

Trabajo Fin de Grado

Ingeniería de las Tecnologías Industriales

Enfriamiento mediante el seguimiento de la curva de equilibrio termodinámico y recalentamiento basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad, de aplicación en la conservación de material biológico a bajas temperaturas

Autora: Adriana Puentes González-Amor

Tutor: Ramón Risco Delgado

Dpto. Física aplicada III
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2021



Proyecto Fin de Carrera
Ingeniería de la Tecnologías Industriales

*Enfriamiento mediante el seguimiento de la curva de equilibrio
termodinámico y recalentamiento basado en ultrasonidos
focalizados de alta intensidad, de aplicación en la conservación
de material biológico a bajas temperaturas*

Autora:

Adriana Puentes González-Amor

Tutor:

Ramón Risco Delgado

Profesor titular

Dpto. de Física aplicada III
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2021

Proyecto Fin de Carrera: Enfriamiento mediante el seguimiento de la curva de equilibrio termodinámico y recalentamiento basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad, de aplicación en la conservación de material biológico a bajas temperaturas

Autora: Adriana Puentes González-Amor

Tutor: Ramón Risco Delgado

El tribunal nombrado para juzgar el Proyecto arriba indicado, compuesto por los siguientes miembros:

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

Sevilla, 2021

El Secretario del Tribunal

Agradecimientos

En primer lugar y, ante todo, debo expresar toda mi gratitud a mis compañeros de laboratorio que me han acompañado en esta larga pero emocionante aventura: Enrique Alcalá, Laura Encabo, Fátima Barroso y Pablo Barroso. Siempre estuvieron presentes para resolver las dudas que pudieran surgirme y ayudarme a lidiar con los centenares de problemas que inevitablemente surgen en el día a día del trabajo experimental. Sin su apoyo y conocimiento, este proyecto no hubiera salido a flote.

Por otro lado, agradecer a Ramón Risco la oportunidad de participar en este interesante proyecto y transmitirme su pasión y dedicación por la materia.

Finalmente, dar gracias a mi familia y amigos quienes, a pesar de haber sido un duro año de pandemia y restricciones, han conseguido hacerlo más liviano con su cariño y compañía.

Adriana Puentes González-Amor

Sevilla, 2021

Resumen

En el presente proyecto se plantean dos vías de investigación complementarias en el estudio de la criopreservación de material biológico. En este caso, el papel de este material biológico lo juegan los nematodos *C. elegans*, unos microscópicos gusanos de tierra que protagonizan numerosas investigaciones en el campo de la medicina y que poseen la particular capacidad de poder ser criogenizados con considerable facilidad siguiendo métodos bien establecidos. No obstante, el porcentaje de supervivencia hasta ahora observado ha sido siempre inferior al 50% en el empleo de los métodos tradicionales, es por ello que aquí se presentan nuevas técnicas para su criopreservación, así como los resultados y conclusiones de los experimentos.

Una de ellas, se centra en el enfriamiento de *C. elegans* mediante el seguimiento de la línea de liquidus del anticongelante empleado hasta temperaturas en torno a los $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ donde las membranas de las células dejan de ser permeables y el metabolismo de estos seres vivos se reduce drásticamente. Este método es conocido como Liquidus Tracking y ya ha sido practicado en numerosas células animales e incluso órganos, aunque nunca en organismos completos como los *C. elegans*.

La otra vía se ha centrado en el recalentamiento de estos nematodos por medio de ultrasonidos focalizados de alta intensidad. Esta técnica se augura capaz de permitir el recalentamiento a altas velocidades impidiendo fenómenos indeseados como la recristalización o la desvitrificación y resulta prometedora para tal fin.

Abstract

This project proposes two complementary approaches in the study of the cryopreservation of biological material. In this case, the role of this biological material is played by the nematodes *C. elegans*, microscopic earthworms that are at the centre of numerous research projects in the field of medicine and which have the particular ability to be cryopreserved with considerable ease following well-established methods. However, the survival rate so far observed has always been less than 50% using traditional methods, which is why new techniques for cryopreservation, as well as the results and conclusions of the experiments, are presented here.

One of them focuses on the cooling of *C. elegans* by monitoring the liquidus line down to temperatures of around -25°C where the cell membranes are no longer permeable and the metabolism of these living organisms is drastically reduced. This method is known as Liquidus Tracking and has already been practised on numerous animal cells and even organs, although never on whole organism such as *C. elegans*.

The other route has focused on the rewarming of these nematodes by means of high-intensity focused ultrasound. This technique is expected to allow reheating at high speeds, preventing undesirable phenomena such as recrystallization or devitrification, and is promising for this purpose.

Agradecimientos	vii
Resumen	ix
Abstract	xi
Índice	xiii
Índice de Figuras	xv
1 Introducción y conceptos teóricos	19
1.1. <i>Situación actual de la criopreservación de órganos</i>	19
1.2. <i>Objetivo del proyecto</i>	20
2 Conceptos teóricos	23
2.1. <i>Justificación del empleo de microorganismos C-elegans</i>	23
2.2. <i>Agente crioprotector</i>	25
2.3. <i>Método de enfriamiento por slow freezing</i>	27
2.4. <i>Método de vitrificación por liquidus tracking</i>	28
2.5. <i>Método de recalentamiento por ultrasonidos</i>	31
3 Fase experimental	34
3.1 <i>Método de recalentamiento por HIFU de C. elegans con previo enfriamiento por slow-freezing</i>	34
3.1.1 <i>Preparación y visualización del set-up</i>	34
3.1.1.1. <i>Estudio de la ubicación del foco: 3 vías</i>	
3.1.1.2. <i>Placas Petri</i>	
3.1.1.3. <i>Set-up final</i>	
3.1.2 <i>Preparación de las placas y congelación por slow-freezing</i>	46
3.1.3 <i>Recalentamiento con disparos a distintas potencias</i>	48
3.2 <i>Método de criopreservación de C. elegans mediante Liquidus tracking</i>	50
3.2.1 <i>Preparación del set-up</i>	50
3.2.1.1. <i>Biocool</i>	
3.2.1.2. <i>Elección de la pajueta como medio donde confinar los C. elegans</i>	
3.2.1.3. <i>Descripción de las herramientas adicionales ideadas para el set-up</i>	

3.2.2	<i>Descripción del experimento paso a paso</i>	57
3.2.3	<i>Proceso de lavado de C. elegans</i>	62
4	Resultados	64
4.1	<i>Resultados de los experimentos realizados con HIFU</i>	64
4.2	<i>Resultados de los experimentos realizados por Liquidus Tracking</i>	66
5	Conclusiones y líneas futuras	68
	Referencias	71

