

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 577**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2012 PCT/EP2012/060164**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12163974**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2012 E 12724995 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2714893**

54 Título: **Modelo de cuero cabelludo reconstruido, y procedimiento para cribar moléculas activas**

30 Prioridad:

**30.05.2011 FR 1154684**

**02.06.2011 US 201161492383 P**

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

**25.04.2019**

73 Titular/es:

**L'OREAL (100.0%)**

**14 rue Royale**

**75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BAKKAR, KHALID**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 710 577 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

Modelo de cuero cabelludo reconstruido, y procedimiento para cribar moléculas activas

La presente invención se refiere a un modelo de cuero cabelludo reconstruido, al procedimiento para prepararlo, y a su uso para evaluar el efecto de productos tópicos cosméticos, farmacéuticos o dermatológicos.

- 5 El cuero cabelludo reconstruido según la invención también se puede usar para la preparación de injertos destinados a ser transplantados en mamíferos, más particularmente en pacientes humanos, tales como las personas que sufren quemaduras de tercer grado.

10 En años recientes se han desarrollado modelos de piel reconstruida, que son más o menos similares a la piel humana. Los ejemplos de modelos de piel reconstruida que se pueden mencionar incluyen los modelos descritos en los siguientes documentos: EP 0285471, EP 0285474, EP 0418035, WO 90/02796, WO 91/16010, EP 0197090, EP 0020753, FR 2665175, FR 2689904. Estos modelos hacen posible en primer lugar realizar estudios necesarios para una mejor comprensión del papel de la piel tanto en el campo mecánico como en el campo fisiológico, y en segundo lugar constituyen ensayos predictivos de la actividad de agentes activos cosméticos y/o farmacéuticos o de los efectos secundarios de los ingredientes tópicos.

- 15 El solicitante ha observado que estos modelos son adecuados para estudios relacionados con la piel del cuerpo humano, pero que no son ideales para estudios relacionados con una piel específica, el cuero cabelludo. Según el conocimiento del solicitante, hasta la fecha no se ha propuesto ningún modelo de cuero cabelludo reconstruido.

20 El cuero cabelludo es la parte de la piel situada bajo el cabello, es decir, sobre el cráneo. En un adulto, su área puede oscilar entre 650 y 700 cm<sup>2</sup>. Tiene una estructura convencional, pero tiene varias características importantes que lo distinguen de la piel de otras partes del cuerpo humano:

- su epidermis es más gruesa, debido a una renovación más rápida de estas células,
- su estrato córneo es más grueso, pero desorganizado,
- las actividades de sus folículos capilares son mayores debido a su mayor presencia (alrededor de 200 a 300 folículos/cm<sup>2</sup>),
- 25 - la producción de sus glándulas sebáceas es intensa, y la actividad de sus glándulas sudoríparas es elevada, lo que permite su colonización bacteriana y fúngica sustancial.

30 En general, los modelos de piel reconstruida descritos en los documentos mencionados anteriormente se preparan a partir de fibroblastos de las papilas dérmicas o de la vaina conjuntiva y/o células tomadas de la vaina epitelial externa (también conocida como la ORS por Vaina Radicular Externa) debido a la facilidad de producción de estas células. Específicamente, estas células son eliminadas cuando se tira del cabello, y son capaces de fabricar una epidermis cuando se colocan sobre un soporte, habitualmente un equivalente dérmico, y se cultivan en un medio de cultivo adecuado. Sin embargo, el tejido que se obtiene cultivando las células de las papilas dérmicas muestra una expresión de macromoléculas (especialmente colágeno) que no se corresponde con la de un cuero cabelludo *in vivo*. El tejido que se obtiene cultivando las células de la ORS tampoco tiene las características de un cuero cabelludo. Además, no se observará el fenómeno normal de descamación que tiene lugar en un cuero cabelludo *in vivo*, puesto que, ya que las células de la ORS nunca han estado en contacto con el aire, no se descaman. El modelo así obtenido no puede ser usado por lo tanto para reproducir *in vitro* la aparición de caspa. Finalmente, los tamaños y morfologías de las epidermis y dermis obtenidas usando estas diversas células no serán los mismos que aquellos de las epidermis y dermis del cuero cabelludo: en el caso del cuero cabelludo, la dermis es más gruesa y está más invaginada que en el caso de la piel.

40 El solicitante ha demostrado, sorprendentemente, que el cultivo de células interfoliculares del cuero cabelludo hace posible desarrollar un modelo de cuero cabelludo reconstruido que tiene la mayoría de las características de un cuero cabelludo *in vivo*.

45 Una característica de este modelo de cuero cabelludo es la expresión, en las capas suprabasales finales, es decir, en las capas granulares de la epidermis, de involucrina y queratina K10 (véase especialmente la figura 1). Las células de la capa granular están situadas por debajo del estrato córneo. La capa granular (o estrato granuloso) está formada por tres capas de queratinocitos aplanados, con un núcleo denso con forma oval. La expresión tardía de involucrina y de queratina K10 se encuentra en un corte en rodaja de cuero cabelludo obtenido a partir de una muestra tomada durante el "*lifting*", mientras que, en un corte en rodaja de piel reconstruida, la expresión de estos marcadores se observa a lo largo de las capas suprabasales, es decir, en las células de la capa de la sustancia mucosa malpighiana (que constituye el estrato espinoso). Esto demuestra que el modelo de cuero cabelludo según la invención tiene las especificidades de un cuero cabelludo *in vivo*.

50 Estas características hacen posible, en particular, distinguir un modelo de cuero cabelludo obtenido según el procedimiento de la invención con respecto a modelos de piel reconstruida estándar.

De este modo, el solicitante ha desarrollado un nuevo procedimiento para preparar un equivalente de cuero cabelludo.

El solicitante aisló células interfoliculares del cuero cabelludo, y tiene la idea de usarlas para desarrollar un equivalente de cuero cabelludo.

- 5 La expresión “equivalente de cuero cabelludo”, también denominada aquí más abajo como modelo de cuero cabelludo, significa el montaje de un equivalente epidérmico de cuero cabelludo que descansa sobre un equivalente dérmico de cuero cabelludo. Esta es una estructura producida *in vitro* vía un procedimiento técnico.

10 De este modo, la presente solicitud describe un procedimiento para preparar un equivalente de cuero cabelludo, que comprende una etapa de sembrar y una etapa de cultivar queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo sobre un equivalente dérmico, comprendiendo el mencionado equivalente dérmico colágeno y fibroblastos interfoliculares del cuero cabelludo.

