

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 180**

51 Int. Cl.:

C12N 13/00 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2010 E 10009025 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2308969**

54 Título: **Procedimiento de aceleración de la proliferación celular**

30 Prioridad:

29.09.2009 DE 102009043666

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.01.2016

73 Titular/es:

**KARLSRUHER INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE
(100.0%)
Kaiserstrasse 12
76131 Karlsruhe, DE**

72 Inventor/es:

**FREY, WOLFGANG, DR.;
STRÄSSNER, RALF;
EING, CHRISTIAN, DR.;
BERGHÖFER, THOMAS;
GUSBETH, CHRISTIAN, DR.;
FLICKINGER, BIANCA;
WÜSTNER, RÜDIGER y
PACHER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 557 180 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de aceleración de la proliferación celular

El presente invento se refiere a un procedimiento para acelerar la proliferación celular, plantas, hongos o tejidos con la ayuda de un campo eléctrico pulsante con una duración en el margen de nanosegundos.

5 Tanto las células procarióticas, como también las eucarióticas están rodeadas por una membrana de plasma cerrada, que limita el interior de la célula con el entorno. La membrana de plasma se compone principalmente de una capa doble de lípidos eléctricamente aislante y de proteínas alojadas en ella, que hacen posible el intercambio de moléculas o de iones entre el interior de la célula y el entorno. La membrana de la célula puede ser cargada por medio de la aplicación de una intensidad de campo eléctrico exterior

10 Así por ejemplo, los campos eléctricos pulsantes influyen en las células biológicas suspendidas en un líquido conductor, de tal modo, que los impulsos eléctricos dan lugar a la formación de poros en la membrana de plasma. La carga de las membranas necesaria para poder observar la formación de poros en la membrana se halla entre 0,5 a 1 V. En este caso de habla de electroporación. Para la electroporación convencional se utilizan impulsos eléctricos con una tensión de 0,1 a 1 kV y la duración del impulso es con más de 100 μ s mayor que el tiempo, que necesita una
15 membrana de plasma para alcanzar la carga de 0,5 a 1 V.

El tiempo necesario para cargar una membrana de plasma depende de diferentes parámetros eléctricos de la célula y del líquido en el que se suspendió la célula. Para células esféricas con una superficie dieléctrica ideal es válida la siguiente relación para la constante de tiempo.

$$\tau_G = (\rho_c + \rho_a/2)c_m D/2$$

20 en la que c_m es la capacidad de la membrana de plasma por unidad de superficie, ρ_c es la resistencia específica del citoplasma, ρ_a es la resistencia específica del medio de suspensión y D es el diámetro de la célula. Los valores empíricos de la resistencia del citoplasma son aproximadamente $\rho_c = 0,5$ a 1 S/m y la capacidad de una membrana de plasma es del orden de $c_m = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Los valores empíricos de la constante de tiempo son $\tau_c = 100$ ns. La constante de tiempo es válida como valor del tiempo durante el que el interior de la célula es expuesto al campo
25 eléctrico pulsante aplicado. Con un duración mayor del impulso tiene lugar la carga de la propia membrana de la célula y el campo eléctrico no pasa al interior de la célula.

Si la célula es expuesta a campos eléctricos externos con amplitudes de campo grandes y si la duración del impulso se ajusta manifiestamente menor que el tiempo necesario para la carga de la membrana, puede penetrar el campo eléctrico en el interior de la célula. Esta corriente de desplazamiento puede cargar membranas intracelulares e influir
30 en las orgánulos de la célula.

Para garantizar el paso del campo eléctrico pulsante al interior de la célula, respectivamente pasar a través de la célula es, además, necesario, que la velocidad de crecimiento del pulso eléctrico sea rápida. Es decir, que la tensión entre los electrodos tiene alcanzar su máximo en el tiempo más pequeño posible para que no se cargue la membrana del plasma y que las líneas equipotenciales pasen a través de la célula.

