(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **1 331 827**

(21) Número de solicitud: 202630842

(51) Int. CI.:

G01M 7/02	(2006.01)	***G10K 11/172***	(2006.01)
G10K 11/00	(2006.01)	***G10K 11/02***	(2006.01)
F16F 15/00	(2006.01)	*C12M 1/34*	(2006.01)
G10K 11/16	(2006.01)		

(12) SOLICITUD DE MODELO DE UTILIDAD U

(22) Fecha de presentación:

02.07.2024

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

15.10.2026

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ALICANTE (75,00%)
Edificio Germán Bernácer. SGITT-OTRI. Ctra. San Vicente del Raspeig, s/n
03690 San Vicente del Raspeig (Alicante) ES y
CORRIENTES DEL SUR SL (25,00%)

(72) Inventor/es:

DEL ROSARIO GILABERT, David;
ESQUIVA SOBRINO, Gema;
GÓMEZ VICENTE, María Violeta y
HERNÁNDEZ POZO, Miguel

(74) Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

(54) Título: **Dispositivo biocompatible de control vibroacústico**

ES 1 331 827 U

DESCRIPCIÓN

Dispositivo biocompatible de control vibroacústico

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención pertenece al sector biológico y más concretamente al ámbito del cultivo celular y a la manipulación o procesado de cultivos en general.

El objeto de la presente invención es un dispositivo vibroacústico biocompatible que proporciona una forma cómoda, rápida y segura de reducir el estrés mecánico en muestras biológicas, mejorando la confiabilidad en ensayos de dinámica celular. Es aplicable en varios contextos, como puede ser incubadoras, campanas de seguridad biológica, especialmente campanas de flujo laminar, o cualquier lugar donde la muestra esté en un ambiente con ruido o vibración.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El ruido es una presencia constante en todos los aspectos de la vida moderna. En la actualidad, existe un consenso generalizado en la comunidad científica sobre el impacto negativo que la exposición continua al ruido tiene en la salud física y mental de las personas (Bistrup, 2003 [2]; Bradley & Lang, 2000 [3]; Münzel et al., 2018 [6]). No obstante, el ruido, debido a su naturaleza de onda mecánica, también ejerce una influencia directa sobre procesos fundamentales a nivel celular (Kumeta et al., 2018 [4]; Nikukar et al., 2013 [8]).

La mecanobiología es una disciplina emergente dedicada al estudio de la dinámica celular frente a diversos estímulos mecánicos, incluyendo las ondas acústicas audibles (Ambattu & Yeo, 2023 [1]; Kumeta et al., 2018 [4]; Nikukar et al., 2013 [8]). Los procesos de mecanotransducción promovidos por estos estímulos desempeñan un papel crucial en la regulación de la homeostasis celular, siendo determinantes en aspectos tan relevantes para la medicina como la cicatrización de heridas, enfermedades neurodegenerativas o el cáncer (Lei et al., 2023 [5]; Tassinari et al. [9], 2023; Tortorella et al., 2022 [10]). Diversos estudios en el campo de la mecanobiología evidencian la influencia del ruido sobre la dinámica celular (Kumeta et al., 2018 [4]; Navarro-Fernández, 2010 [7]).

Al mismo tiempo, las incubadoras de cultivos celulares son un equipo esencial en los laboratorios biológicos que mantienen constantes las condiciones óptimas para el crecimiento y la dinámica celular a partir de sistemas de regulación (Triaud et al., 2003 [11]). Dichos sistemas de regulación emplean actuadores electromecánicos, sistemas de

ventilación, las válvulas y los compresores que dan lugar a vibraciones y ruido acústico audible que pueden interferir en la confiabilidad de los estudios de dinámica celular en incubadoras de cultivo convencionales.

Por lo tanto, los sistemas de regulación afectan a las muestras, pero dependen del equipo concreto utilizado. Esto reduce la reproductibilidad de los estudios, dado que cada laboratorio tiene equipos diferentes o incluso define formas diferentes de mantener las condiciones del ensayo. Es necesario reducir esta variabilidad, pero el solicitante no conoce ningún dispositivo que proteja las muestras celulares del ruido generado por las incubadoras y otros aparatos, quedando los cultivos expuestos a sus efectos.