ÍNDICE DE FIGURAS

1 – Gráfica que representa la línea de liquidus de la solución H ₂ O-NaCl-Glycerol para una solución con ratio (R') H ₂ O / NaCl dado	12
2 - Diagrama de fases de la solución H ₂ O-Glicerol.	14
3 - Gráfica que representa la línea de liquidus de la solución H ₂ O-NaCl-Glycerol para una solución con ratio (R') H ₂ O / NaCl dado	15
4 - Foto de un criovial del laboratorio	16
5 - Izquierda: caja de porexán cerrada. Centro: interior de la caja con bloques que mantienen el frío. Derecha: interior aislado con plásticos y otros materiales para garantizar una velocidad de enfriamiento inferior a 1°C/min	16
6 - Diagrama de fases de una solución H ₂ O-Me ₂ SO. La línea gruesa representa la curva de liquidus	18
7 - Diagrama de fases de una solución H ₂ O-Me ₂ SO. La banda azul en torno a la línea de liquidus representa el espacio seguro en el que moverse durante la adición de crioprotector en el método de Liquidus tracking	19
8 - Imagen del transductor parabólico hecho de cerámica piezoeléctrica	20
9 - Imagen del sistema de HIFU completo, de izquierda a derecha: transductor, generador de onda, fuente de tensión	20
10 - Esquema del funcionamiento del transductor de HIFU utilizado	23
11 - Transductor sujetado con la garra construida a medida con la misma impresora 3D que lo sujeta	24
12 - Papel termosensible en el fondo del vaso de precipitado	25
13 - Set-up final para la determinación del foco según el impacto en el papel termosensible desde distintas distancias a lo largo del eje vertical (Z)	25
14 - Croquis del experimento: se modifica la altura del transductor a lo largo del eje Z para identificar la posición real del foco según qué altura produjo mayor impacto en el papel termosensible	26
15 - Imágenes del papel termosensible tras los disparos de HIFU a distintas alturas	27
16 - Disposición de la cámara del bolómetro en el set-up	28
17 - Imagen tomada con el bolómetro desde distintas distancias	28
18 - Efecto termoeléctrico	30
19 - Placas de Petri usadas en el laboratorio	32
20 - Placa petri con molde de agar en su interior y precintada con parafina	32
21 - Imagen tomada de la interfaz de trabajo del software Autodesk Fusion 360. Diseño del soporte	33
22 - Proceso de colocación de soporte y el transductor en el baño de etilenglicol para disparar a la placa	34
23 - Placas Petri después de haber vertido el agar en proceso de reposo hasta que este se solidifique	35
24 - Curva de enfriamiento de las placas de Petri con moldes de agar y una solución de S. Buffer con 15% de glicerol en el centro	35
25 - Curva de recalentamiento seguidas por los C. elegans durante el disparo con los HIFU a distintos voltajes (y por tanto potencias)	37
26 - Fotografía del Biocool utilizado en el laboratorio. Se indican con flechas las partes de este	39
27 - Criovial y pajueta	40

28 - Pajuela insertada en un trozo de espuma de polietileno que funciona a modo de flotador	41
29 - Punta de pipeta amarilla con extensión a base de pegarle una pajuela de diámetro fino en su origen	42
30 - Detalle del baño de etanol del Biocool en el que se enfrían las muestras	42
31 - Evolución térmica del experimento de Liquidus tracking sacando la pajuela del baño para añadir el anticongelante	43
32 - Pajuela introducida en tubo de ensayo con el líquido del baño en su interior para evitar su calentamiento durante la adición de anticongelante	44
33 - Evolución térmica del experimento de Liquidus tracking sacando la pajuela del baño para añadir el anticongelante utilizando el sistema del tubo de ensayo para mantener el frío	45
34 - Diagrama de fases glicerol-agua. Los puntos rojos indican la concentración y temperatura inicial y final. La línea verde gruesa indica la evolución seguida por la solución de gusanos durante todo el experimento.	46
35 - Script de Matlab para el cálculo de volúmenes de glicerol al 80% que deben añadirse durante el Liquidus tracking	47
36 - Set-up inicial. A la derecha, el display del Biocool marcando la temperatura del baño (temperatura inicial). En el baño están introducidos la pajuela y el tubo de centrifuga	48
37 - Pajuela líquida vs pajuela congelada	49
38 - Imagen tomada del microscopio: C. elegans con aspecto deshidratado tras los disparos con HIFU a 50V y tiempos de exposición entre 30 y 50 segundos	53

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Situación actual de la criopreservación de órganos

La línea de investigación en la que se sitúa este proyecto nace de una necesidad planteada recientemente por numerosas instituciones de la creación de un *banco de órganos*. El posible almacenamiento de órganos a corto y largo plazo para su posterior trasplante es un reto científico cuya superación supondría un enorme avance para la medicina mundial. Según la Organización Mundial de la Salud, solo el 10 % de los pacientes necesitados de trasplantes en el mundo reciben finalmente un órgano. Se ha calculado que, si existiera ese hipotético banco de órganos con el que se subsanaran todos los problemas de suministro a personas necesitadas, se evitarían más del 30 % de las muertes en los EEUU. Los datos son peores en países más desfavorecidos, por ejemplo, el continente de África aloja al 16 % de la población mundial pero solo realiza el 0.5 % de los trasplantes. Los bancos de órganos y tejidos viables pueden transformar el tratamiento del cáncer para los pacientes jóvenes y tener un impacto dramático en la medicina de precisión y en la investigación de enfermedades como el cáncer y la enfermedad de Alzheimer [1]. El primer congreso mundial acerca de la creación de un banco de órganos (Organ Banking Summit 2015) tuvo lugar en febrero de 2015 en Palo Alto (California) donde participaron numerosas entidades como la Universidad de Stanford o la NASA. Así mismo, instituciones como la DARPA o el Instituto Nacional de Salud de los EEUU han puesto su punto de mira en la investigación hacia el almacenamiento a largo plazo de órganos criopreservados [2].