35 Akyama et al. (S. Tsukamoto, T. Maeda, M. Ikeda y H. Akiyama, "Application of pulsed power to mushroom culturing" 14th IEEE Intern. Pulsed Power Conf., Vol. 2, páginas 1116-1119, 2003) informan de un efecto según el que la formación de esporocarpos se produce en los basidiomicetos de una manera más intensa, después de que un tronco de árbol de 1,2 m de longitud fuera inoculado con hongos Shiitake fuera tratado con una tensión eléctrica de 140 kV y con impulsos con una duración de 200 ns. También Takake et al. (K. Takaki, K. Kanesawa, N. Yamazaki, S. Mukaigawa, T. Fujiwara, K. Takahashi, K. Yamasita y K. Nagane, "Application of IES pulsed power generator for mushroom cultivation" 16th IEEE Intgern. Pulsed Power Conf., Vol 2. páginas 1253-1256, 2007) llegan a resultados comparables con el hongo Nameko. Cuando un tronco de árbol con una longitud de 0,9 m inoculado con él se trató con una tensión eléctrica de 120 kV y una duración del impulso de 100 ns se pudo observar una formación 1,5 veces mayor de cuerpos fructíferos. Estos estudios se basan en la observación fenomenológica de que en los puntos en
40 los que tuvo lugar el impacto de un rayo se podía observar una mayor formación de cuerpos fructíferos. Se parte del supuesto de que este fenómeno se debe a la formación de puntos de rotura o de fisuras en las hifas de los hongos, ya que de una manera general los cuerpos fructíferos de basidiomicetos proceden de estas fisuras de las hifas. No se describe aquí un efecto favorecedor del campo eléctrico pulsante en las hifas o micelios de hongos.

Se publicaron informes en parte contradictorios en relación con los efectos estimulantes del crecimiento de campos eléctricos estáticos o de campos alternos lentos (50/60 Hz) en los gérmenes de plantas. por ejemplo se informó de que en el caso de los gérmenes de soja había aumentado en el 12 % la longitud media de los planteles en un campo alterno de 50 Hz con una intensidad de campo relativamente baja de 36 V/cm, mientras que con un campo estático de la misma intensidad no se pudo observar efecto alguno (E. Constanzo, "The influence of an electric field on the growth of soy seedlings", J. Electrostatics, Vol. 66, páginas 417-420, 2008). Por el contrario, para la cebada se pudo
45 consignar un crecimiento ligeramente mayor después de un tratamiento durante cinco años en un campo electrostático de 0,5 kV/cm (C. R. Bachman y M. Reichmanis, "Some effects of high electrical fields on barley growth", Intern. J. Biometeorology, Vol. 17, páginas 253-262, 1973). Los resultados de estos estudios no permiten

conclusiones generales de si, respectivamente en qué medida los campos eléctricos influyen en el crecimiento de células, plantas, hongos o tejidos, ya que los resultados no son significativos (aumento del crecimiento del 10 % al 20 %) y en parte son contradictorios. Además, los tratamientos favorecedores del crecimiento en campos eléctricos no tienen sentido económico con una aportación de energía tan grande.

5 La influencia de los campos eléctricos pulsantes en el margen de nanosegundos en la proliferación celular, plantas, hongos o tejidos no fue estudiada hasta ahora. En especial no se describen observaciones de la aceleración de la proliferación de las células con pulsos de intensidad de campo eléctrico con tiempos muy pequeños de crecimiento de los impulsos.

10 El objeto del invento es, partiendo de aquí, proponer un procedimiento para la aceleración de la proliferación celular, plantas, hongos o tejidos por medio de un campo eléctrico pulsante, que, además, pueda ser aplicado de una manera lo más polifacética posible.

El presente invento soluciona el problema con el procedimiento reivindicado en la reivindicación 1. Las formas de ejecución preferidas del invento se describen en las reivindicaciones subordinadas.

15 El presente invento se basa en el hecho de que el material biológico de las células, monocelular o pluricelular, es suspendido en un líquido conductor y es expuesto a un campo eléctrico pulsante de pequeña duración. El tiempo en el que tiene lugar el aumento del pulso eléctrico de intensidad de campo hasta alcanzar del 10 % al 90 % de la amplitud de la tensión se halla entre 0,1 ns y 100 ns. El tiempo de aumento de la tensión se halla de manera preferente entre 0,1 ns y 20 ns. En el procedimiento también se puede utilizar una serie de varios impulsos eléctricos.

20 El concepto de proliferación de las células abarca en el marco del presente invento tanto el crecimiento de las células, es decir el aumento de tamaño y de volumen de determinadas células, como también la división celular.

25 El concepto de material biológico de las células abarca en relación con el presente invento tanto las células eucarióticas, como también las células procarióticas. Estas pueden ser para el procedimiento según el invento seres vivos monocelulares o en el caso de las eucariotas también seres vivos pluricelulares. Ejemplo de material unicelular son las bacterias, las levaduras o las microalgas. Las células madre humanas quedan excluidas de este procedimiento. El material pluricelular comprende plantas y hongos, respectivamente sus esporas, micelios, semillas o gérmenes. El invento abarca en especial los gérmenes de plantas. Con preferencia se utilizan, además, esporas de hongos. También existe la posibilidad de utilizar tejidos, que representen una acumulación de células, como por ejemplo meristemas en el caso de las plantas así como tejido epitelial o tejido conjuntivo en el caso de seres humanos y animales.