[1] Ambattu, L. A., & Yeo, L. Y. (2023). Sonomechanobiology: Vibrational stimulation of cells and its therapeutic implications. *Biophysics Reviews*, *4*(2), 21301. https://doi.org/10.1063/5.0127122/2884904

[2] Bistrup, M. L. (2003). Noise and Health. *Noise and Health*, *5*(19), 59. https://www.noiseandhealth.org/article.asp?issn=1463-1741;year=2003;volume=5;issue=19;spage=59;epage=64;aulast=Bistrup

[3] Bradley, M. M., & Lang, P. J. (2000). Affective reactions to acoustic stimuli. *Psychophysiology*, *37*(2), 204–215. https://doi.org/10.1111/1469-8986.3720204

[4] Kumeta, M., Takahashi, D., Takeyasu, K., & Yoshimura, S. H. (2018). Cell type-specific suppression of mechanosensitive genes by audible sound stimulation. *PLOS ONE*, *13*(1), e0188764. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0188764

[5] Lei, Z., Jiang, H., Liu, J., Liu, Y., Wu, D., Sun, C., Du, Q., Wang, L., Wu, G., Wang, S., & Zhang, X. (2023). Audible Acoustic Wave Promotes EV Formation and Secretion from Adherent Cancer Cells via Mechanical Stimulation. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *15*(46), 53859–53870. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.3C13845/SUPPL_FILE/AM3C13845_SI_001.PDF

[6] Münzel, T., Schmidt, F. P., Steven, S., Herzog, J., Daiber, A., & Sørensen, M. (2018). Environmental Noise and the Cardiovascular System. *Journal of the American College of Cardiology*, *71*(6), 688–697. https://doi.org/10.1016/J.JACC.2017.12.015

[7] Navarro-Fernández, N. (2010). *Caracterización y cuantificación de la influencia de la música como agente físico sobre el comportamiento de células madre neurales embrionarias en cultivo* [Universidad de Valladolid]. https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=295435&info=resumen&idioma=SPA

[8] Nikukar, H., Reid, S., Tsimbouri, P. M., Riehle, M. O., Curtis, A. S. G., & Dalby, M. J. (2013). Osteogenesis of mesenchymal stem cells by nanoscale mechanotransduction. *ACS Nano*, *7*(3), 2758–2767. https://doi.org/10.1021/NN400202J

[9] Tassinari, R., Olivi, E., Cavallini, C., Taglioli, V., Zannini, C., Marcuzzi, M., Fedchenko, O., & Ventura, C. (2023). Mechanobiology: A landscape for reinterpreting stem cell heterogeneity and regenerative potential in diseased tissues. *IScience*, *26*(1), 105875. https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2022.105875

[10] Tortorella, I., Argentati, C., Emiliani, C., Morena, F., & Martino, S. (2022). Biochemical Pathways of Cellular Mechanosensing/Mechanotransduction and Their Role in Neurodegenerative Diseases Pathogenesis. *Cells*, *11*(19). https://doi.org/10.3390/CELLS11193093

[11] Triaud, F., Clenet, D. H., Cariou, Y., Neel, T. Le, Morin, D., & Truchaud, A. (2003). Evaluation of Automated Cell Culture Incubators. *SLAS Technology*, *8*(6), 82–86. https://doi.org/10.1016/S1535-5535(03)00018-2

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

La invención permite mejorar la reproductibilidad y confianza en los ensayos, para lo que incorpora un dispositivo biocompatible de control de ruido y vibraciones. Este dispositivo comprende un recipiente capaz de reducir los niveles de ruido generado por las incubadoras tradicionales, aumentando la confiabilidad en estudios de dinámica celular de una forma cómoda, rápida y segura.

Las ventajas principales de la invención se resumen como sigue:

- Reduce el estrés mecánico a nivel celular al atenuar el ruido aéreo y de impacto sobre la placa de cultivo.
- Reduce las transmisiones vibratorias al desacoplar la placa de cultivo de la estructura de la incubadora.
- Mejora la homogeneidad de las condiciones ambientales al reducir fluctuaciones y variaciones vibroacústicas en el entorno celular. Por lo tanto se independiza el resultado de los ensayos de los equipos utilizados y de su configuración.
- Incrementa la consistencia y la reproductibilidad de los experimentos de dinámica celular, minimizando los fenómenos de enmascaramiento causados por la energía vibroacústica ambiental.