15 En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un equivalente de cuero cabelludo, caracterizado por que se siembran y cultivan sobre un equivalente dérmico queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo, comprendiendo el mencionado equivalente dérmico colágeno y fibroblastos interfoliculares del cuero cabelludo, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de obtener dichos queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo a partir de una muestra del cuero cabelludo de la que se han retirado previamente los queratinocitos de la vaina epitelial externa.

20 Los equivalentes dérmicos se pueden preparar según diversos procedimientos, por ejemplo aquellos descritos en los documentos EP 0418035, WO 00/29553 o EP 0285471, teniendo cuidado de usar los fibroblastos mencionados anteriormente.

25 Los equivalentes dérmicos que se pueden mencionar incluyen redes mixtas de colágeno/fibroblastos, dermis a la que se ha retirado previamente la epidermis, membranas artificiales, por ejemplo filtros de la marca Millipore, sustratos subcutáneos a base de colágeno, plástico o cualquier otro soporte que sea compatible con la viabilidad celular. Preferentemente, el equivalente dérmico según la invención está en forma de una red de colágeno o una esponja de colágeno.

La expresión “red de colágeno” es bien conocida en la técnica anterior (Bell et al. 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 76, No. 3, p. 1274-1278), y representa un modelo conocido de equivalente dérmico que se ha usado durante décadas.

30 Preferentemente, según la invención, la red se prepara según el método descrito por Asselineau et al., 1987 (Models in dermatol., vol. III, Ed Lowe & Maibach, 1-7).

La expresión “esponja de colágeno” es también conocida para los expertos en la técnica. Representa biopolímeros a base de colágeno (por ejemplo: Mimedisk®, vendido BASF Beauty Care).

35 Según la invención, el colágeno puede ser cualquier tipo de colágeno de cualquier origen. A este respecto, se hará referencia a los diversos tipos de colágeno mencionados en las revisiones de Van der Rest y Garonne, 1990, Biochem., vol. 72, 473-484 o 1991, Faseb Journal, vol. 5, 2814-2823. De este modo, según la invención, el colágeno se escoge preferiblemente de colágenos fibrilares de tipo I, III o V.

Preferentemente, según la invención, se usa colágeno de origen animal, y particularmente colágeno de origen bovino.

40 El colágeno usado preferentemente según la invención es colágeno de tipo I. Lo más preferente según la invención, se usa colágeno bovino de tipo I. Obviamente, según la invención, se puede usar una mezcla de diferentes tipos de colágeno en cualquier proporción y/o de orígenes diferentes.

45 Preferentemente, el equivalente dérmico es una red de colágeno contraída, y la siembra con queratinocitos se lleva a cabo preferentemente después de 2 a 6 días, más preferentemente después de 3 a 5 días, e incluso más preferentemente después de 3 días de contracción de la red. La contracción del gel de colágeno es debida preferentemente a la acción de los fibroblastos interfoliculares del cuero cabelludo en el colágeno.

50 Los fibroblastos interfoliculares del cuero cabelludo y/o los queratinocitos se aíslan preferentemente, de forma respectiva, a partir de la dermis y a partir de la epidermis obtenidas a partir de una muestra de cuero cabelludo. Los queratinocitos de la vaina epitelial externa se habrán retirado previamente de esta muestra, por ejemplo depilando el cabello en la mencionada muestra. La depilación del cabello en la muestra de cuero cabelludo, por ejemplo usando pinzas, se realizará para retirar totalmente de la muestra los queratinocitos de la vaina epitelial externa.

Los queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo se obtienen preferentemente vía las siguientes etapas:

- separar la dermis del cuero cabelludo de la epidermis mediante tratamiento proteolítico de una muestra de cuero cabelludo, y en particular colocando una muestra de cuero cabelludo en contacto con dispasa o

termolisina,

- recuperar la epidermis del cuero cabelludo,
  - colocar la epidermis del cuero cabelludo así obtenida en contacto con tripsina,
  - recuperar los queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo, y
- 5 - cultivar los queratinocitos así obtenidos.

Los queratinocitos se amplifican antes de la siembra según la técnica de Rheinwald y Green (Cell, vol. 6, 331-344, 1975) cultivando sobre un soporte nutriente que consiste en fibroblastos en un medio adecuado conocido por los expertos en la técnica, en presencia de factores de crecimiento, especialmente aminoácidos, suero, toxina del cólera, insulina, triyodotironina, y disolución amortiguadora del pH. En particular, tal medio de cultivo puede contener especialmente al menos un factor de crecimiento mitogénico para queratinocitos (por ejemplo factor de crecimiento epidérmico (EGF) y/o factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), en particular KGF), insulina, hidrocortisona, y opcionalmente un antibiótico (por ejemplo: gentamicina o anfotericina B).

Ventajosamente, el mencionado medio también puede comprender suero o un extracto de la pituitaria, por ejemplo de origen bovino, epinefrina, transferrina y/o aminoácidos no esenciales.

15 Los fibroblastos usados para este cultivo serán más preferentemente fibroblastos 3T3. Los fibroblastos 3T3 son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Esta es una estirpe celular fibroblástica que se conoce desde 1962. "3T3" significa "inóculo de  $3 \times 10^5$  células de 3 días de transferencia".

El cultivo de los queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo es preferentemente un cocultivo con fibroblastos (preferentemente fibroblastos 3T3) cuya proliferación se ha detenido previamente, preferentemente irradiándolos previamente (por ejemplo con UV) o tratándolos previamente con mitomicina. La mitomicina (en particular mitomicina C) bloquea la proliferación de estas células sin, sin embargo, evitar que produzcan las sustancias nutrientes que son útiles para la proliferación de queratinocitos.

Según otra realización, los queratinocitos se amplifican antes de la siembra cultivándolos en un medio de cultivo que se ha tratado o suplementado con fibronectina (por ejemplo una caja de cultivo "revestida con fibronectina") o con colágeno (por ejemplo una caja de cultivo "revestida con colágeno de tipo I"), o en un medio de cultivo rico tal como el medio Epilife® (Gibco).

La dispasa (también conocida como proteasa neutra) es una enzima que pertenece a la familia de proteasas, que tiene la capacidad de escindir fibronectina y colágenos de tipo I y IV.