30 En el procedimiento según el invento se suspenden las células en una solución conductora antes del tratamiento con un campo eléctrico pulsante. La conductividad eléctrica es en una ejecución preferida de 0,5 mS/cm a 50 mS/cm, con especial preferencia de 1 mS/cm hasta 10 mS/cm, en especial 4 mS/cm.

35 La duración del tratamiento en el campo eléctrico pulsante es de 5 ns a 5000 ns, con especial preferencia es el margen entre 10 ns y 100 ns. La duración del impulso abarca de manera general el tiempo durante el que está aplicada la tensión final a los electrodos. La duración del pulso eléctrico de intensidad de campo influye en la eficacia del procedimiento según el invento. Duraciones pequeñas de los impulsos influyen positivamente en la proliferación de las células. Dependiendo del material celular presente también puede ser inhibido el crecimiento con impulsos demasiado largos.

40 La cantidad de los pulsos de intensidad de campo eléctrico aplicados por ciclo de tratamiento ejerce una influencia en la eficacia del procedimiento según el invento. Cuanto mayor sea la cantidad de impulsos tanto mayor es la energía total cedida. Dependiendo del material de la célula, de la conductividad de la suspensión y de la duración del impulso se puede optimizar la cantidad de los pulsos de intensidad de campo eléctrico. La cantidad de impulsos eléctricos por tratamiento se halla entre 1 y 100.

45 La intensidad de campo del pulso eléctrico de intensidad de campo se halla entre 0,5 kV/cm y 50 kV/cm.

50 De la relación entre la duración del impulso, la cantidad de impulsos así como la intensidad de campo aplicada se obtiene la energía eléctrica total cedida por ciclo de tratamiento a las células. En el marco de los intervalos indicados se pueden optimizar los protocolos de los ensayos, debiendo dar preferencia, desde el punto de vista económico, a la aplicación mínima posible de energía con una proliferación máxima de las células. Con preferencia se utilizan energías de tratamiento por cada tratamiento de 10 J/kg (suspensión de células) a 10 kJ/kg (suspensión de células).

55 Se obtiene una ejecución preferida con la utilización de cultivos de células, que se incuban en medios líquidos por medio de los llamados fermentadores. Esto se refiere en especial a las microalgas, las bacterias o las levaduras, que se utilizan para la producción de principios activos, productos alimenticios o para la producción de soportes de energía. Estas células, que ya se hallan en suspensión, pueden ser impulsadas (bombeadas) durante su cultivo por medio de una disposición de electrodos apropiada. El técnico conoce diferentes disposiciones de electrodos y formas a través del estado de la técnica. Con la ayuda de los electrodos se aplican de manera repetida impulsos

eléctricos a la suspensión de células. Con ello se posible, que el tratamiento de las células en el campo eléctrico tenga lugar de manera continua. Dependiendo del volumen del fermentador, de la velocidad de circulación y de la densidad de células se puede adaptar la frecuencia de los impulsos, de manera, que el material celular, que se halla en el fermentador reciba una cantidad optimizada de energía.

- 5 El invento se describirá en lo que sigue con ejemplos de ejecución y con las figuras siguientes.

Figura 1. Equipo esquemático de ensayo de un generador de impulsos de cable.

Figura 2. Representación gráfica de la superficie 5 media de la hoja gérmenes de *Arabidopsis thaliana* cinco días después del tratamiento con un campo eléctrico pulsante con diferentes parámetros.

- 10 Figura 3. Imágenes representativas de placas con gérmenes de *Arabidopsis thaliana* sobre agar MS siete días después del tratamiento con diferentes parámetros de los impulsos.

Figura 4. Imágenes de micelios de *Hipsizygyus ulmarius* en diferentes días después del tratamiento de las esporas en el campo eléctrico pulsante.

Figura 5. Representación gráfica de la superficie del micelio del *Hipsizygyus ulmarius* como función del tiempo de incubación.

15 Ejemplo 1

- La semilla de *Arabidopsis thalia* se esterilizó superficialmente para eliminar eventuales contaminaciones. Para ello se trató la semilla durante 15 minutos en una solución de hipoclorito sódico. A continuación se concentró la semilla por centrifugado (20 segundos, 600 g) y el residuo se eliminó en condiciones exentas de gérmenes. La semilla se lavó cinco veces con agua esterilizada y se almacenó después durante dos días en una solución esterilizada de agar (1 % w/v) a 4 °C. La semilla se sembró después en cápsulas de Petri de 90 mm con medio sólido y se cultivó durante siete días en una cámara de incubación en condiciones controladas.