Para el cumplimiento de este gran objetivo, se plantean varias problemáticas que deben superarse. Se exponen seis áreas clave en las que centrar la atención científica para llegar al objetivo propuesto:

- Control de la formación excesiva de hielo en todas las etapas de criopreservación.
- Mantener la toxicidad del crioprotector en niveles aceptables (estos dependerán a su vez de la temperatura).
- Limitar la tensión mecánica excesiva en el material biológico.
- Controlar el daño por enfriamiento.
- Evitar niveles inaceptables de daño por isquemia.
- Asegurar un protocolo de recuperación y recalentamiento que garantice la supervivencia del órgano. [2]

Descubrimientos acerca de organismos modelo que pueden entrar en *animación suspendida* y posteriormente ser reanimados facilitan pruebas de principio sobre las que construir el avance hacia la criopreservación de órganos [2]. En esta idea basaremos la justificación de la utilización de microorganismos C-elegans en los experimentos. La naturaleza ha resuelto muchas dudas acerca de la viabilidad de la criopreservación de material biológico. Un ejemplo es la *rana de bosque*, este anfibio pasa su periodo de hibernación completamente congelado bajo las frías temperaturas de Alaska (donde se alcanzan fácilmente los -40°C). Este hecho sorprendió a la comunidad científica al ser consciente de los peligros de la congelación de seres vivos con la consecuente formación de hielo (véase el apartado 1.2 para una explicación más detallada). Al llegar el invierno, el hielo llena las cavidades del interior de los órganos de la rana y sus ojos se vuelven blancos debido a que sus lentes se congelan. Sin embargo, paralelamente, su hígado comienza a producir grandes cantidades de glucosa que se expanden hacia todas las células del cuerpo. Esta sustancia evita la formación de hielo intracelular y paraliza la salida de moléculas de agua del interior de estas y, por tanto, su deshidratación. Esta rana permanece en un estado de animación suspendida durante los meses de invierno, en ella no se detecta movimiento muscular, ni latido cardíaco, ni respiración. En primavera, la rana de bosque se descongela y vuelve a la vida sin daño orgánico alguno [3].

1.2 Objetivo del proyecto

A través de la experimentación con el microorganismo modelo (C-elegans) se pretende demostrar la viabilidad experimental de varios métodos de congelación y descongelación de órganos descritos teóricamente por la comunidad científica pero nunca antes llevados a cabo empíricamente en las condiciones que aquí se presentan. Estos son: proceso de enfriamiento por *liquidus tracking* en organismos C-elegans y el recalentamiento de estos organismos mediante ultrasonidos focalizados de alta densidad tras su congelación por *slow-freezing*.

Al congelar material biológico vivo surge una problemática principal: la formación de hielo tanto intracelular como extracelular, ambos casos amenazan la supervivencia del tejido. Por un lado, el crecimiento de hielo fuera de la célula provoca el aumento de la concentración de sales en las zonas no cristalizadas, sometiendo la célula a un proceso de ósmosis que la deshidrata al intentar igualar la concentración de soluto a ambos lados de la membrana plasmática. Por otro lado, la formación de hielo en el citosol (líquido que rellena el interior de la célula) presiona y perfora la pared celular, los orgánulos y el núcleo provocando su destrucción.

Para evitar este proceso, se recurre a la utilización de agentes crioprotectores, que evitan la formación de hielo en el medio de criopreservación del tejido. Estas sustancias se dividen en tres subgrupos: los azúcares (glucosa, sacarosa), los alcoholes (etilenglicol, glicerol, propanodiol, butanodiol, etanol, metanol) y el dimetilsulfóxido o DMSO [2,4]. En este caso, el agente empleado será el glicerol, cuya elección se justifica únicamente mediante razones históricas que se detallarán en apartados posteriores.

Para ello se divide el proyecto en dos experimentos diferenciables pero complementarios:

- Experimento con énfasis en el proceso de enfriamiento: vitrificación por líquidus tracking y posterior reanimación mediante lavado a temperatura ambiente.
- Experimento con énfasis en el recalentamiento: enfriamiento por slow-freezing (ya bien conocido y practicado por la comunidad científica) y posterior recalentamiento de los microorganismos mediante ultrasonidos focalizados de alta densidad.

2 CONCEPTOS TEÓRICOS

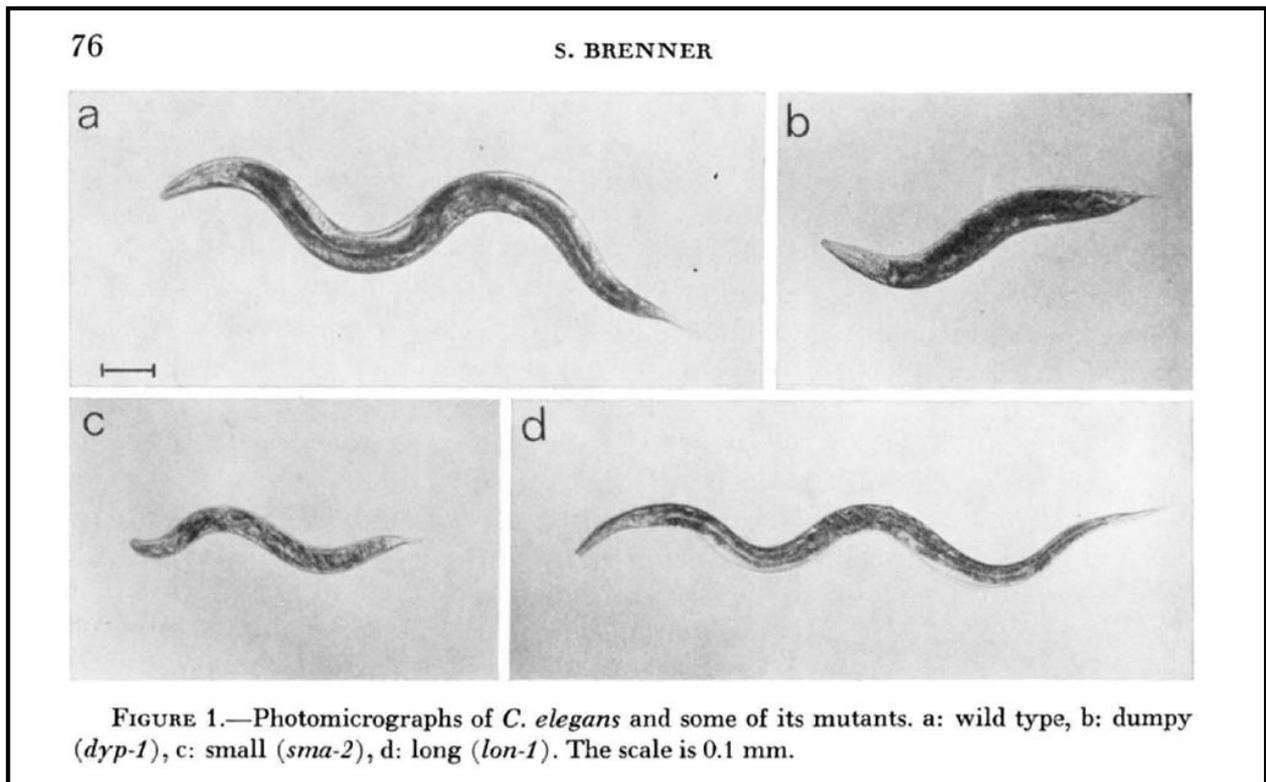
A lot of the things in science have been accomplished on the basis of ignorance, in the sense that you import into the science people from outside. Because once you have an established science, it has got its high priests — the guys who know everything that will work or won't work. And they don't want to be bothered. So you have to have a challenge. And the great thing is that young people are ignorant, and we should catch them before they turn into the priesthood. So I think that science should have a much more daring approach.