Los queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo se obtienen preferentemente vía las siguientes etapas:

- 30 - separar la dermis del cuero cabelludo de la epidermis mediante tratamiento proteolítico de una muestra de cuero cabelludo, y especialmente colocando una muestra de cuero cabelludo en contacto con dispasa o termolisina,
  - recuperar la dermis del cuero cabelludo,
  - colocar la dermis del cuero cabelludo así obtenida en contacto con colagenasa y/o tripsina,
- 35 - recuperar los fibroblastos interfoliculares del cuero cabelludo, y
- cultivar los fibroblastos así obtenidos.

Se entiende claramente que las enzimas mencionadas anteriormente se usan en concentraciones, conocidas por los expertos en la técnica, que les permiten tener los efectos deseados. Preferentemente, será la dispasa la que se usará para separar la dermis del cuero cabelludo de la epidermis. La tripsina (Gibco) hará posible obtener una suspensión de queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo a partir de la epidermis del cuero cabelludo. La colagenasa (Boehringer) y/o la tripsina harán posible obtener una suspensión de fibroblastos interfoliculares del cuero cabelludo a partir de la dermis del cuero cabelludo.

La recuperación de los queratinocitos o fibroblastos interfoliculares del cuero cabelludo se lleva a cabo preferentemente mediante filtración de la suspensión obtenida vía la acción de tripsina o colagenasa, seguido de centrifugación, en las condiciones conocidas por aquellos expertos en la técnica, y resuspensión del pelete de la centrifugación.

Más particularmente, el procedimiento según la invención incluye:

- a – sembrar con los queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo una red de colágeno que descansa sobre un soporte inmerso en un medio de cultivo;

b – multiplicar los queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo en la superficie de la mencionada red de colágeno;

c – elevar el mencionado soporte de manera que el medio de cultivo no cubra la cara superior del equivalente epidérmico durante la producción.

5 En particular, el soporte puede ser una rejilla de soporte.

El equivalente dérmico según la invención se obtiene, en particular, sembrando un medio de cultivo con fibroblastos interfoliculares del cuero cabelludo, seguido de la adición de colágeno.

El procedimiento según la invención puede comprender las siguientes etapas de cultivo:

10 a) células contráctiles cosechadas, por ejemplo, a partir de cultivos monocapa producidos en un medio nutriente sembrado con fragmentos de tejido animal o humano con

b) un medio nutriente suplementado con componentes de la matriz extracelular dérmica, en particular con colágeno,

formando la mencionada mezcla un gel que se contrae, que expelle el medio nutriente para formar el equivalente dérmico, y en particular la red de colágeno contraída.

15 Como célula contráctil, se usarán fibroblastos interfoliculares del cuero cabelludo obtenidos a partir de donantes humanos sanos y cosechados a partir de cultivos monocapa, mediante tripsinización controlada o usando colagenasa.

La implementación del procedimiento de preparación según la invención consiste en sembrar el equivalente dérmico – o sustrato dérmico – con queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo.

20 Se mantienen las condiciones que permiten la multiplicación de los queratinocitos en la superficie de dicho sustrato, promoviéndose el desarrollo de este cultivo de queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo mediante el uso de al menos un medio nutriente mínimo, preferiblemente un medio 3F como se describe en el Ejemplo 1, en contacto con los mencionados queratinocitos.

25 Ventajosamente, tras sembrar los queratinocitos en el sustrato, el sustrato implantado se mantiene, preferiblemente durante un tiempo entre 5 y 7 días, mediante inmersión en este medio nutriente que cubre los queratinocitos.

A continuación, el equivalente dérmico se pone en contacto con el aire. Para esto, se coloca sobre una rejilla de soporte que se eleva con respecto a la base del receptáculo, y se ajusta el nivel del medio nutriente, de manera que la rejilla de soporte está cubierta pero el medio nutriente no cubre la cara superior del equivalente de piel durante la producción.

30 Según el procedimiento de la invención, el equivalente dérmico contraído, sembrado con los queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo, se cultiva así preferentemente durante 5 a 7 días por inmersión en un medio de cultivo, seguido de la emersión durante 5 a 7 días en un soporte adecuado.

El equivalente de cuero cabelludo según la invención así constituido está bien diferenciado y bien organizado. También es globalmente homogéneo.

35 Según una variante del procedimiento según la invención, es posible obtener un equivalente de cuero cabelludo, que comprende cabello, implantando en el mencionado equivalente de cuero cabelludo dérmico (en particular en la red de colágeno), que se ha contraído o que está en vías de contraerse, fibroblastos del cabello escogidos de fibroblastos de la papila dérmica y/o fibroblastos de la vaina conjuntiva, y/o papilas dérmicas completas y/o vainas conjuntivas y/o fracciones de vainas conjuntivas. Esta implementación puede tener lugar, por ejemplo, usando una jeringuilla. Estos fibroblastos capilares, las papilas dérmicas completas, las vainas conjuntivas, y/o las fracciones de vainas conjuntivas, se añadirán después de que los fibroblastos interfoliculares hayan comenzado su acción sobre el colágeno. Por lo tanto, esta adición no tiene lugar al mismo tiempo que los fibroblastos interfoliculares del cuero cabelludo. Los fibroblastos capilares se añadirán preferentemente en una cantidad de 1000 a 10000 células, es decir, una proporción de aproximadamente 1 a 10 fibroblastos capilares por 100 fibroblastos interfoliculares del

40

45

Al implantar los fibroblastos capilares, tales como los fibroblastos de la papila o los fibroblastos de la vaina conjuntiva o de la papila completa o de la vaina conjuntiva o fracciones de la vaina conjuntiva, en el equivalente dérmico, los queratinocitos reproducirán la morfogénesis del pelo corporal o del cabello (tallo del cabello) (Reynolds A.J., Lawrence C.M., Jahoda C.A., Human hair follicle germinative epidermal cell culture. J. Invest. Dermatol. 1993 Oct.; 101 (4): 634-8).

50

La presente solicitud también describe un equivalente de cuero cabelludo que se puede obtener vía el procedimiento según la invención. Este equivalente de cuero cabelludo exhibe la expresión de involucrina y/o de queratina K10 en

sus capas granulares, que es una expresión comparable a aquella de un cuero cabelludo *in vivo*. La expresión “expresión comparable” significa una expresión de los genes que codifican estas proteínas, que tiene lugar en las células situadas en el mismo sitio como en el tejido *in vivo* y/o con la misma intensidad.