- 20 Inmediatamente antes del tratamiento con el campo eléctrico pulsante se separaron cuidadosamente diez gérmenes de la placa de agar, se suspendieron nuevamente en 4 mS/cm de una solución tampón (40 mM KCl, pH 6,5 ajustada con TRIS/MES) de tratamiento y se introdujeron en una cubeta de electroporación. Cada cubeta se llenó directamente antes del tratamiento con impulsos y se recubrió con aceite de parafina purificado y esterilizado. Esta medida impide descargas en la superficie en el caso de intensidades de campo eléctrico altas. Después del tratamiento con el campo eléctrico pulsante se eliminó el aceite de parafina con una pipeta y los gérmenes se extrajeron de la cubeta por lavado, se extendieron cuidadosamente sobre una placa de agar nueva y se cultivaron a continuación durante once días en una cámara climatizada. Con cada bloque de parámetros se realizaron tres tratamientos con diez gérmenes cada vez. Además, como control se realizaron cinco tratamientos ficticios con el mismo procedimiento, pero sin la aplicación de un campo eléctrico pulsante.

Para todos los ensayos se utilizó el mismo tipo de cubetas de electroporación con una separación específica de 4 mm de los electrodos y con un volumen de llenado de 800 μ l.

Generador de impulsos de cable

- 35 Los impulsos rectangulares con amplitudes de tensión de 2 kV, 4 kV, 8 kV y 20 kV y con intensidades de campo correspondientes de 5 kV/cm, 10 kV/cm, 20 kV/cm y 50 kV/cm se generaron con la ayuda de un generador de impulsos de cable, véase la figura 1. Un cable 1 coaxial de 50 Ohm comercial se cargó a través de una resistencia $R_p = 100$ MOhm de desacoplamiento hasta 40 kV y con la ayuda de un descargador 2 aislada con SF₆ a través del cable 3 de salida con el recipiente 4 de ensayo (cubeta): La longitud de los impulsos se ajustó por medio de la longitud del cable 1 formador de impulsos. Las longitudes de los cables fueron en los presentes experimentos 1 m, 2,5 m y 10 m, lo que equivale a longitudes de 10 ns, 25 ns y 100 ns de los impulsos. La longitud del cable 3 de salida del generador fue 1,2 m. El generador de impulsos de cable se cargó a través de una fuente de alimentación de alta tensión de 65 kV/8 mA. La curva en función del tiempo de la tensión de salida se registró con un osciloscopio de 500 MHz. Para incrementar el ancho de banda utilizable de la punta de prueba se retiró la carcasa de plástico de la cabeza de explotación, se unió de manera maciza el casquillo metálico de la punta de prueba con el punto de masa central y se conectó una resistencia de atenuación de 50 Ohm entre el punto de medición de la tensión y la punta de alta tensión de la punta de prueba. Para el calibrado de la punta de prueba se utilizó un generador de impulsos rectangulares con un tiempo $t_R = 0,7$ ns de crecimiento del impulso. El tiempo de crecimiento de la totalidad del sistema de registro de datos, es decir de la punta de prueba unida con el osciloscopio digital, fue inferior a $t_R = 2$ ns.
- 50 Para minimizar la impedancia de los interruptores, que influye principalmente en el tiempo de crecimiento del impulso, se hizo funcionar el espinterómetro 2 en un margen de presiones entre 0,8 MPa y 1,0 MPa. El ajuste aproximado del tiempo de ruptura del descargador 2 se realizó por medio de la variación de la separación entre los electrodos del descargador en un margen de 0,1 mm a 1,0 mm. El tiempo de crecimiento del impulso del 10 % al 90 % de la tensión del generador de impulsos de cable fue de $t_R = 2,5$ ns. El descargador 2 trabajó en el modo de autodescarga.

ruptura. La desviación absoluta de la amplitud de la tensión de un impulso con relación al valor RMS fue inferior al 3 %. La separación en el tiempo durante un experimento entre dos impulsos fue de 5s. Con cada intensidad de campo se utilizaron 100 impulsos con una duración de 10 ns, 40 impulsos con una duración de 25 ns y 10 impulsos con una duración de 100 ns como bloque fundamental de parámetros, véase la tabla 1. La energía específica suministrada al recipiente de tratamiento, resultante de la energía aplicada por masa tratada, se calculó por medio de $W = N \cdot 0,5 \cdot C \cdot V_c^2 / 0,8 \cdot 10^3$ kg, siendo N la cantidad de impulsos, C la capacidad del cable 1 formador de los impulsos (107 pF/m) y V_c la tensión de carga del cable 1 formador de los impulsos. La temperatura y la conductividad de la solución tampón se ajustó de tal modo, que resultara una carga adaptada al generador de impulsos de cable. Durante los experimentos no se pudieron observar reflexiones causadas por el recipiente 4 de tratamiento.