- Sydney Brenner -

En el presente apartado se pretende describir los distintos principios, métodos y elementos utilizados como base teórica fundamental para la realización de los experimentos. Así mismo, se justifican muchas de las decisiones tomadas en el transcurso de estos para alcanzar los fines esperados.

2.1 Justificación del empleo de microorganismos *C-elegans*

Los nematodos *Caenorhabditis elegans* son uno de los animales modelo más importantes usados en la investigación biológica. Tiene numerosas aplicaciones en campos como la medicina donde se emplean para realizar estudios de Parkinson, Alzheimer o incluso cáncer, así como para explorar la regulación del envejecimiento [8]. En 1973, Sydney Brenner realizó un estudio que establecía la base de la genética de este animal. Caracterizó un gran número de mutantes y desarrolló un método para su criopreservación que, a pesar de dar resultados bajos de supervivencia (en torno al 35 %) y solo aplicables a los estados larvarios L1 y L2, dio paso a una importante línea de investigación en torno a su capacidad de criopreservación [5]. Dentro de este propio departamento de investigación, Daniel Barranco et al. [8] han presentado un método por el cual era posible llevar estos nematodos a las temperaturas del nitrógeno líquido para después reanimarlos en un baño de agua a 37 °C y conseguir cifras de supervivencia de en torno al 100 % y aplicables a todos los estados larvarios y adultos. El método está basado en altas velocidades de enfriamiento y calentamiento que permite la vitrificación (sin formación de hielo).

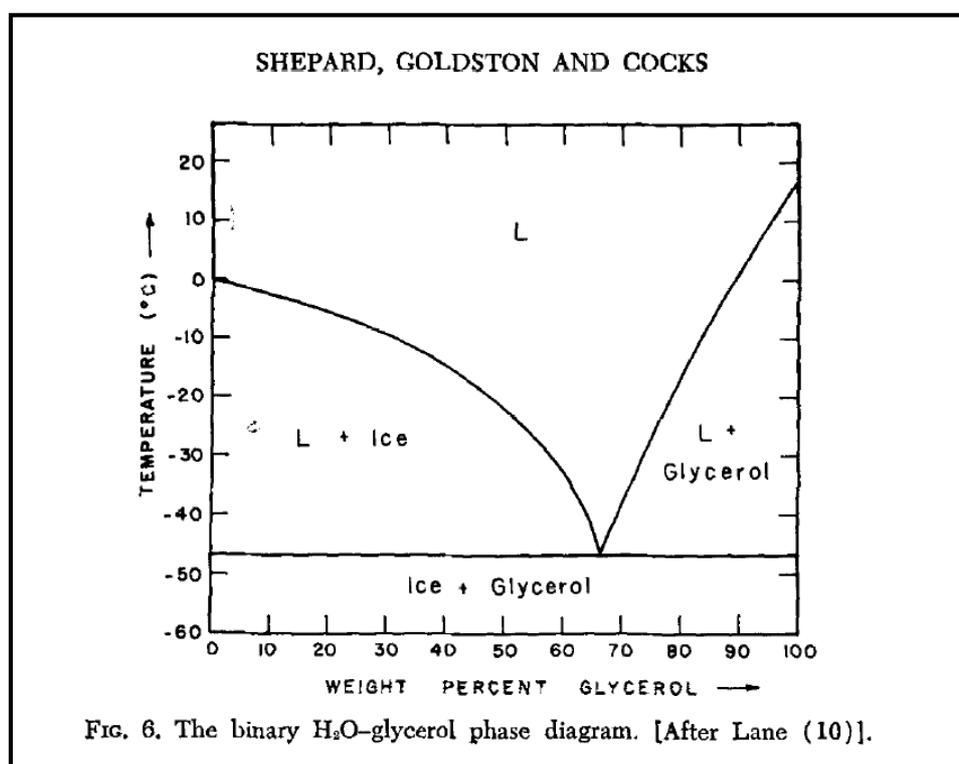


1 – Imagen tomada del artículo *The genetics of Caenorhabditis elegans* [5]. Ilustra el aspecto de algunos de los mutantes de *C. elegans* estudiados por Brenner en 1973.

En este proyecto se proponen una serie de nuevos métodos para la congelación y descongelación de estos nematodos. Su viabilidad con *C. elegans* abren un camino al desarrollo de estos métodos con material biológico más complejo y de mayor interés acercándonos así al último objetivo de la creación de un banco de órganos criopreservados.

2.2 Agente crioprotector

Como se ha explicado en el apartado 1.2, los agentes crioprotectores (o anticongelantes) evitan la formación de hielo en el medio de criopreservación del tejido. Existe, sin embargo, un inconveniente principal en el uso de estos crioprotectores: su toxicidad en organismos vivos. Esta toxicidad, no obstante, puede ser controlada con diferentes factores: concentración de la solución, la naturaleza de la solución en la que se encuentran, la temperatura a la que se administra el crioprotector, el tiempo de exposición, entre otros. Además, es posible (y recomendable) la mezcla de varios crioprotectores para optimizar sus resultados disminuyendo la toxicidad. Todo esto convierte el empleo del anticongelante en un problema n-dimensional donde cada uno de los factores antes enumerados pueden ser, además, interdependientes entre sí [2]. Para su solución, se han propuesto numerosos métodos simplificadores, pero aun es un campo de investigación muy abierto que supera los objetivos de este proyecto. Es por ello que la elección del crioprotector se basará en argumentos puramente históricos. En su artículo *The genetics of Caenorhabditis elegans* [5], Brenner describió por primera vez la genética básica de los nematodos *C. elegans*, así como un método para determinar la estructura de su sistema nervioso. En el mismo artículo, Brenner propone una vía para la conservación a largo plazo de estos microorganismos mediante su congelación en nitrógeno líquido tras haber pasado por un método de enfriamiento conocido como slow-freezing (véase el apartado 2.3). Para que este método funcionara fue necesario el empleo de **glicerol** como agente crioprotector [5]. A partir de entonces, se gestó una inercia de uso de este anticongelante para la criopreservación de *C. elegans* dentro de la comunidad científica.



2 – Diagrama de fases de la solución H₂O-Glicerol. Información tomada de la referencia [6]

El glicerol o propano-1,2,3-triol ($C_3H_8O_3$) es un alcohol con tres grupos de hidroxilos (-OH), se encuentra presente en todos los aceites vinculado a ácidos grasos. Participa en numerosas aplicaciones como la elaboración de jabones, de medicamentos, como lubricante y como anticongelante, que es la que nos interesa. Su densidad es de 1261 kg/m^3 y su viscosidad de $1,5 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, ambas considerablemente superiores al agua. La viscosidad es a su vez inversamente proporcional a la temperatura por lo que se convierte en un inconveniente para su manipulación en los procesos de enfriamiento [7]. En la figura 2 se muestra la línea de liquidus para la solución H₂O-Glicerol.