5 Dado que el equivalente de cuero cabelludo tiene las características de un cuero cabelludo *in vivo*, se puede injertar de la misma manera y con el mismo éxito que los injertos tomados de la nuca o de la región occipital del individuo a tratar. Las técnicas de autoinjerto se describen, por ejemplo, por Bouhanna et al. (Dermatol. Surg.; Nov. 2003, 29(11), 1130-4). Tras un injerto, el equivalente de cuero cabelludo según la invención tiene así la capacidad de sustituir apropiadamente la parte de cuero cabelludo original.

10 El equivalente de cuero cabelludo también encontrará aplicaciones para la preparación de injertos destinados a tratar un trastorno cutáneo del cuero cabelludo, tal como una quemadura, un defecto de cicatrización, o canas, y destinados así para ser transplantados en mamíferos, y más particularmente en pacientes humanos, tales como las personas que padecen quemaduras de tercer grado. Un injerto se define como una parte de un tejido destinado al injerto.

15 De este modo, la presente solicitud describe un equivalente de cuero cabelludo como se define previamente, para su uso para tratar o en el tratamiento de uno de los trastornos cutáneos del cuero cabelludo mencionados anteriormente. Este equivalente de cuero cabelludo o injerto tendrá características, en términos de expresión de involucrina y de queratina K10, comparables a aquellas de un cuero cabelludo *in vivo* (es decir, expresión de involucrina y de queratina K10 en las capas granulares finales de la epidermis). La presente solicitud también describe así el uso de un equivalente de cuero cabelludo como se describe previamente, para la fabricación de un  
20 injerto para tratar uno de estos trastornos cutáneos del cuero cabelludo.

Independientemente de la variante del procedimiento adoptada para su preparación, el equivalente de cuero cabelludo que se ha obtenido es un modelo tridimensional que es útil como un ensayo alternativo para cualquier ensayo que requiriese experimentación con animales, por ejemplo estudios sobre la liberación de agentes activos, su penetración cutánea y/o su absorción y/o su biodisponibilidad, o estudios sobre la tolerancia, compatibilidad o  
25 eficacia de agentes activos y/o de ingredientes cosméticos, farmacéuticos o dermatológicos.

De este modo, la presente solicitud también describe el uso de un equivalente de cuero cabelludo como se describe previamente, para ensayar la penetración y/o absorción cutáneas y/o biodisponibilidad y/o eficacia de compuestos sobre el cuero cabelludo, y/o para ensayar la tolerancia y/o la compatibilidad de compuestos con respecto al cuero cabelludo.

30 De este modo, este uso hace posible ver si un compuesto penetra en las diversas capas del cuero cabelludo, o si de hecho tiene el efecto deseado.

Este equivalente de cuero cabelludo es especialmente útil para la identificación de un compuesto que es un modulador del crecimiento capilar, y/o de moléculas que actúan sobre la calidad y homeostasis del cuero cabelludo, y especialmente sobre la descamación del cuero cabelludo, el tratamiento de la caspa o de un cuero cabelludo  
35 sensible.

Además, puede permitir la búsqueda de biomarcadores ligados al estado normal o patológico del cuero cabelludo. Una ventaja adicional reside en la posibilidad de estudiar la implementación de folículos pilosos, glándulas sudoríparas o glándulas sebáceas, a fin de parecerse aún más a un cuero cabelludo *in vivo*.

Este modelo es necesario a fin de inducir la formación del cabello mediante inyección de células madre.

40 El modelo de cuero cabelludo reconstruido, según la presente solicitud, puede hacer posible cuantificar la actividad de moléculas que son capaces de inducir la formación de cabello a partir de células madre (por ejemplo, a partir de células del bulbo).

Los equivalentes de cuero cabelludo que comprenden folículos capilares harán posible especialmente llevar a cabo la cinética de crecimiento del pelo corporal o del cabello, y de este modo permitirán cualquier estudio que requiera  
45 numerosos cabellos vivos que sean tan completos como sea posible en un contexto *in vivo*, tal como el estudio del ciclo capilar o de los factores capaces de influir en este ciclo, hasta el estudio de agentes activos que promuevan el crecimiento del cabello, agentes activos para combatir la pérdida del cabello, o agentes activos que ralenticen el crecimiento del cabello.

Los procedimientos de cribado del producto para identificar nuevos agentes activos incluyen una etapa (a) de  
50 colocar el mencionado producto de ensayo en contacto con un equivalente de cuero cabelludo según la invención, y después, una etapa (b) de análisis del efecto del mencionado producto sobre al menos un parámetro del equivalente de cuero cabelludo, y una etapa (c) de seleccionar el producto que modifique el mencionado parámetro.

Preferiblemente, para llevar a cabo la etapa (a), el producto de ensayo se aplica tópicamente, por ejemplo formulado en formulaciones tópicas estándar, o también introducido en el medio de cultivo.

El parámetro del equivalente de cuero cabelludo se escoge preferiblemente de la expresión, la producción y/o la actividad de marcadores escogidos previamente en el equivalente de cuero cabelludo, y/o la descamación del equivalente de cuero cabelludo.

5 La etapa (b) se puede llevar a cabo, en particular, vía el análisis de la expresión, producción y/o actividad de marcadores asociados con la calidad y/u homeostasis del cuero cabelludo, por ejemplo marcadores epidérmicos y/o dérmicos tales como proteínas estructurales, especialmente proteínas de la diferenciación epidérmica y proteínas macromoleculares de la matriz dérmica. Los ejemplos de proteínas estructurales que se pueden mencionar son queratinas del cabello.

10 Estos marcadores asociados con la calidad y/u homeostasis del cuero cabelludo pueden ser representativos de la descamación del cuero cabelludo, o de una afección de caspa, o de un cuero cabelludo sensible.

15 Cuando el modelo de cuero cabelludo según la presente solicitud comprende fibroblastos capilares, tales como fibroblastos de la papila o fibroblastos de la vaina conjuntiva, o de toda la papila, o de la vaina conjuntiva, o fracciones de la vaina conjuntiva, que se han implantado como se describe anteriormente en el equivalente dérmico, las pruebas de cribado también pueden estar destinadas a identificar productos capaces de inducir el crecimiento del tallo piloso.

Para esto, la etapa (b) del procedimiento de cribado analizará el efecto sobre el crecimiento del tallo piloso.

Cuando el modelo de cuero cabelludo según la presente invención comprende células del sistema inmune, tales como células de Langerhans, las pruebas de cribado también pueden estar destinadas a identificar productos que son capaces de inducir irritación o reacciones alérgicas.