- Mejora la sensibilidad en ensayos de dinámica celular y molecular, al reducir el estrés mecánico que el ruido de fondo de la incubadora ejerce sobre la muestra biológica.
- Optimiza el espacio disponible al permitir su apilado. Este apilado de diferentes dispositivos a su vez aumenta el área de absorción acústica equivalente y da lugar a una reducción mayor del estrés celular global.

El dispositivo biocompatible de control vibroacústico es utilizable en procedimientos de incubación y procesado de muestras, en uno o más contenedores dentro de una incubadora. Así, en una incubadora, y a modo de explicación, el procedimiento habitual tiene las fases de siembra, incubación, experimentación y procesado de muestras. Además comprende una etapa de inserción del contenedor con las muestras en el dispositivo biocompatible de control vibroacústico. Este dispositivo está formado por un recipiente con una base interior para las muestras, el cual tiene unos medios de acceso al interior del recipiente, unos medios de soporte sobre la superficie interior de la incubadora y unos medios de regulación ambiental que incluyen perforaciones en las paredes del recipiente. Con ello, la incubación de las muestras se realiza dentro del dispositivo biocompatible de control vibroacústico.

La invención se refiere también al uso del dispositivo.

El dispositivo biocompatible de control vibroacústico comprende un recipiente para las muestras, unos medios de acceso al interior, unos medios de soporte y unos medios de regulación ambiental, formados principalmente por perforaciones en el cuerpo principal y en los medios de acceso, así como el material en el que están constituidos. Se puede también situar medios de regulación ambiental en las paredes laterales.

El cuerpo principal está constituido de material con un comportamiento acústico óptimo, especialmente en el espectro audible aunque otros rangos de frecuencias pueden ser ventajosos. Es decir, con un coeficiente de absorción acústica entre 0,5 y 0,99. Un ejemplo es el panel comercializado bajo la marca comercial ECOcero panel. Por ejemplo, un ejemplo de coeficientes de absorción son 0,52 a 500 Hz, 0,72 a 1 KHz 0,99 a 4KHz.

Según el uso, el material puede ser necesariamente biocompatible para asegurar que se mantienen en todo momento las condiciones de esterilidad, incluso con contactos accidentales. Es decir, un material que tenga una baja liberación de compuestos orgánicos volátiles, antifúngico. Un ejemplo es el material “ECOcero panel” de la empresa ECOcero (España). Se trata de un estructura hueca o recipiente con una base plana sobre la que se

deposita la placa de cultivo y puede tener diferentes secciones o plantas, pero siendo rectangular o cuadrada la solución preferida.

Los medios de soporte se integran con el cuerpo principal y tienen por objeto desacoplar el dispositivo vibroacústicamente de la estructura de la incubadora u otro equipo que lo contiene.

Los medios de regulación ambiental comprenden perforaciones u orificios pasantes. Su función principal es promover el equilibrio termodinámico e intercambio de gases entre el dispositivo objeto de la invención y la incubadora.

En una realización preferente, el grosor de las paredes, medios de acceso y paredes del recipiente puede variar entre 5 mm y 20 cm. A mayor grosor del cuerpo principal mayor coeficiente de absorción y menor estrés biológico en el interior.

En otra realización preferente, el cuerpo principal puede adoptar forma de cubo, prisma rectangular, pirámide de base cuadrada o triangular, truncada o no, cono, cilindro, prisma triangular, tetraedro, dodecaedro, octaedro o cualquier otra configuración que pueda apoyarse de forma estable en la superficie interior del equipo.

En otra realización preferente, los medios de acceso pueden tener un área de entre un 5 % y un 100 % de la superficie de la base.

En otra realización preferente, los medios de acceso al recipiente pueden ser de una pieza o de varias que dejan acceso a partes diferentes del recipiente, su independencia del cuerpo principal puede ser parcial (abisagrado) o total (desmontables) y el cierre de los medios de acceso puede realizarse mediante machihembrado, adhesivo, ensamblaje por enclavamiento, tornillos, tuercas, soldadura, ranura, lengüetas, velcro, clips u otro tipo de sujeciones.

En otra acción preferente la superficie de los medios de soporte en contacto con la incubadora puede oscilar entre un 1% y un 100% de la planta del dispositivo. Cuanto menor sea dicha superficie, menor transmisión vibratoria entre el dispositivo objeto de la invención y la estructura de la incubadora. En consecuencia, menor estrés mecánico en la muestra biológica.