En nuestro contexto de uso, el glicerol siempre irá mezclado con un PBS (Phosphate Buffered Saline), una sustancia fisiológica de cierta salinidad (normalmente entre 0.5 – 1 % de NaCl en una solución principalmente acuosa) que resulta un medio bastante compatible con las células de muchos animales al ser una sustancia isotónica y de pH neutro. La presencia de sal afecta al diagrama de fases de la solución, por lo que será necesario estudiar el comportamiento de la solución H₂O-NaCl-Glicerol ante distintas temperaturas. En el artículo *The H₂O-NaCl-glycerol phase diagram and its application in cryobiology*, M.L. Shepard et al. presentan un estudio de diagrama de fases ternario de H₂O-NaCl-Glicerol hecho mediante análisis térmico diferencial (DTA).

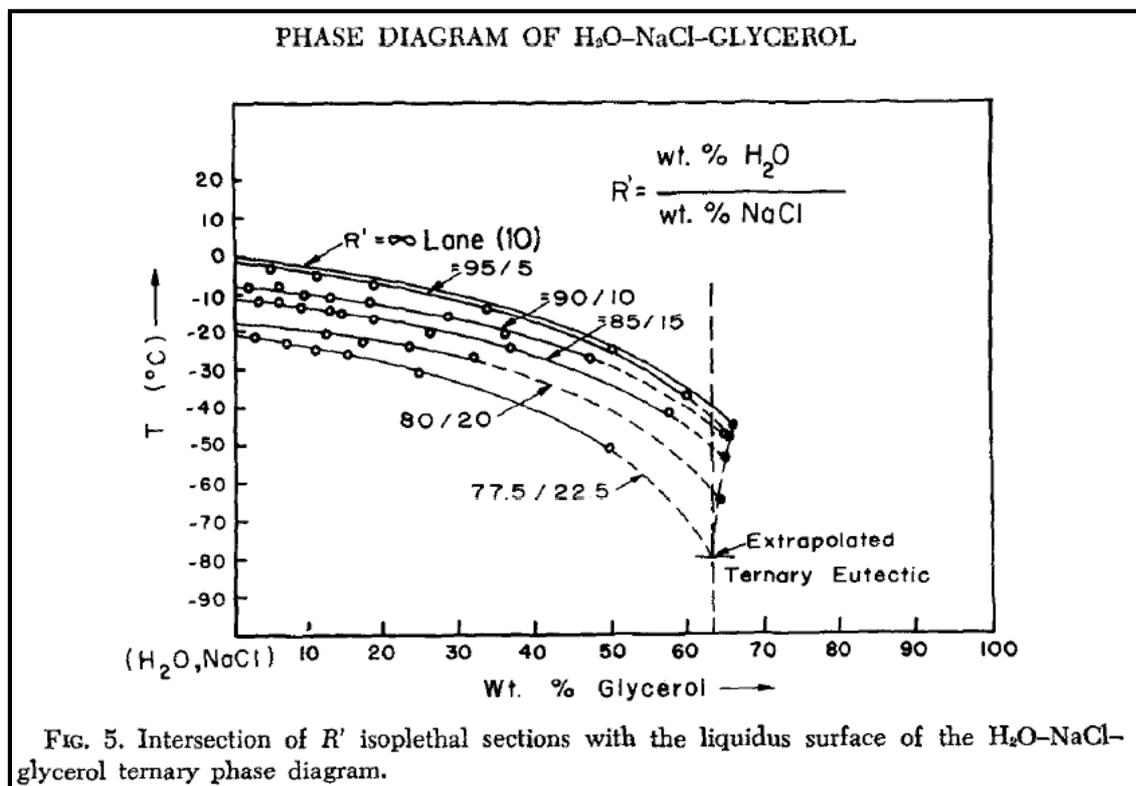


FIG. 5. Intersection of R' isoplethal sections with the liquidus surface of the H₂O-NaCl-glycerol ternary phase diagram.

3 – Gráfica que representa la línea de liquidus de la solución H₂O-NaCl-Glycerol para una solución con ratio (R') H₂O / NaCl dado [6]

Como se ha mencionado en el apartado 2.1, se trabajará con S. Buffer como medio fisiológico para mantener los *C. elegans* durante la criopreservación, a la cual se le añadirá crioprotector en un cierto porcentaje según el experimento. Esta solución posee un 0.5 % de NaCl, sin

embargo, a medida que el hielo puro cristaliza en el seno de la disolución durante el enfriamiento, la solución residual es más rica en sal (al disminuir la cantidad de disolvente). Esta mayor presencia de NaCl modifica el diagrama de fases H₂O-Glicerol de una forma significativa haciendo descender la curva de liquidus tal y como se muestra en la figura 3.

Resulta claro observar la tendencia descendente con respecto a la temperatura de la línea de liquidus conforme la solución fisiológica que alberga el material biológico se hace más rica en sal (R' se hace más pequeño). Esta gráfica es esencial para explicar el método de *liquidus tracking* que utilizaremos, así como para explicar el fenómeno en el que se apoya el *slow-freezing*.

2.3 Método de enfriamiento por slow-freezing

Como se ha mencionado anteriormente, Sydney Brenner, en su estudio sobre la genética de los *C. elegans*, describe un método para su criopreservación a largo plazo conocido actualmente como slow-freezing. El método descrito por Brenner será el que se emplee en este trabajo y consiste en el siguiente proceso:

1. Utilizamos S. buffer (Brenner utiliza un equivalente, M9 buffer) para liberar los gusanos de la superficie de la placa de cultivo, estos quedan atrapados en el líquido que retiramos de la placa con una pipeta e introducimos en el criovial. Una cantidad idéntica de una solución de S. Buffer con glicerol al 30% es introducida en el mismo criovial obteniendo una solución resultante de S. Buffer con glicerol al 15%.



4 – Foto de un criovial del laboratorio

2. Introducimos el criovial en una caja de cocho aislante rodeado de otros envoltorios aislantes, tantos como sean necesarios para obtener una velocidad de enfriamiento en torno a 1 °C/min o inferior. Seguidamente, lo introducimos en el frigorífico de

disponible en Laboratorios de la ETSI que alcanza una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (foto).