20 Para esto, la etapa (b) del procedimiento de cribado analizará el efecto del producto sobre al menos uno de los parámetros escogido preferentemente de:

- la citotoxicidad;
- la liberación de mediadores de la inflamación;
- 25 - daño celular revelado por histología o por la liberación de lactato deshidrogenasa (un marcador de la integridad de la membrana queratinocítica) (Roguet et al., J. Tox. In vitro 6:303 (1992) y Ponc M en In Vitro Toxicology. Eds Rougier, Maibach and Golberg p. 107, 1994);
- modificación de la síntesis y composición de los lípidos de la piel, particularmente las ceramidas y fosfolípidos (JID 86, 598 (1986));
- 30 - la estratificación de células epiteliales como un marcador de su diferenciación (M. Prunieras y R. Roguet Toxicologie cellulaire in vitro methodes et applications, Eds M. Adolphe, A. Guillouzo and F. Marano publicado por INSERM 1995 p. 191-236) (Duffy P.A., Flint O.P.: In vitro dermal irritancy test. En C.K. Atterwill and C.E. Steele (Eds): In vitro methods in Toxicology, Cambridge Univ. Press Cambridge 1987, p. 279-297) (Use of skin cell culture for in vitro assessment of corrosion and cutaneous irritancy, Roguet, Cell Biology and Toxicology, 1999:15, 63-75).

35 La etapa (b) de análisis del efecto del producto será preferentemente una comparación de al menos un parámetro medido sobre el equivalente de cuero cabelludo puesto en contacto con el producto de ensayo con aquel o aquellos medidos en un equivalente de cuero cabelludo de control cultivado en las mismas condiciones pero que no ha recibido el producto de ensayo.

40 La etapa (c) de seleccionar el producto que modifica el parámetro del equivalente de cuero cabelludo se realizará como una función de un criterio determinado previamente.

La modificación de este parámetro puede ser una estimulación, una disminución, o una inhibición total o parcial de la expresión, producción y/o actividad de los mencionados marcadores y/o del crecimiento del tallo piloso y/o de la descamación del equivalente de cuero cabelludo.

45 El criterio para seleccionar el mencionado producto será, por ejemplo, tal que este producto tenga un efecto estimulante o inhibidor sobre el parámetro medido.

El equivalente de cuero cabelludo según la presente solicitud también se puede usar en procedimientos de cribado automatizados, para compuestos cosméticos, farmacéuticos o dermatológicos, para identificar nuevos agentes activos.

La Figura 1 ilustra la invención más claramente, sin, sin embargo, limitar su alcance.

50 En esta figura, las fotografías muestran cortes de piel reconstruida (equivalente de piel) (A), de equivalente de cuero cabelludo según la invención (B), y de una muestra de cuero cabelludo (C), tras el inmunomarcaje usando

anticuerpo anti-involucrina (I) y anticuerpo anti-K10 (II).

Los ejemplos dados más abajo se presentan como ilustraciones no limitantes de la invención.

**Ejemplo 1 – Preparación de un modelo de cuero cabelludo**

5 Los queratinocitos y fibroblastos interfoliculares del cuero cabelludo se aíslan de muestras de cuero cabelludo recogidas durante un *lifting* de la cara (y de este modo obtenidos de mujeres relativamente maduras), o de muestras de cuero cabelludo obtenidas de hombres relativamente jóvenes.

Para aislar estas células de cuero cabelludo, se lleva a cabo el depilado del cabello para eliminar los queratinocitos de la vaina epitelial externa, y entonces la dermis se separa de la epidermis a fin de extraer las dos poblaciones celulares diana, a saber, los fibroblastos y los queratinocitos interfoliculares.

10 Protocolo experimental:

Excepto que se indique de otro modo, todos los medios y amortiguadores usados en los ejemplos se describen en Bell et al. 1979 (P.N.A.S. USA, 76, 1274-1278), Asselineau y Prunieras, 1984, (British J. of Derm., 111, 219-222) o Asselineau et al., 1987, (Models in dermato., vol. III, Ed. Lowe and Maibach, 1-7).

El medio MEM + 10% FCS + 3F (conocido como medio 3F) tiene la siguiente composición:

Reactivo	Marca	Volumen
MEM	Biochrom KG	500 ml
L-Glutamina 200 mM	Gibco	5 ml
Piruvato sódico 100 mM	Biochrom KG	5 ml
NEA	Biochrom KG	5 ml
FCS	Biochrom KG	50 ml
Penicilina-estreptomina	Biochrom KG	1 ml
Antibiótico-antimicótico	Gibco	0,5 ml
EGF 10 µg/ml	TEBU	0,5 ml
Toxina del cólera 10 <sup>-5</sup> M	Sigma	5 µl
Hidrocortisona 0,5 mg/ml	Sigma	0,4 ml

15 - Colóquense los trozos de la parte "Superior" en una cápsula de cultivo de diámetro 100 mm que contiene 30-40 ml de dispa (Roche), y almacénense toda la noche (15 horas) a 4°C, o almacénense durante 1 hora 30 minutos a 37°C en una incubadora seca, teniendo mucho cuidado de cortar trozos pequeños.

1. Preparación del cultivo primario de queratinocitos humanos normales

20 - Retírense las muestras del baño de dispa y colóquense en una cápsula de cultivo (diámetro 100 mm) que contiene 10 ml de tripsina-EDTA (0,05%-0,02%).

- Llévase a cabo la separación de la dermis de la epidermis usando pinzas curvadas, y ráspese suavemente la superficie de la dermis con la parte posterior de las pinzas, para recuperar los queratinocitos basales.

- Colóquese la epidermis en un tubo cónico (50 ml) con los 10 ml de tripsina-EDTA procedentes de la cápsula.

25 - Enjuáguese la cápsula con 5 ml de tripsina-EDTA.

- Filtrese a través de una gasa estéril.

- Neutralícese con 20 ml de suero fetal de ternera puro (FCS).

- Colóquese la suspensión en un tubo cónico de 50 ml.

- Centrifúguese la suspensión celular durante 10 minutos a 1200 rpm.

## ES 2 710 577 T3

- Elimínese el sobrenadante, recoja el pelete con MEM 10% FCS + 7F (este medio comprende los mismos compuestos que el medio 3F y cuatro compuestos adicionales: adenina, transferrina, T3, insulina).
  - Cuéntense las células viables.
  - Siémbrense las cápsulas de cultivo con 10000 células vivas/cm<sup>2</sup>.
- 5 - 24 horas más tarde, llévese a cabo un cocultivo estándar añadiendo el 3T3 (12000 células/cm<sup>2</sup>) tratado con mitomicina C (Ametycine®), sin cambiar el medio.

