende:
  - (a) un conjunto de herramientas requeridas para la recolección de células;
  - (b) un vaso de enzima y una solución estéril para la suspensión de la enzima;
  - (c) un medio de calentamiento adecuado para calentar la solución enzimática a la temperatura requerida y que es capaz de mantener esa solución a la temperatura deseada durante una cantidad de tiempo adecuada, en donde la solución enzimática precalentada se usa para incubar una muestra de tejido de piel y contiene una cantidad de enzima suficiente para disociar el estrato celular en la muestra de tejido de piel;
  - (d) una cavidad del filtro que comprende un medio de filtro de un tamaño de filtro entre 50  $\mu\text{m}$  y 200  $\mu\text{m}$ , para retirar los conglomerados celulares de las células recolectadas de la muestra de tejido de piel, para formar la suspensión celular que es adecuada para la dispersión inmediata al sitio de injerto;
  - (e) un pocillo de contención de fluidos para el almacenamiento de solución de nutrientes; y
  - (f) un reservorio para retener la muestra de tejido de piel y la solución de nutrientes.
2. El aparato de conformidad con la reivindicación 1, en donde el aparato comprende, además, un primer miembro y un segundo miembro, en donde el primer miembro incluye (c) el medio de calentamiento, (d) la cavidad del filtro, y (e) el pocillo de contención de fluidos; en donde el segundo miembro forma el reservorio.
3. El aparato de conformidad con la reivindicación 2, donde el medio de calentamiento es una almohadilla o almohadillas de calentamiento en la parte superior del primer miembro.
4. El aparato de conformidad con la reivindicación 2 o 3, en donde el medio de calentamiento se aloja dentro de una cavidad en el primer miembro.
5. El aparato de conformidad con la reivindicación 4, en donde la cavidad comprende además un contenedor ubicado en el mismo en el que la muestra de tejido de piel puede colocarse para su exposición a la solución enzimática.
6. El aparato de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la cavidad del filtro se adapta para alojar y sujetar al menos un tubo en el que puede filtrarse la suspensión celular.
7. El aparato de conformidad con la reivindicación 2, en donde el pocillo de contención de fluidos sirve como receptáculo para un contenedor que contiene la solución de nutrientes.
8. El aparato de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde el primer miembro proporciona un asiento sobre el cual puede colocarse el segundo miembro durante la manipulación de la muestra de tejido de piel.
9. El aparato de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en donde el primer miembro proporciona un compartimiento de almacenamiento en el que pueden almacenarse las herramientas y soluciones, y en donde, preferentemente, el segundo miembro proporciona una tapa al compartimiento de almacenamiento.
10. El aparato de conformidad con la reivindicación 9, en donde la parte inferior de la tapa forma el reservorio.
11. El aparato de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el conjunto de herramientas para la recolección de células incluye un vaso de cristal de la enzima, una solución estéril para la suspensión de la enzima, una solución de nutrientes estéril, escalpelo, pinzas, jeringa, gotero de medicina, filtro celular y/o vendajes para heridas.
12. El aparato de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el conjunto de herramientas para aplicar la suspensión celular al sitio de injerto se selecciona de boquilla de pulverización, pipeta, goteros, jeringa y aguja.
13. El aparato de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el medio de calentamiento calienta la solución enzimática a una temperatura de trabajo de entre 30 y 37  $^{\circ}\text{C}$ , preferentemente, entre 33 y 37  $^{\circ}\text{C}$ .
14. El aparato de conformidad con la reivindicación 13, en donde el medio de calentamiento calienta la solución enzimática hasta 37  $^{\circ}\text{C}$  en 2 minutos y mantiene la temperatura de trabajo durante al menos 45 minutos.