En otra realización preferente las perforaciones abarcan entre el 1% y el 40% de la superficie de la base y de los medios de acceso, pudiendo adoptar distintas configuraciones en términos de número, localización y forma. El número de perforaciones oscila entre una perforación que represente el 1% del área total y un número indeterminado tal que la suma

total de las superficies de las perforaciones sea inferior al 40% del área total del dispositivo objeto de la invención. La localización de los medios de regulación ambiental puede distribuirse en cualquier superficie del dispositivo biocompatible de control de ruido objeto de la invención. La forma de los medios de regulación ambiental puede emplear cualquier geometría conocida siempre que cumpla las condiciones superficiales expuestas. La relación entre los medios de regulación ambiental y la superficie total del dispositivo objeto de la invención determinará el área de absorción total, influyendo en el estrés mecánico en la muestra biológica. Idealmente las perforaciones son laberínticas, con curvas y/o quiebros, para que limitar la entrada de sonido.

En otra realización preferente el cuerpo principal, los medios de acceso, los medios de soporte, las paredes laterales pueden tratarse de elementos independientes y ensamblarse mediante machihembrado, adhesivo, ensamblaje por enclavamiento, tornillos, tuercas, soldadura, ranura, lengüetas, velcro, clips u otro tipo de sujeciones. Igualmente pueden estar fabricados en una pieza indivisible.

En última instancia, también puede contemplarse otra realización preferente incorporando un sistema de control activo para atenuar selectivamente una banda concreta del espectro en el interior del dispositivo objeto de la invención. Este control activo utilizaría transductores electroacústicos, pudiendo seleccionar la banda con la configuración o ajuste de éstos.

El dispositivo permite que las muestras biológicas se conserven en las placas o contenedores adecuados, aislados del ruido y de las vibraciones, para el estudio de la dinámica celular.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para complementar la descripción realizada y con objeto de facilitar la comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción un juego de figuras en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La figura 1 muestra una vista en perspectiva de un ejemplo del dispositivo objeto de la invención.

La figura 2 muestra una vista de despiece de la realización de la figura 1.

La figura 3 muestra una vista en perspectiva del dispositivo de la figura 1 con el medio de acceso abierto.

La figura 4 muestra una vista lateral del dispositivo de la figura 1 con el medio de acceso abierto.

La figura 5 muestra una vista de la cara inferior del dispositivo de la figura 1.

EXPOSICIÓN DETALLADA DE UNOS MODOS DE REALIZACIÓN

A la vista de las figuras citadas, y de acuerdo con la numeración adoptada, se puede observar en ellas un ejemplo de realización preferente de la invención, la cual comprende las partes y elementos que se indican y describen en detalle a continuación.

El dispositivo de la invención se introduce en una incubadora o equipo manipulación o procesado correspondiente, y es utilizado en procedimientos de incubación y manipulación o procesado donde se coloca unas muestras celulares en un contenedor, como una placa de Petri, y éste en el dispositivo biocompatible de control vibroacústico.

En las figuras 1 a 5 se observa una posible realización preferente del dispositivo objeto de la invención. Está compuesto por un recipiente (1), preferiblemente de base rectangular para optimizar el espacio en los equipos (incubadoras…). En la realización, el recipiente (1) está formado por un cuerpo principal (2) con forma general de U y dos placas laterales (3), dejando una abertura superior donde se coloca una tapa o medio de acceso (4) superior. El cuerpo principal (2) y las placas laterales (3) se pueden ensamblar mediante lengüetas (10) que encajan en ranuras (11).

El medio de acceso (4) superior tiene un tirador (7) que encaja en una hendidura (8) de cierre que lo retiene por fricción. El interior del recipiente (1) comprende una base (9) de colocación de las muestras. La tapa (4) y la base (9) tienen perforaciones (6) para comunicar el contenido del dispositivo con el ambiente exterior, de forma que se promueve el equilibrio termodinámico e intercambio de gases entre el dispositivo objeto de la invención y la incubadora. La base (9) está separada de la superficie de apoyo por unas patas o medios de soporte (5) que desacoplan la base (9) de la vibración de la superficie de apoyo. Este desacoplamiento puede partir de la reducción de superficie de contacto con la incubadora o el suelo de la campana, pero también pueden disponerse capas elásticas en el contacto con la superficie de apoyo para mejorar el aislamiento.