### 2. Protocolo para aislar las células dérmicas:

a) Prepárese una disolución que comprende 0,1% de glucosa, 0,8% de NaCl y 0,04% de KCl.

- Añádase colagenasa al 0,1% (Worthington).

10 - Filtrese la disolución con un filtro Millipore o Nalgene de 0,22 µm.

b) Colóquese la dermis en forma de trozos pequeños con una longitud lateral de alrededor de 2 mm, 20 ml de disolución de colagenasa, y una barra estéril, en un vaso de precipitados de 50 ml.

- Agítese a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 hora 30 minutos.

- Filtrese la suspensión obtenida a través de un grosor doble de una gasa estéril.

15 - Centrifúguese la suspensión filtrada en las condiciones habituales para la centrifugación de células.

c) Resuspéndase el pelete en medio de cultivo reciente, cuéntense las células, y siémbrense las cápsulas.

### 3. Preparación de las redes:

Si el experimento a realizar comprende más de 25 redes, todos los volúmenes anteriores se deben doblar.

#### MEM 1,76X

20 17,6 ml de MEM 10X

5,1 ml de NaHCO<sub>3</sub> 7,5%

0,88 ml de L-glutamina (1,76 mM)

0,88 ml de piruvato sódico (0,88 mM)

0,88 ml de aminoácidos no esenciales 0,88 X (Ref.: K 0293 - Proveedor: Biochrom KG)

25 0,088 ml de penicilina/estreptomicina 8,8 U/8,8 µg/ml (0,088%) (Ref.: A2212 - Proveedor: Biochrom KG)

0,044 ml de antibiótico antimicótico 0,04 X (0,04%)

75 ml de agua ultrapura estéril.

#### MEM HEPES 10% FCS

50 ml de MEM 25 mM HEPES

30 0,5 ml de L-glutamina (2 mM)

0,5 ml de piruvato sódico (1 mM)

0,5 ml de aminoácidos no esenciales 1 X

0,1 ml de penicilina/estreptomicina 20 U/20 µg/ml (0,2%)

0,05 ml de antibiótico antimicótico 0,1 X (0,1%)

35 5 ml de FCS 10%.

#### NaOH 0,1N

10 ml de NaOH 1N

90 ml de agua ultrapura estéril

## ES 2 710 577 T3

Esta disolución se hace pasar a través de un filtro Millipore con una membrana GV Durapore de 0,22 µm.

Ácido acético 1/1000

0,5 ml de ácido acético glacial al 100%

499,5 ml de agua ultrapura estéril

5 Usando el medio así preparado:

- Prepárense en un matraz cónico estéril 5 ml de la siguiente disolución:

3,22 ml de MEM 1,76 X

0,63 ml de FCS

0,35 ml de NaOH 0,1N

10 0,6 ml de ácido acético 1/1000

0,2 ml de MEM HEPES 10% FCS.

- Añádanse a esta disolución 0,5 ml de suspensión celular de fibroblastos interfoliculares capilares.

- A continuación, añádase lentamente el volumen necesario de colágeno frío (2,1 ml de este colágeno es colágeno Gattefossé o Symatèse, o 1,5 ml si es colágeno Coletica).

15 - Agítense vigorosamente el matraz cónico hasta la homogeneización (la disolución rosada fucsia se vuelve de color salmón).

- Vacíense los contenidos del matraz cónico en una cápsula para bacterias de 60 mm FalconØ.

- Colóquese la cápsula en un homo (37°C – 5% de CO<sub>2</sub>) durante alrededor de 1 hora 30 minutos – 2 horas.

20 - Cuando el gel se haya endurecido y el medio haya sido expelido, compruébese el comienzo de la contracción.

- En la tarde, agítense las redes con regularidad, de manera que no se vuelvan a pegar juntas.

- Déjese transcurrir la contracción durante 3 días.

#### 4. Cultivo-siembra con queratinocitos

La siembra con queratinocitos se lleva a cabo después de 3 días de contracción de las redes.

25 a) Preparación del adhesivo

- Prepárense 0,7 ml de la siguiente disolución, dada para enlazar dos redes:

0,46 ml de MEM 1,76 X

0,09 ml de FCS

0,05 ml de NaOH 0,1N

30 0,1 ml de MEM HEPES 10% FCS

- Añádanse a este tubo 0,3 ml de colágeno dializado. El volumen final es de este modo 1 ml.

Comentarios:

- Los volúmenes anteriores se dan para el enlazamiento de dos redes.

35 - Para varias redes, prepárese una disolución global que corresponde a n+1 muestras a enlazar, en un matraz cónico.

- Dispénsense, por tubo, 0,7 ml de esta disolución usando una multipipeta.

- A continuación, añádanse 0,3 ml por tubo de colágeno.

- Trabájense las redes de dos en dos.

## ES 2 710 577 T3

### b) Enlace de las redes

- Tómese un tubo de 6 ml lleno con disolución adhesiva.
- Agítese con una mezcladora de vórtice.
- 5 - Recójase la disolución mediante una pipeta y colóquese en dos cápsulas de cultivo Corning una gota de alrededor de 0,45 ml de esta disolución en el centro de cada cápsula.
- Recójase una red usando pinzas curvadas y un elevador celular.
- Colóquese la red en la tapa de esta cápsula original, a fin de eliminar el medio excedente.
- Recójase la red y colóquese en la gota del adhesivo.
- 10 - Extiéndase uniformemente haciendo girar la cápsula de manera que el adhesivo se distribuya alrededor de la red.
- Colóquense las cápsulas en un horno (37°C – 5% de CO<sub>2</sub>) durante 20-30 minutos, para permitir que el adhesivo se endurezca.