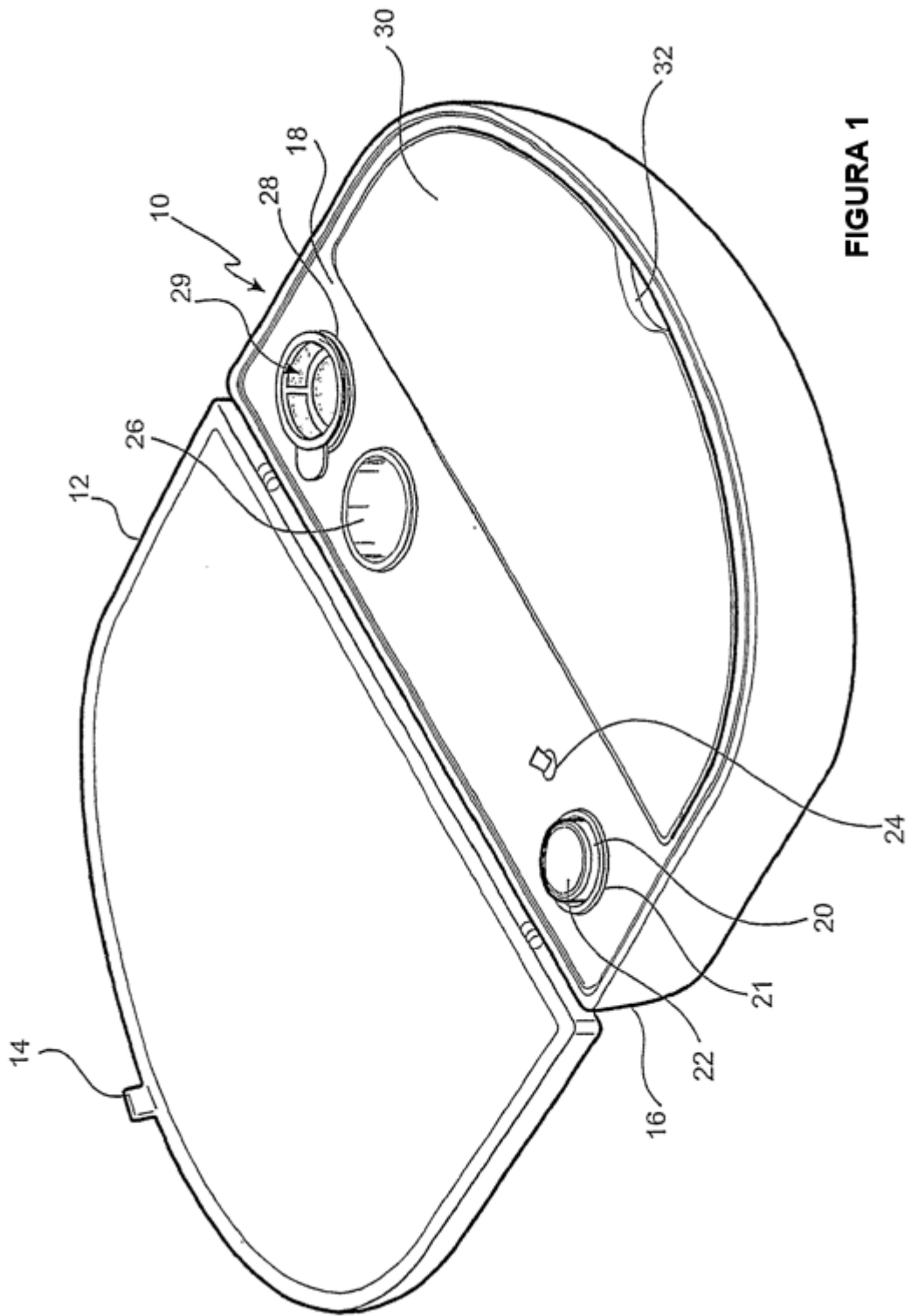


FIGURA 1

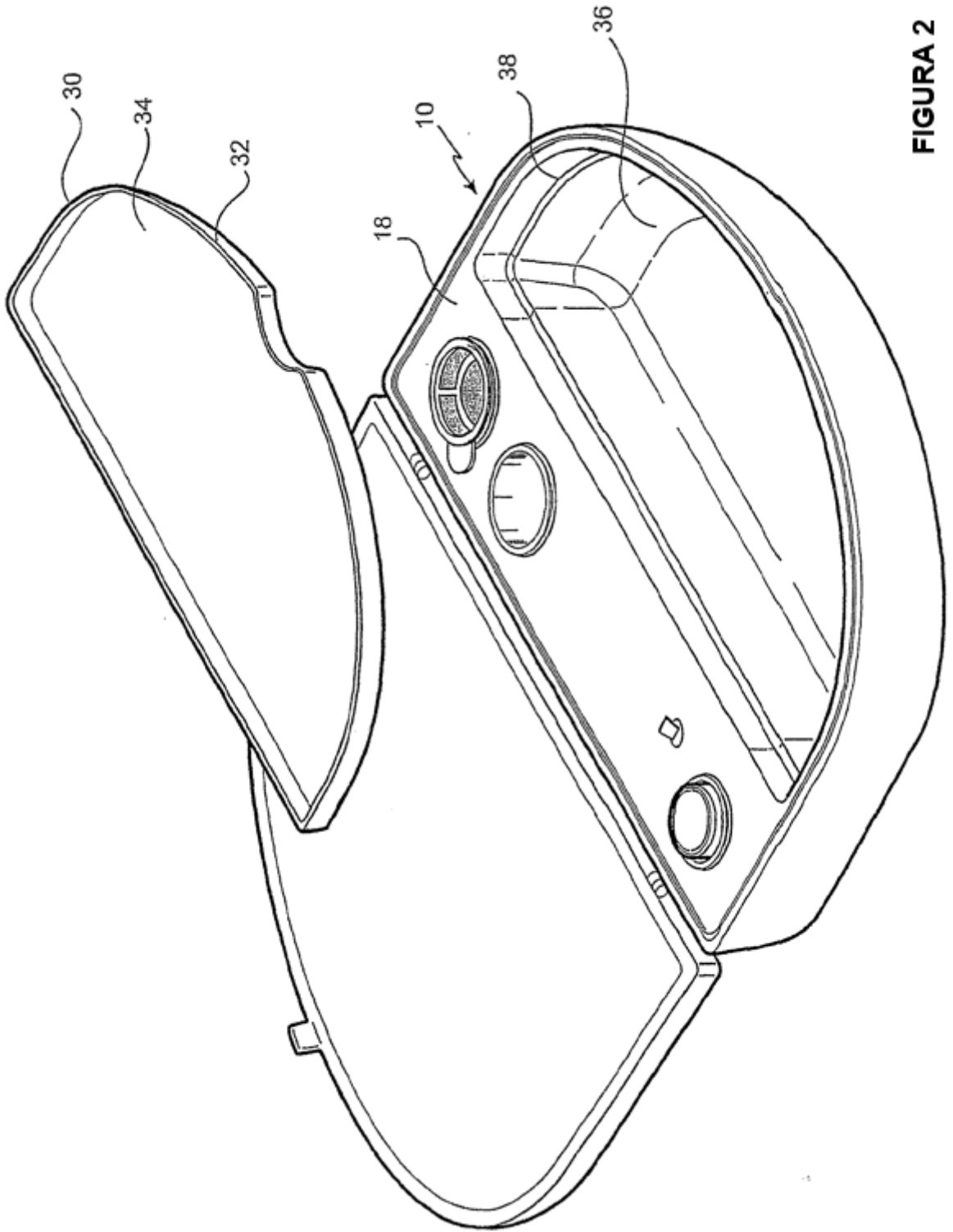