Las imágenes de los gérmenes se registraron con una cámara digital. La determinación de la superficie de la hoja se realizó con el programa ImageJ. Los valores indicados para la superficie de la hoja son valores medios de la totalidad de la superficie de la hoja de tres placas de agar, cada una con 10 gérmenes.

En la figura 3A-H se pueden ver las imágenes representativas de *Arabidopsis thaliana*, que se trataron con el método descrito en el ejemplo 1 con pulsos de intensidad de campo eléctrico. Ya con una aportación pequeña de energía, como en las figuras 3 A,B, se representan cultivos de control, que no se sometieron a un tratamiento con impulsos de intensidad de campo eléctricos. Los cultivos representados en las figuras 3 C-H se trataron con los parámetros de la tabla 1:

Tabla 1:

Figura	3C	3D	3E	3F	3G	3H
Intensidad de campo (kV/cm)	5	5	10	20	50	50
Duración del impulso (ns)	10	100	25	25	10	100
Cantidad de impulsos	100	10	40	40	100	10
Energía de tratamiento (J/kg)	100	100	400	1600	10000	10000

En las figuras 3C y D se observa un desarrollo manifiestamente mayor de la hoja en comparación con los cultivos A y B de control, mientras que una mayor aportación de energía según los parámetros de las figuras 3 E-G no influyen de manera significativa en el crecimiento de las plantas. En la figura 3H se puede ver, que una aportación demasiado grande de energía da lugar a daños irreversibles en la planta.

El desarrollo de los gérmenes de la *Arabidopsis thaliana* tratados según el ejemplo 1 con diferentes tensiones, duración de los impulsos y cantidades de impulsos se representa gráficamente en la figura 2. Como valor de referencia de la proliferación celular se eligió aquí la superficie 5 de hoja. En comparación con las plantas no tratadas puede alcanzar una planta tratada en el impulso de intensidad de campo una formación hasta 2,5 veces mayor de la superficie 5 de la hoja.

Ejemplo 2

El dispositivo descrito en el ejemplo 1 se utilizó para el tratamiento de esporas del hongo *Hypsizygus ulmaris* en un campo eléctrico pulsante. La forma de proceder fue análoga al procedimiento descrito en el ejemplo 1 y también fue idéntico el generador de impulsos de cable. Para garantizar una carga adaptada durante el tratamiento de la solución de esporas se ajustó esta con 1 M de solución de KCl a una conductividad de 4 mS/cm. Para el tratamiento con el campo eléctrico pulsante se vertieron 800 µl de esta solución de esporas en una cubeta de electroporación con una separación de 4 mm entre electrodos y se cubrieron con 100 µl de agua esterilizada desionizada, para evitar descargas en la superficie con intensidades de campo grandes. Se utilizaron los parámetros de impulso recogidos en la tabla 2.

Tabla 2

Intensidad de campo (kV/cm)	5	10	20	20	50
Duración del impulso (ns)	100	25	25	100	25
Cantidad de impulsos	10	30	20	10	40
Energía del tratamiento (mJ/ml)	100	300	800	1600	10000

Después del tratamiento con los impulsos se extrajeron 100 µl de la solución de esporas tratada y se utilizaron para la inoculación en una placa de agar. Las placas de agar poseían un diámetro de 145 mm y contenían aproximadamente 100 ml de agar de extracto de malta antibiótico.

Con cada bloque de parámetros se realizaron tres tratamientos independientes. Adicionalmente se realizaron también tres tratamientos ficticios en los que las soluciones de esporas siguieron el mismo proceso, pero sin que se sometieran a un tratamiento con los campos eléctricos pulsantes.

5 Después de la inoculación se incubaron las placas de agar en cajas de incubación atemperadas a 25 °C en la oscuridad. De cada placa de agar se tomó diariamente una imagen y la superficie cubierta con micelios se evaluó con la ayuda del programa ImageJ.