Con esta realización preferente, la reducción de energía acústica incidente sobre la placa de cultivo en el interior del dispositivo objeto de la invención es de 20 dB a 500 Hz, 31 dB a 1 KHz y 48 dB a 5 KHz para una medida estándar de señal a ruido aéreo (MLS). Al mismo tiempo, en un ensayo de dinámica celular se obtienen diferencias significativas para la

misma línea celular y condiciones de siembra/incubación ($p<0.001$), con una media de 0,735±0,100 y 0,644±0,183 para una placa de cultivo dispuesta en el interior del dispositivo objeto de la invención y la bandeja de la incubadora respectivamente.

La realización preferente que logra los resultados expuestos es un dispositivo de material ECOcero con una anchura total de 148,00 mm, un cuerpo principal (2) de 124,00 mm y 12,00 mm de grosor. Sus lengüetas (10) y ranuras (11) miden 20,00 mm de ancho. La altura total de la placa lateral (3) es de 85,50 mm. Ésta se compone de unos medios de soporte (5) de 12,50 mm con un corte de radio de 5,00 mm y un cuerpo principal (2) con 63,00 mm de alto. La tapa (4) tiene una extensión de 170,00 mm y el largo total de la realización preferente es de 194,00 mm. Las perforaciones de la tapa (6) y de la base (9) tienen un diámetro de 6,89 mm, un grosor de 12,00 mm y están distribuidos uniformemente.

Se describe a continuación un ensayo de proliferación celular:

Se sembraron células de la línea 661W en la placa de cultivo, que posteriormente se introdujo en el dispositivo objeto de la invención. Dicha línea celular, amablemente cedida por el Dr. Muayyad Al-Ubaidi de la Universidad de Oklahoma (EE. UU.), procede de una retina murina transgénica y muestra la expresión de marcadores de fotorreceptores y marcadores de células ganglionares de la retina (Sayyad et al., 2017; Tan et al., 2004).

Antes de cada ensayo, las células se sembraron a una densidad de 100.000 células por matraz y se incubaron a 37 ºC con un 5% de CO2. El medio empleado fue Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) compuesto por 4,5 g/L de glucosa, suplementado con 2 mM de L-Glutamina, penicilina/estreptomicina y 10% (v/v) de suero bovino fetal inactivado por calor.

La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo de violeta de cristal (Mickuviene et al., 2004). Las células se sembraron en placas estériles de poliestireno de 96 pocillos (SPL Life Sciences, Pocheon-si, Corea del Sur) a una densidad de 3.000 células por pocillo (40 réplicas) y se incubaron durante 24 horas (Tuohy et al., 2002). Posteriormente, las placas se colocaron en la incubadora (incubadora de CO2 FormaTM Steri-CycleTM modelo 371, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EE.UU.) donde se mantuvieron durante 72 horas. El estudio se realizó bajo dos condiciones experimentales: (i) la condición de "control", donde las muestras biológicas estaban expuestas al ruido generado por los sistemas y actuadores electromecánicos dentro de la incubadora (Triaud et al., 2003), y (ii) la condición de "caja", en la cual las muestras biológicas se colocaron dentro del dispositivo objeto de esta invención. Se realizaron 3 réplicas independientes.

Las células se fijaron utilizando etanol al 96% (v/v) durante 10 minutos, y posteriormente se tiñeron con una solución de violeta cristal al 0,05% (p/v) en etanol al 20% (v/v) durante 30 minutos. A continuación, las placas se sometieron a tres lavados consecutivos con agua destilada. Se secaron al aire a temperatura ambiente en un ambiente protegido de la luz. Para disolver el colorante, se introdujeron 100 µL de etanol al 50% (v/v) y una solución de ácido acético al 0,1% (v/v) en cada pocillo de una placa y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Por último, se transfirió el sobrenadante a una placa estéril de 96 pocillos y se cuantificó la absorbancia utilizando un espectrofotómetro (AD 340 Microplate Reader, Beckman Coulter, Brea, CA, EE.UU.) a una longitud de onda de 620 nm.

En cuanto a los resultados se refiere, los valores de absorbancia en las condiciones de «control» y «caja» fueron de 0,571 ± 0,174 y 0,690 ± 0,153 respectivamente. Se comprobó la normalidad muestral mediante Kolmogorov-Smirnov y las varianzas se compararon con una prueba t de dos muestras arrojando resultados estadísticamente significativos (**p<0,0001). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto un aumento de la proliferación celular estadísticamente significativa respecto de la condición «caja» respecto a «control».