5 – Izquierda: caja de porexán cerrada. Centro: interior de la caja con bloques que mantienen el frío. Derecha: interior aislado con plásticos y otros materiales para garantizar una velocidad de enfriamiento inferior a $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$

- Al día siguiente, se retira el criovial del refrigerador, se observa que se ha formado hielo y se deja que se descongele a temperatura ambiente durante 20-30min. Posteriormente se vierte la solución del criovial en una placa de NGM donde podremos observar una supervivencia de en torno al 35 % de gusanos, principalmente larvas L1 y L2.

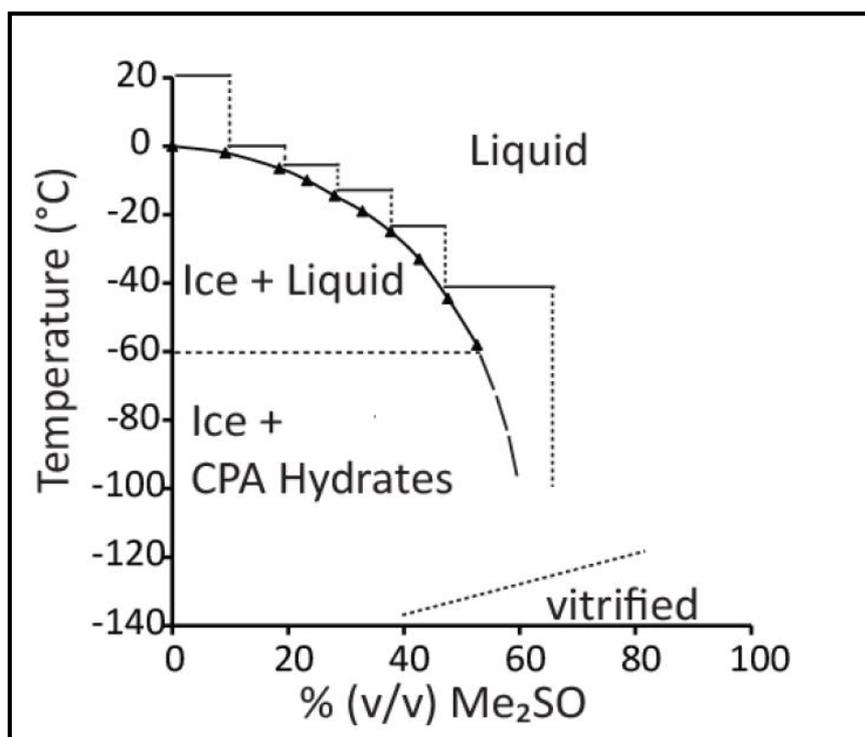
2.4 Método de vitrificación por liquidus tracking

El slow-freezing se ha consagrado como el método tradicional para la criopreservación de material biológico, a pesar de que ha comportado varios logros y puede dar resultados aceptables para determinadas aplicaciones, su eficacia no es óptima (ya se ha mencionado la supervivencia del 35 % de *C. elegans* tras este proceso) y, sobre todo, no es extrapolable al caso de tejidos más complejos (caso de los órganos), por lo que pone de manifiesto la necesidad de buscar nuevos métodos en los que se garantice la supervivencia del 100 % de las células implicadas. El inconveniente principal del slow-freezing es la formación de hielo, este aparece en las distintas cavidades del órgano donde el líquido se ha alojado y, al crecer, destruye la estructura interna del tejido. A su vez, dado que no se ha desarrollado un método de recalentamiento rápido y homogéneo, el recalentamiento tradicional es lento y puede dar lugar a la reorganización del hielo y su crecimiento por nucleación mientras se alcanza la temperatura final, suponiendo el mismo peligro para los tejidos que el descrito durante el enfriamiento [11].

En 1965, J. Farrant [10] propuso un nuevo método para la criopreservación de tejidos conocido hoy en día como Liquidus tracking. En un primer momento, el objetivo de Farrant era la reducción de la concentración de electrolitos (principalmente debido a la sal presente en las soluciones fisiológicas en las que se conserva el tejido) durante la congelación ya que crea un desequilibrio entre las soluciones interna y externa de la célula. Su técnica permitía además evitar la formación de hielo durante la congelación, lo que se convirtió con el tiempo en uno de sus principales atractivos. El método consistía en lo siguiente: durante el

enfriamiento, incrementar progresivamente la concentración de crioprotector en la solución donde se aloja la muestra. Esta adición de crioprotector se puede realizar varias etapas (digamos de forma discreta) o de manera continua por perfusión. En este proyecto se abordará la primera. El objetivo es mantenerse siempre a niveles de concentración de crioprotector suficientes para impedir la formación de hielo, esta concentración de anticongelante requerido en función de la temperatura de enfriamiento viene dada por la línea de liquidus de la mezcla [10,11].

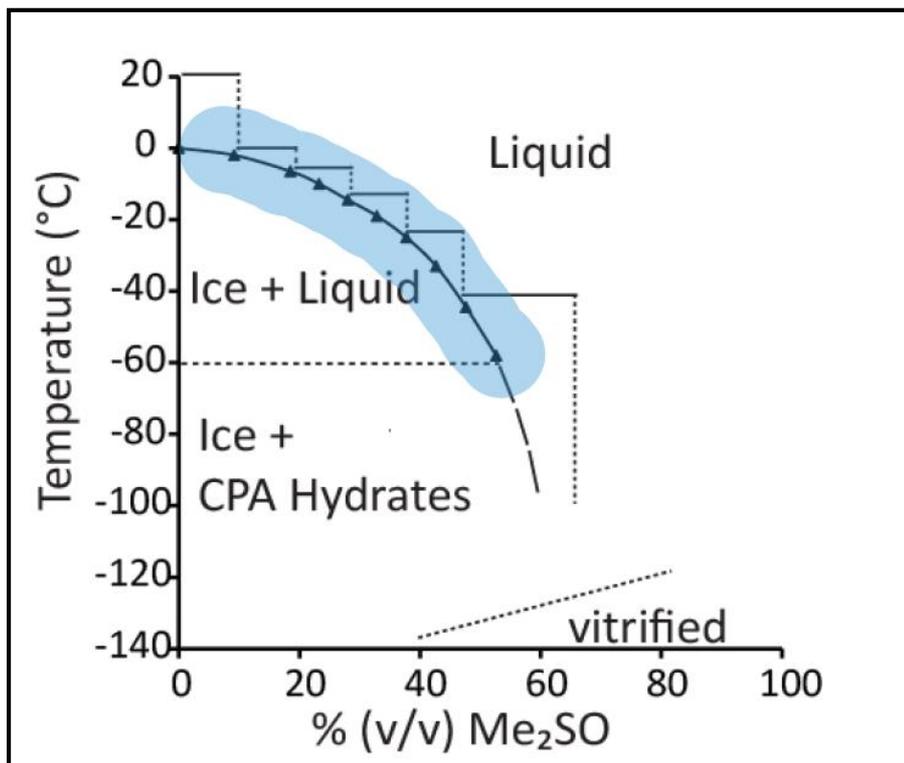
Ya se ha hablado previamente de esta línea de liquidus en el apartado 2.2 donde se mencionaban los efectos de la concentración de NaCl en la inclinación de esta. E. Puschmann et al. ilustran claramente este método sobre la línea de liquidus con la siguiente gráfica (usando Me₂SO como anticongelante, en este trabajo se ha empleado glicerol):



6 – Diagrama de fases de una solución H₂O-Me₂SO. La línea gruesa representa la curva de liquidus [11].