10 En la figura 4 se ven las imágenes de los micelios de los hongos después de diferentes días de incubación de las esporas. La columna derecha son cultivos de micelios, que se trataron en el campo eléctrico pulsante con una intensidad de campo de 5 kV/cm, una duración de 100 ns de los impulsos y una cantidad de 10 impulsos. La columna izquierda es en comparación con ello el cultivo de control no tratado. De las imágenes se desprende, que los micelios de los hongos se desarrollaron después del tratamiento en el campo eléctrico pulsante de una manera significativamente más rápida que en el cultivo de control no tratado, lo que se puede comprobar con la mayor superficie de micelios. Así por ejemplo, el cultivo de micelios tratado cubre después de seis días una superficie mayor en el factor 2,75 que el cultivo no tratado.

15 En la figura 5 se representa gráficamente el desarrollo de las esporas tratadas diferentemente durante un tiempo de 5 a 8 días después del tratamiento en el campo eléctrico pulsante. Las aportaciones de energía utilizadas en cada caso se indican en el gráfico. Aquí se puede observar, que, en primer lugar, la estimulación de la proliferación depende de la energía eléctrica aplicada y, en segundo lugar, que una aportación pequeña de energía es suficiente para alcanzar una proliferación significativamente acelerada del micelio de los hongos. La proliferación acelerada máxima observada se consigna ya con 100 mJ/ml.

20 Por lo tanto, en el caso del procedimiento según el invento se trata de un procedimiento económicamente razonable, ya que con una aportación relativamente pequeña de energía en forma de pulsos de intensidad de campo eléctrico se puede obtener un rendimiento manifiestamente mayor del material celular. En especial en los cultivos de células en fermentadores, por ejemplo en la producción de insulina, los tiempos de cultivo más pequeños conllevan ahorros considerables. La proliferación acelerada de células es ventajosa en el caso de cultivos de tejidos, cuando, por ejemplo, los pacientes tienen una necesidad lo más continua posible de tejidos propios cultivados in vitro, por ejemplo tejido cutáneo para quemaduras de gran superficie de la piel. Es evidente, que un cultivo de tejido, que crece con rapidez in vitro, puede ser trasplantado antes con una morbilidad esencialmente reducida de los pacientes.

25 Dependiendo de la clase del cultivo (por ejemplo cultivos sobre un medio sólido o líquido), de la clase de las células cultivadas (unicelulares, pluricelulares, tejidos, semillas, esporas) así como de la clase de los recipientes de cultivo se puede adaptar correspondientemente la forma de los electrodos. El técnico conoce a través del estado de la técnica una gran cantidad de clases de electrodos.

Lista de símbolos de referencia

- 35 1 Cable formador de los impulsos
 2 Descargador
 3 Cable de salida
 4 Recipiente de ensayo
 5 Superficie de la hoja (mm²)
 40 6 Días después del tratamiento
 7 Superficie media de los micelios (mm²)

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para acelerar la proliferación celular de material celular biológico, que comprende las siguientes etapas de procedimiento:
- 5 a. provisión de un material celular y suspensión del material celular en un líquido eléctricamente conductor para formar una suspensión que está o será situada entre dos electrodos,
- b. emisión de 1 a 100 pulsos de intensidad de campo eléctrico entre los electrodos,
- caracterizado porque los pulsos de intensidad de campo eléctrico son emitidos de tal modo que tiene lugar una subida de tensión entre los dos electrodos de 10 % a 90 % de una tensión objetivo de los pulsos de intensidad de campo eléctrico dentro de un intervalo de tiempo de 0,1 a 100 ns, los pulsos de intensidad de campo eléctrico presentan una duración de pulso de 5 ns a 5000 ns y los pulsos de intensidad de campo eléctrico poseen, al alcanzar la tensión objetivo, una intensidad de campo eléctrico de 0,5 kV/cm a 50 kV/cm.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la subida de tensión del al menos un pulso eléctrico de intensidad de campo tiene lugar en un intervalo de tiempo de 0,1 a 20 ns.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el al menos un pulso eléctrico de intensidad de campo posee una duración de pulso entre 10 ns y 100 ns.
- 15 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que, mediante el al menos un pulso de intensidad de campo eléctrico, se aplica al material celular biológico una energía de tratamiento, cuyo valor se sitúa entre 10 J/kg (suspensión de células) y 10 kJ/kg (suspensión de células).
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el material celular biológico contiene seres vivos pluricelulares o tejidos de seres vivos pluricelulares.
- 20 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el material celular biológico contiene semillas o gérmenes de plantas.
7. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el material celular biológico contiene esporas o micelios de hongos.
- 25 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el material celular biológico contiene seres vivos unicelulares.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el material celular biológico contiene microalgas.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que se aplica a la suspensión al menos un pulso de intensidad de campo eléctrico en un procedimiento continuo.
- 30