### c) Siembra con queratinocitos

- 15 - Descongélense las células tan rápido como sea posible agitando el vial en un baño de agua a 37°C, en caso de que estas células estuviesen congeladas.
- Transfíranse los contenidos del vial a un tubo de cultivo Falcon de 50 ml que contiene 35 ml de medio MEM 10% FCS + 3F.
- Centrifúguese durante 5 minutos a 1000 rpm.
- Elimínese el sobrenadante.
- 20 - Recójase el pelete de la centrifugación con medio MEM 10% FCS + 3F, para obtener una disolución que contiene 100000 células/ml.
- Resuspéndanse las células mediante succión-eyección varias veces.
- Colóquese un anillo de siembra de 14 mm de diámetro en las redes enlazadas.
- 25 - En este anillo, colóquese 0,5 ml de suspensión celular (= 50000 células/anillo 1,5 cm<sup>2</sup>, es decir, alrededor de 33000 células por cm<sup>2</sup>).
- Alrededor del anillo, añádanse suavemente 5 a 7 ml de medio MEM 10% FCS + 3F, para no despegar la red.
- Paralelamente, siémbrense dos “anillos de control” (cápsulas con anillos que no contienen red).
- Colóquense las cápsulas en un horno a 37°C – 5% de CO<sub>2</sub>, durante 2 horas.
- Retírense los anillos usando pinzas curvadas, después de las 2 horas de adhesión.
- 30 - Devuélvanse las cápsulas al horno a 37°C – 5% de CO<sub>2</sub>.
- Cámbiese el medio el miércoles y el viernes (5 a 7 ml de medio MEM 10% FCS + 3F por cápsula).

### - Cultivo-emersión de pieles reconstruidas

Después de siete días de cultivo en inmersión, las pieles se colocan en emersión.

Sin embargo, compruébese que los queratinocitos emergen de la red, observando con un microscopio.

- 35 - Colóquese una rejilla de emersión en una cápsula Falcon para bacterias.
- Añádanse 7,5 ml de MEM 10% FCS + 3F mientras se tiene cuidado de evitar la formación de burbujas.
- Córtese el adhesivo alrededor de la piel a emerger, usando un escalpelo estéril.
- Transfírase la piel sobre la rejilla con pinzas curvadas y un elevador celular.
- Colóquense las cápsulas en el horno a 37°C – 5% de CO<sub>2</sub>.
- 40 - Cámbiese el medio el miércoles y el viernes (7 a 7,5 ml de medio MEM 10% FCS + 3F).

Después de siete días de emersión, las pieles reconstruidas de cuero cabelludo ya están listas para ser usadas.

**Ejemplo 2: Comparación de la expresión de involucrina y de queratina K10**

La expresión de involucrina y de queratina K10 en el equivalente de cuero cabelludo obtenido en el Ejemplo 1 se observa tras el inmunomarcaje usando anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra involucrina o contra K10. Esta expresión también se observa en un equivalente de piel estándar y en una muestra de cuero cabelludo.

Preparación del equivalente de piel estándar y de la muestra de cuero cabelludo:

Para preparar un equivalente dérmico estándar, se colocan en un tubo Falcon estéril 3,22 ml de medio MEM 1,76 X, 0,63 ml de suero fetal de ternera, 0,35 ml de hidróxido sódico 0,1 N, y 0,20 ml de una mezcla de medio de MEM/HEPES que contiene 10% de suero fetal de ternera (MEM/HEPES/FCS10).

Entonces se añadieron, a una concentración de  $1 \times 10^6$  células por 0,5 ml de medio de cultivo, 0,50 ml de medio MEM/HEPES/FCS10 que contiene fibroblastos obtenidos de cirugías mamarias humanas preparados previamente según el método descrito por Bell et al. 1979 (P.N.A.S. USA, 76, 1274-1278), Asselineau y Prunieras, 1984, (British J. of Derm., 111, 219-222) o Asselineau et al., 1987, (Models in dermatol., vol. III, Ed. Lowe & Maibach, 1-7).

Entonces se añadieron lentamente, por la pared del tubo, 2 ml de una mezcla volumen/volumen de colágeno a una concentración de 3 mg/ml en ácido acético hasta 1/1000, para observar la aparición de una turbidez blanquecina. El conjunto se mezcla entonces con cuidado y se coloca en una cápsula de Petri de 60 mm de diámetro (tipo Falcon 60 mm, referencia. 1016). La cápsula de Petri se coloca entonces en un horno a 37°C, y se deja durante alrededor de 2 horas 30 minutos. Cuando se observa la aparición de dos fases (gel + medio), la red se separa con cuidado de su soporte, y la red así separada de su soporte se deja durante 4 días en el horno.

Para preparar un equivalente de piel estándar, el equivalente dérmico estándar se extiende en una cápsula de cultivo de tipo Corning de 60 mm de diámetro sobre una gota de "adhesivo" de colágeno (0,6 ml), y entonces se mantiene a 37°C en un horno durante 20-30 minutos.

Se coloca un anillo de acero estéril sobre la red, y dentro del anillo se colocan 0,5 ml de una suspensión celular de queratinocitos humanos obtenidos de cirugías mamarias preparados según Régnier et al. (Frontier of Matrix Biology, Vol. 9, 4-35, Karger, Basle 1981), en una concentración de 100000 células/ml en medio MEM 10% FCS + 3F.

Alrededor de 6 ml de medio (MEM 10% FCS + 3F) se colocan alrededor del anillo, y la cápsula se coloca en un horno a 37°C durante 2 horas. El anillo se retira entonces, y la cápsula se devuelve al horno.

Después de ocho días, el cultivo se coloca entonces en la interfaz aire/líquido, consistiendo entonces el mencionado líquido en el mismo medio como previamente.

Entonces se continúa el cultivo durante 1 semana hasta que se obtiene un equivalente epidérmico histológicamente satisfactorio, es decir, un equivalente epidérmico que tiene las cuatro capas celulares estándar, a saber, las capas basal, suprabasal, granular y córnea.

La muestra de cuero cabelludo se recupera tras el *lifting*, según los métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Medida de la expresión de involucrina y de queratina K10

Tras la congelación, los diversos tejidos se cortan en rebanadas de 5  $\mu$ m de grosor usando un criostato.

Las rebanadas se enjuagan entonces dos veces con PBS, y en cada rebanada se colocan 25  $\mu$ l de anticuerpo anti-involucrina (Sigma - Ref.: 19018) y anticuerpo anti-K10 (Immuquest Ltd - Ref. AE20) diluidos 1/50, y se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Las rebanadas se enjuagan entonces dos veces con PBS, y en cada rebanada se depositan 25  $\mu$ l de anticuerpo conjugado con FITC (anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado con FITC, Dako F232), y se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Las rebanadas se enjuagan dos veces con PBS y se observan, tras su montaje, en un microscopio de fluorescencia de marca Leica, modelo Leitz DMRB.