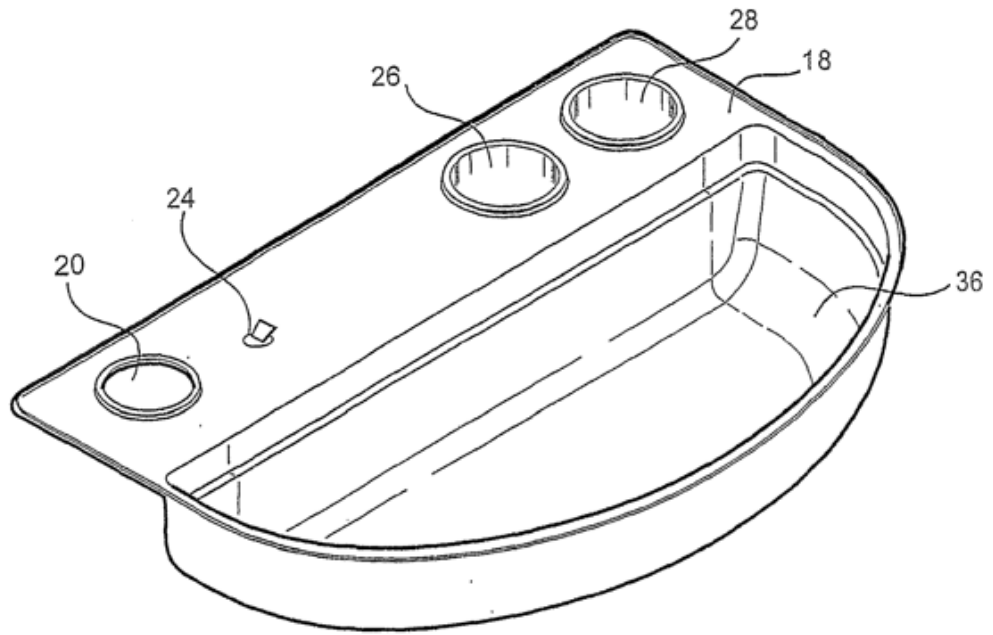
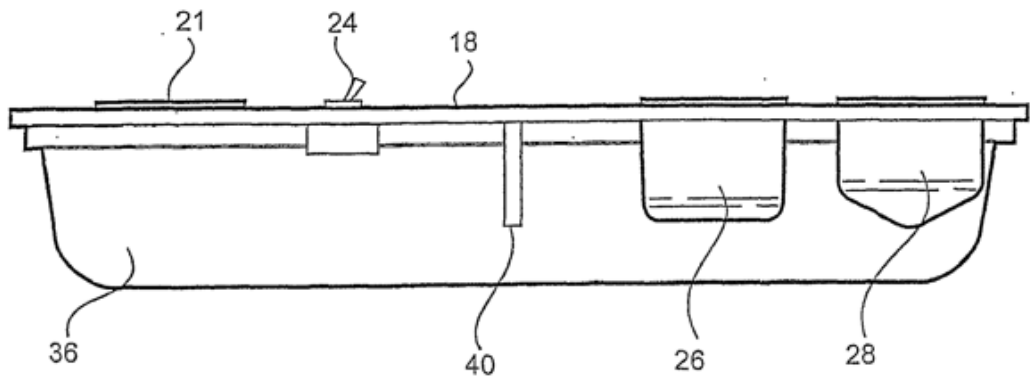