Fig. 1

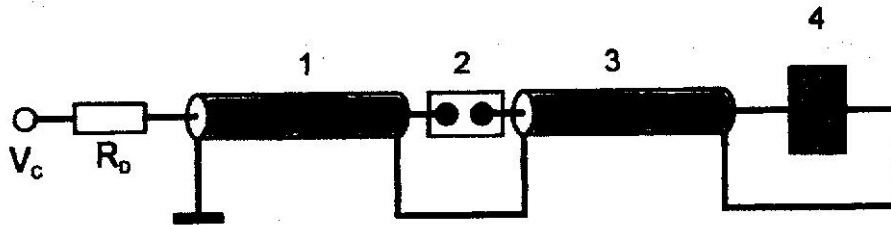


Fig. 2

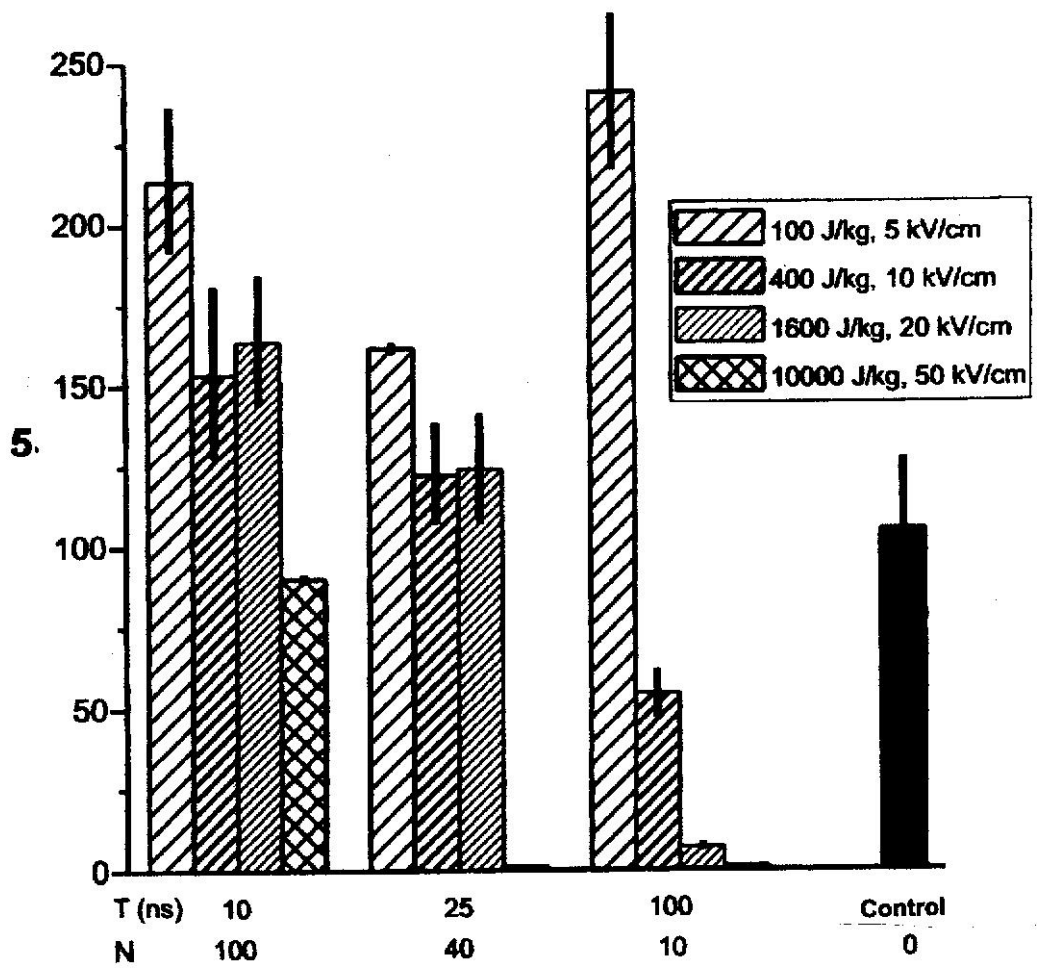