Las mediciones acústicas se llevaron a cabo utilizando un ordenador portátil con el software ARTA (versión 1.9.1) conectado a una tarjeta de adquisición TASCAM 144 mk2 y a un acondicionador de señal CCLD de 2 canales Brüel&Kjaer Tipo 1704-A-002 que alimentaba un micrófono Brüel&Kjaer Tipo 4188-A-21. Un altavoz Bose SoundLink Color II suspendido en una percha dentro de la incubadora sirvió como fuente acústica. En última instancia, el estímulo empleado fue una señal de Secuencia de Longitud Máxima (MLS), y se registró el Nivel de Presión Sonora.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo biocompatible de control vibroacústico, caracterizado por que está formado por un recipiente (1) con una base (9) interior para las muestras, con unos medios de acceso (4) al interior del recipiente (1), unos medios de soporte (5) y unos medios de regulación ambiental que incluyen perforaciones (6) en las paredes del recipiente.

2. Dispositivo biocompatible de control vibroacústico, según la reivindicación 1 caracterizado por que los medios de regulación ambiental están dispuestos en la base (9) y los medios de acceso (4).

3. Dispositivo biocompatible de control vibroacústico, según la reivindicación 1, caracterizado por que las perforaciones (6) son laberínticas.

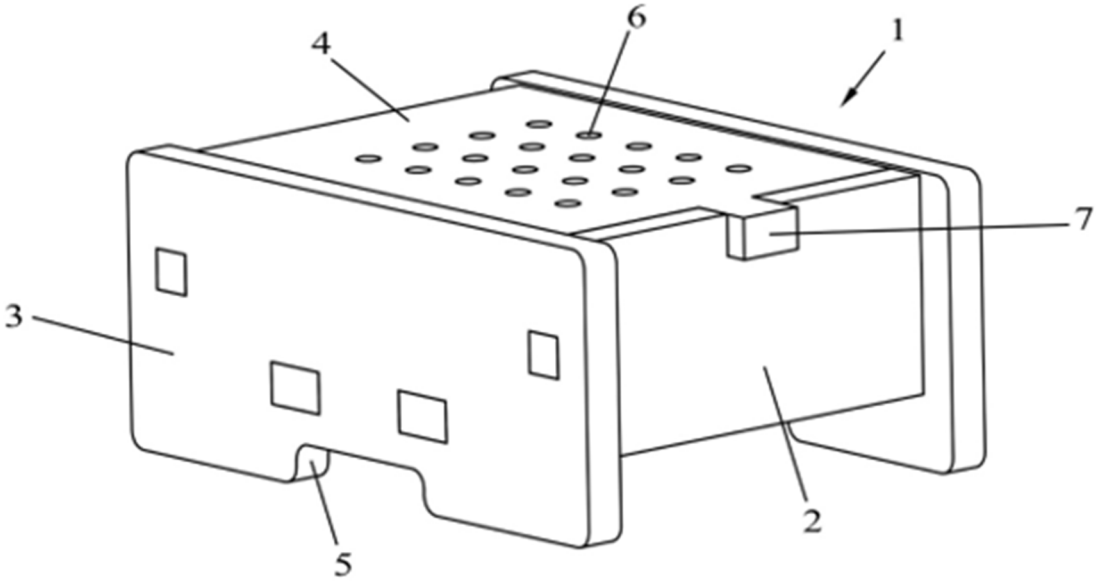


FIG. 1

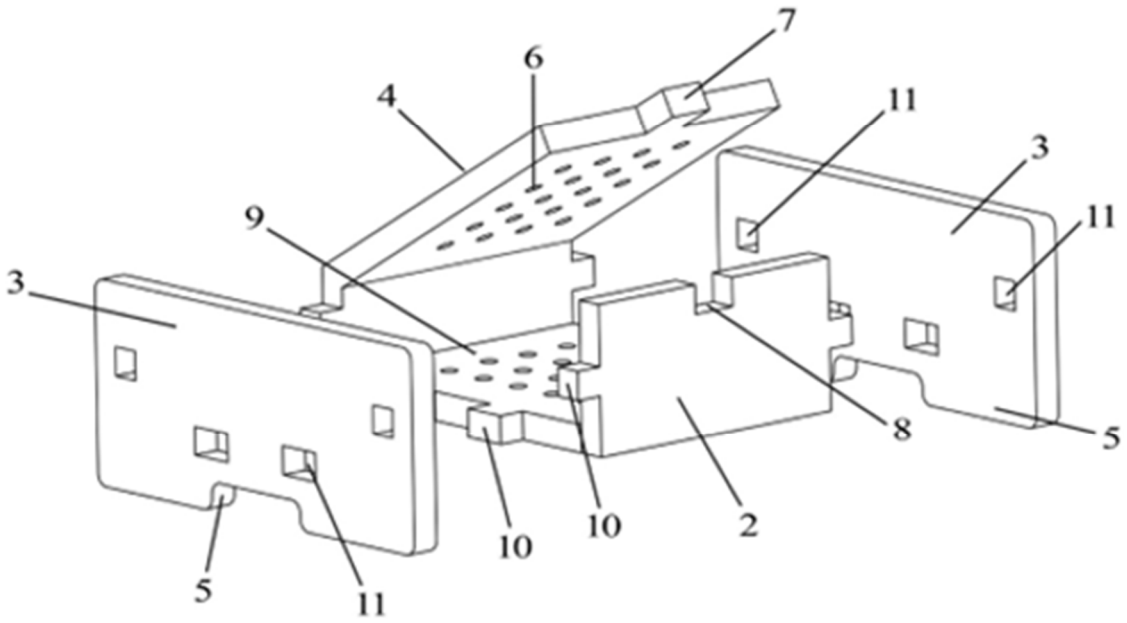


FIG. 2

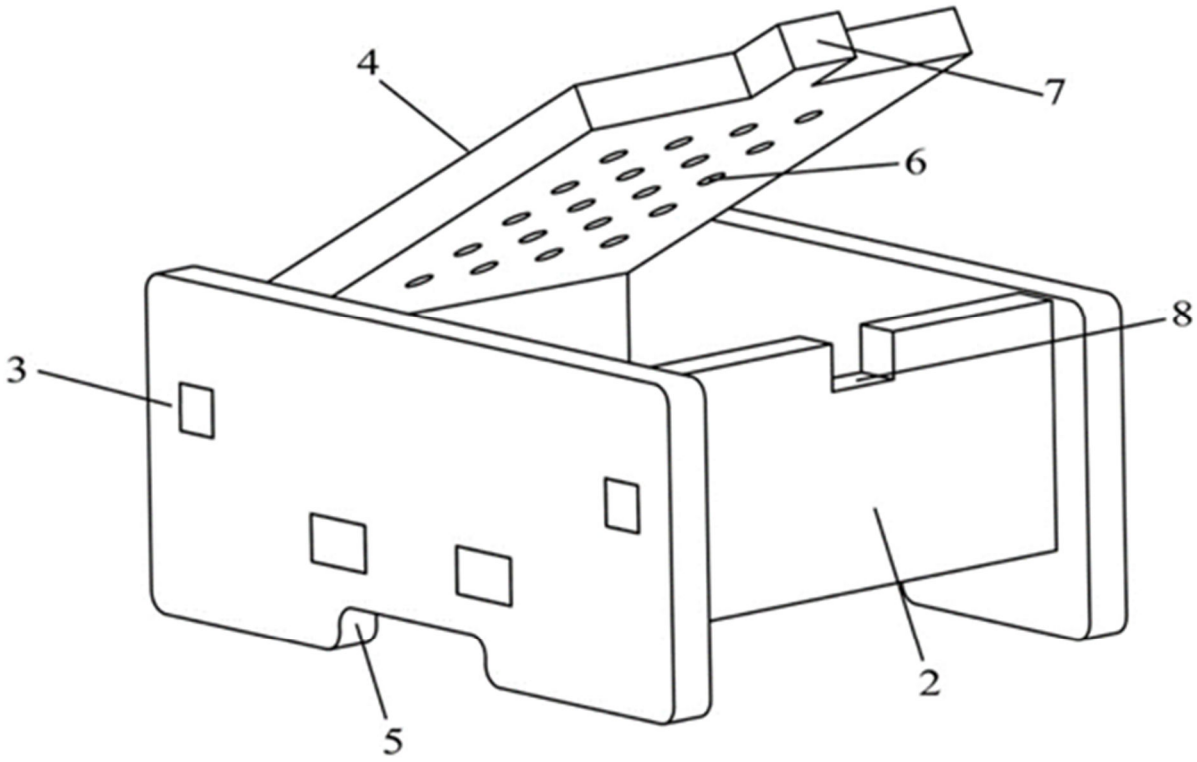


FIG. 3

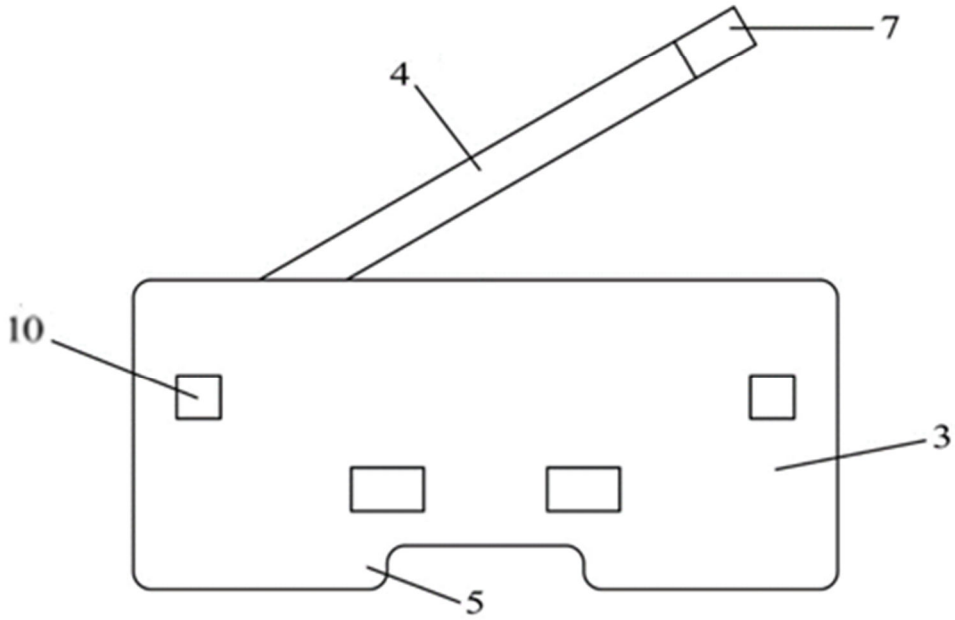


FIG. 4

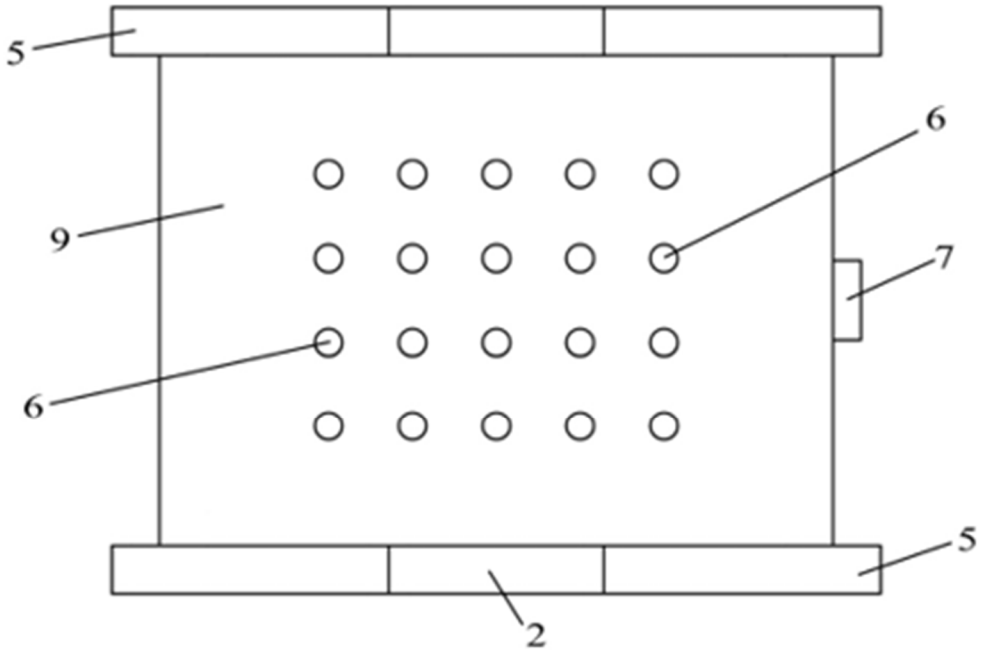


FIG. 5