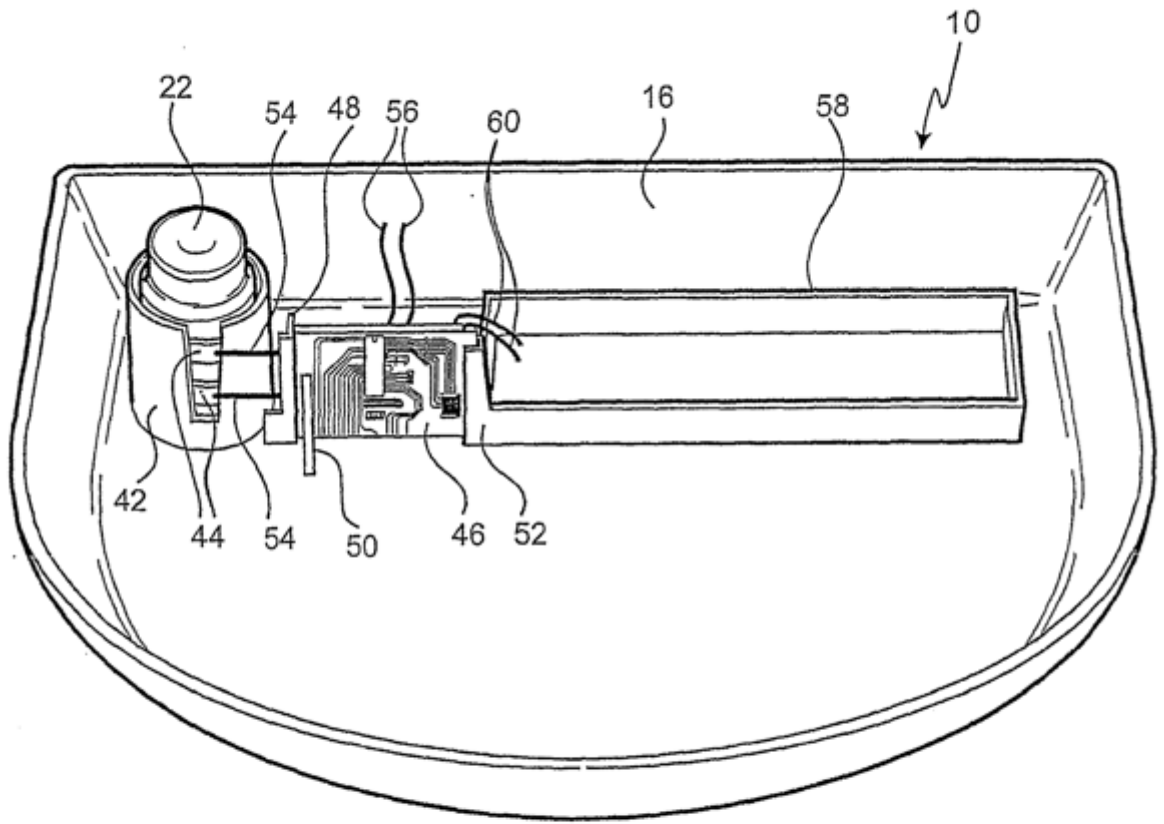
FIGURA 2



**FIGURA 3a**



**FIGURA 3b**



**FIGURA 4**