Fig. 3

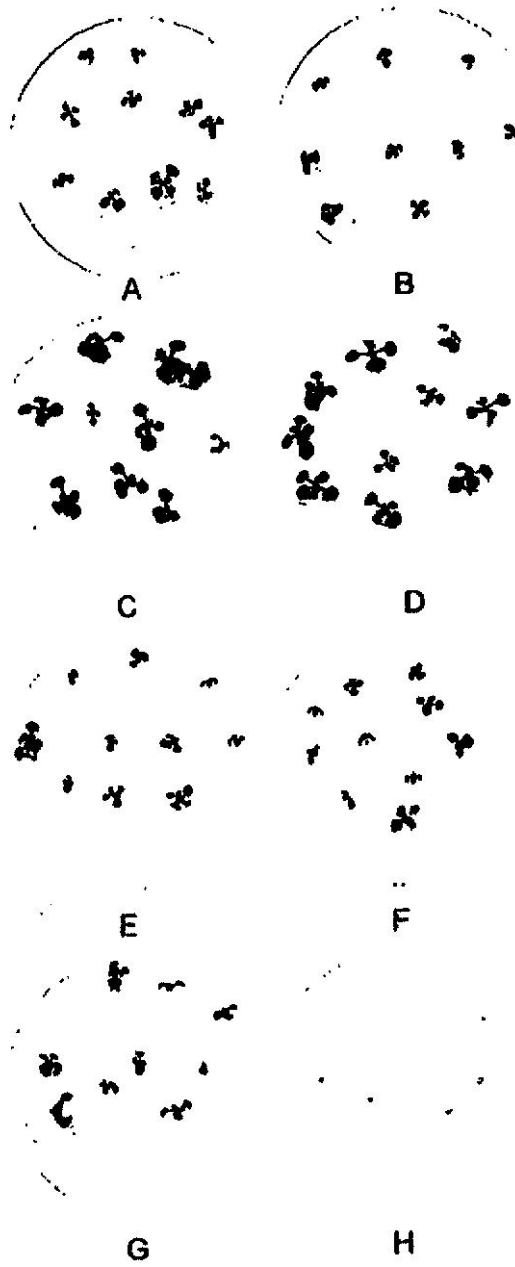


Fig. 4

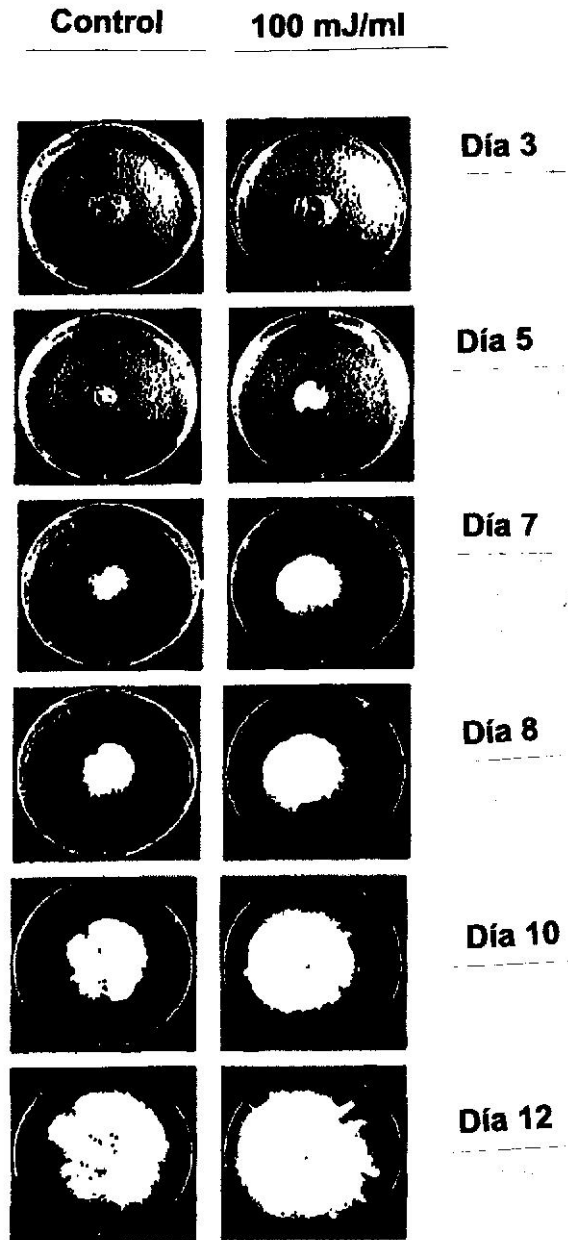


Fig. 5