La observación muestra que, en el control (piel reconstruida), involucrina (figura 1, I) y queratina K10 (figura 1, II) están expresadas en todas las capas suprabasales de la epidermis reconstruida (figura 1, A), mientras que se expresan de forma tardía, es decir, solamente en las capas granulares, de la epidermis de los equivalentes de cuero cabelludo (figura 1, B) y de las muestras de cuero cabelludo (figura 1, C).

La expresión de estos dos marcadores tiene lugar de forma temprana en la piel reconstruida (A), y de forma tardía en el modelo de cuero cabelludo reconstruido (B) y en la muestra de cuero cabelludo (C) en los lugares indicados por las flechas en la figura 1.

De este modo, estos resultados hacen posible confirmar que el modelo de cuero cabelludo reconstruido según la

invención es similar a la estructura y funcionalidad de un cuero cabelludo *in vivo*.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para preparar un equivalente de cuero cabelludo, caracterizado por que queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo se siembran y se cultivan en un equivalente dérmico, comprendiendo el mencionado equivalente dérmico colágeno y fibroblastos interfoliculares del cuero cabelludo, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de obtener dichos queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo a partir de una muestra de cuero cabelludo, y retirar previamente los queratinocitos de la vaina epitelial externa.
2. Procedimiento según la reivindicación anterior, caracterizado por que el equivalente dérmico es una red de colágeno contraída, y por que la siembra con queratinocitos se lleva a cabo después de 2 a 5 días de contracción de la mencionada red.
- 10 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los mencionados fibroblastos y queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo se aíslan, respectivamente, de la dermis y epidermis obtenidas a partir de una muestra de cuero cabelludo.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que los queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo se obtienen vía las siguientes etapas:
- 15 - separar la dermis del cuero cabelludo de la epidermis mediante tratamiento proteolítico de una muestra de cuero cabelludo,
- recuperar la epidermis del cuero cabelludo,
- colocar la epidermis del cuero cabelludo así obtenida en contacto con tripsina,
- recuperar los queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo, y
- 20 - cultivar los queratinocitos así obtenidos.
5. Procedimiento según la reivindicación anterior, caracterizado por que el cultivo de queratinocitos es un cocultivo con fibroblastos tratados previamente con mitomicina o irradiados, o un cultivo en un medio de cultivo suplementado con fibronectina o con colágeno.
- 25 6. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que los fibroblastos interfoliculares del cuero cabelludo se obtienen vía las siguientes etapas:
- separar la dermis del cuero cabelludo de la epidermis mediante tratamiento proteolítico de una muestra de cuero cabelludo,
- recuperar la dermis del cuero cabelludo,
- colocar la dermis del cuero cabelludo así obtenida en contacto con colagenasa y/o tripsina,
- 30 - recuperar los fibroblastos interfoliculares del cuero cabelludo, y
- cultivar los fibroblastos así obtenidos.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el equivalente dérmico contraído sembrado con los queratinocitos interfoliculares del cuero cabelludo se cultiva durante 5 a 7 días mediante inmersión en un medio de cultivo, seguido de la emersión durante 5 a 7 días en un soporte adecuado.
- 35 8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende una etapa en la que los fibroblastos capilares, escogidos de fibroblastos de la papila dérmica y/o fibroblastos de la vaina conjuntiva, y/o de papilas dérmicas completas y/o de vainas conjuntivas y/o de fracciones de vainas conjuntivas, se implantan en el mencionado equivalente dérmico que se ha contraído o que está en vías de contraerse.

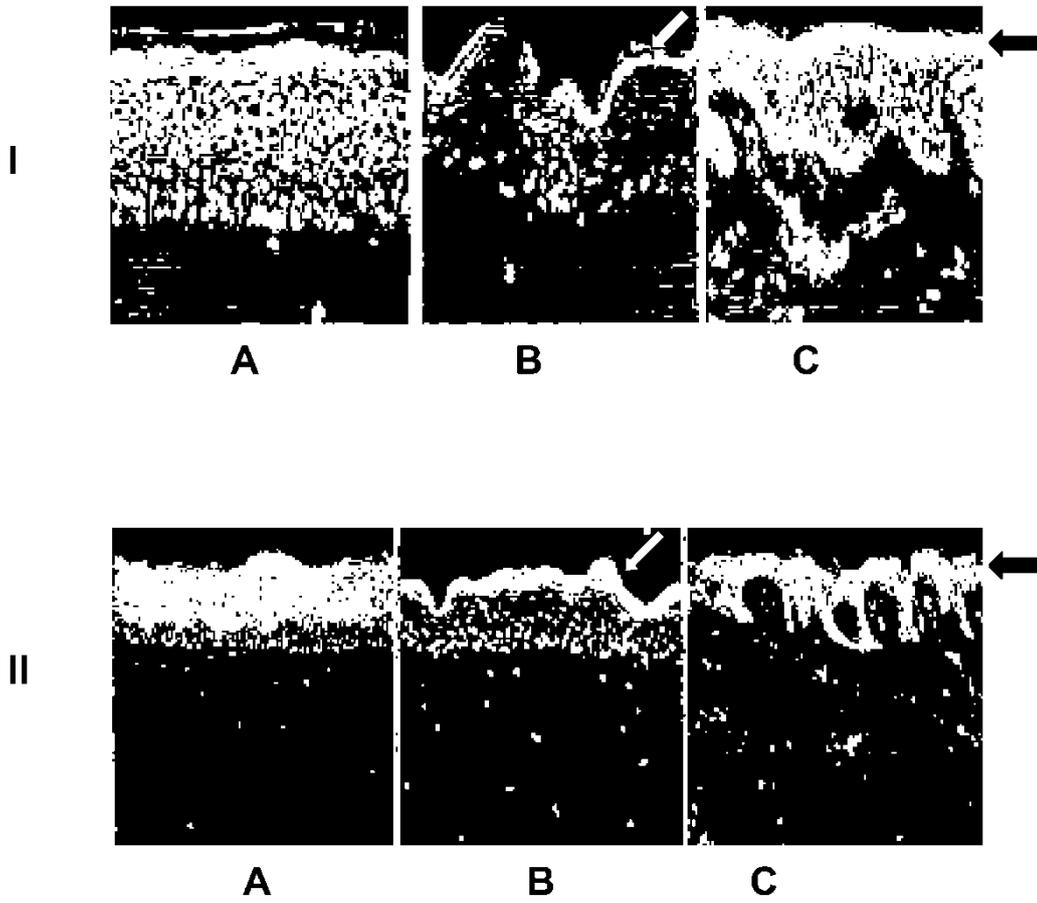


FIGURA 1