Las marcas triangulares representan los puntos donde se ha añadido la cantidad de anticongelante suficiente para evitar la congelación durante unos grados más. Esta incorporación de crioprotector dibuja la semirrecta horizontal trasladando la solución a una concentración mayor de anticongelante. Conforme la temperatura baja, se recorre la línea discontinua hasta que esta intersecta la línea de líquidus, punto en el cual debe volverse a añadir crioprotector. Cuanto mayor sea el número de pasos que empleen en la adición del anticongelante más eficiente será, pues se encontrará más cercano a la idea teórica de seguir la curva de líquidus. Durante este proceso, debe buscarse en todo momento un compromiso entre la no formación de hielo y no exceder la cantidad de anticongelante para una temperatura dada con el fin de no superar los límites de la toxicidad soportada por el tejido biológico. Es bien conocido que la toxicidad disminuye con la temperatura y con la concentración de anticongelante. Al añadir pequeñas cantidades de este en cada paso y seguidamente enfriar la solución hasta su punto de congelación, la toxicidad se minimiza y la formación de hielo se

paraliza con la adición de más agente crioprotector. No obstante, debe mencionarse que existe cierta inercia de subenfriamiento por la cual la solución (en la que no haya un trozo de hielo previamente) no empieza a formar hielo hasta una vez superados varios grados por debajo de la línea de liquidus. Podría hablarse por tanto de una banda imaginaria que rodea la línea de liquidus que dibuja los límites de toxicidad y formación de hielo dentro de los cuales existe margen de maniobra para realizar los sucesivos pasos de adición de crioprotector. Se ha dibujado esta banda imaginaria en la imagen anterior para dar una explicación visual del concepto:



7 - Diagrama de fases de una solución H₂O-Me₂SO. La banda azul en torno a la línea de liquidus representa el espacio seguro (ideal, no hay datos empíricos de sus límites reales) en el que moverse durante la adición de crioprotector en el método de Liquidus Tracking

Mediante el método de Liquidus Tracking, es posible alcanzar el estado de vitrificación (solidificación de un líquido sin formar cristales) de la muestra biológica sin necesidad de emplear altas velocidades de congelación. Este estado de vitrificación es siempre deseado para evitar los daños provocados por la formación de hielo. Los problemas se presentan ahora en el recalentamiento donde tanto la formación de hielo como la toxicidad del crioprotector deben evitarse cuidadosamente. Para ello, el recalentamiento debe ser rápido, así como el lavado posterior con PBS, eliminando la mayor cantidad de anticongelante posible.

2.5 Método de recalentamiento por ultrasonidos

Como se venía mencionando en el apartado anterior, el método de criopreservación mediante vitrificación requiere un recalentamiento rápido y homogéneo de la muestra. Para solucionar esta problemática, se ha propuesto un nuevo método de recalentamiento por ultrasonidos focalizados de alta densidad (HIFU). La técnica de ultrasonidos viene empleándose ampliamente en el campo de la oncología con el objetivo de destruir células malignas someténdolas a altas temperaturas. En 2020, Alberto Olmo et al. [12] presentaron de forma teórica, mediante simulaciones con COMSOL, el uso de HIFU para el recalentamiento de órganos de manera suficientemente homogénea y rápida para evitar el fenómeno de la desvitrificación (formación de hielo en el recalentamiento de sustancias vitrificadas). Para ello, testearon diferentes potencias e intensidades que garantizaban tanto el recalentamiento rápido como homogéneo (un máximo de 7 °C entre las diferentes zonas del órgano). Como resultado, obtuvieron velocidades de recalentamiento superiores a 100°C/min (suficientes para la aplicación que se busca). También concluyeron que los valores de potencia aplicada deben estar dentro de unos límites mínimos y máximos: mínimos que aseguren un recalentamiento rápido y máximos para que no perder la homogeneidad en todos los puntos y no causar daños físicos en el órgano. Este primer acercamiento a esta nueva técnica da paso a la necesidad de su implementación física, el cual es uno de los objetivos de este proyecto.

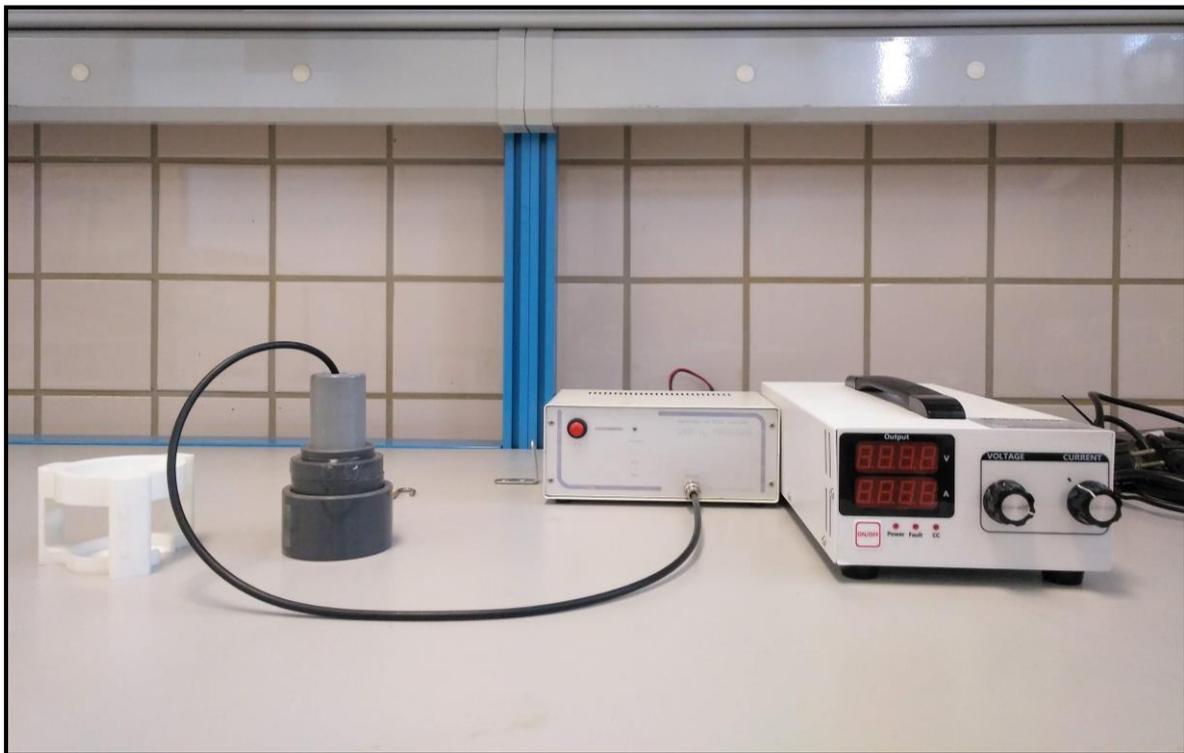
Se ha partido del Trabajo de Fin de Grado realizado por José Cava [13], quien diseñó y construyó un sistema completo de recalentamiento basado en los HIFU. Esta será la maquinaria que se empleará en el proyecto para realizar los experimentos. A continuación, se describe la información técnica principal de este sistema que ha sido necesaria para su manejo y utilización:

- Los ultrasonidos son ondas de presión de una frecuencia superior al rango audible por el ser humano (a partir de 20kHz). Son generados por el movimiento mecánico de un cuerpo que induce la oscilación de las moléculas del medio de propagación en el que se encuentra (en el caso de este sistema será un medio líquido). Estas moléculas se expanden y comprimen facilitando la propagación de la onda.
- El transductor del sistema se basa en el fenómeno de la piezoelectricidad. Este ocurre en determinados cristales (cuarzo, rubidio, cerámicas piezoeléctricas...) que, al ser sometidos a tensiones mecánicas, adquieren una polarización eléctrica y aparece una diferencia de potencial en su superficie. Lo interesante de este fenómeno es que también ocurre a la inversa: estos cristales se deforman bajo la acción de fuerzas internas al ser sometidos a un campo eléctrico y al dejar de exponerlos a este, recuperan su forma. Este fenómeno será el utilizado para generar la onda mecánica que origina los ultrasonidos.
- Dada la geometría parabólica del transductor (*figura 8*), los ultrasonidos se concentran en un punto denominado foco que tiene cierta geometría elipsoidal. En esta zona, la potencia de las ondas emitidas se concentra y se produce un rápido incremento de la temperatura en pocos segundos (en la fase experimental se detallarán curvas de calentamiento realizadas con termopares).



8 - Imagen del transductor parabólico hecho de cerámica piezoeléctrica

- El sistema final queda como se ve en la *figura 9* el transductor conectado a un generador de ondas diseñado específicamente para esta aplicación que a su vez se conecta a una fuente de alimentación a través de la cual se podrá manipular la potencia que emite el transductor.



9 – Imagen del sistema de HIFU completo, de izquierda a derecha: transductor, generador de onda, fuente de tensión

3 FASE EXPERIMENTAL

Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos.

- Marie Curie -

En este bloque se desarrollará la descripción de todo el proceso experimental realizado durante el proyecto. Este se divide en dos grandes apartados: uno centrado en el proceso de recalentamiento por ultrasonidos y otro en el método de criopreservación por Liquidus Tracking.

3.1 Método de recalentamiento por HIFU de *C. elegans* con previo enfriamiento mediante slow-freezing

En este apartado se describen paso a paso los experimentos realizados con HIFU, para los cuales se ha seguido un proceso de slow-freezing en el enfriamiento. Cabe comentar, que este método de enfriamiento no es el adecuado para el fin que estamos buscando, pues los ultrasonidos están pensados para calentar material previamente vitrificado (con el fin de evitar el fenómeno de desvitrificación), sin embargo, el método de slow freezing es el más simple y viable para la realización de una batería considerable de experimentos que permitiera jugar con los distintos parámetros del sistema de HIFU. Obtener evidencias de supervivencia con HIFU tras enfriamiento por slow freezing adelanta un paso más las investigaciones hacia el objetivo final al hacer palpable su viabilidad con microorganismos vivos y da resultados sobre los rangos de potencia óptimos donde los HIFU deben trabajar.

3.1.1 Preparación y visualización del set-up

El problema principal que se presenta es la colocación efectiva de todos los elementos para conseguir un modo viable y reproducible de disparos a microorganismos *C. elegans*. Algunos de las problemáticas que se plantean son las siguientes:

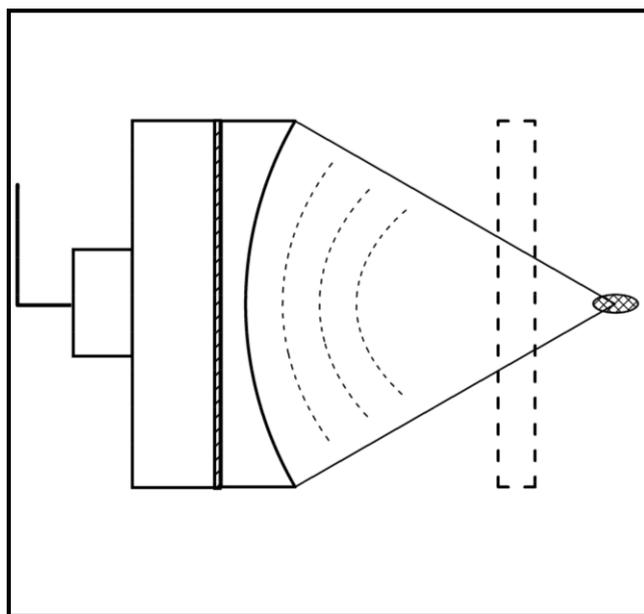
- ¿Dónde se ubica el foco exactamente? (debe caracterizarse su ubicación y forma para colocar allí la muestra)
- ¿Qué sistema de sujeción usar para mantener el transductor a la distancia focal de la muestra?

- Los ultrasonidos solo viajan en un medio líquido... ¿Qué medio emplear para garantizar el enfriamiento de la muestra durante el experimento?
 - ¿Qué potencia debe aplicársele a los HIFU para obtener una supervivencia óptima?
 - ¿En qué recipiente deben confinarse a los *C. elegans* para garantizar que no se pierdan en el medio líquido de transmisión de ultrasonidos y en el que, al mismo tiempo, los ultrasonidos puedan penetrar adecuadamente?
 - ¿Qué proceso de lavado y recuperación deben seguir los *C. elegans* tras su recalentamiento?

Todas estas preguntas se irán respondiendo a lo largo de esta sección.

3.1.1.1. Estudio de la ubicación del foco: 3 vías

El transductor de ultrasonidos tiene una forma parabólica de manera que permite concentrar toda la energía generada en una zona llamada foco.

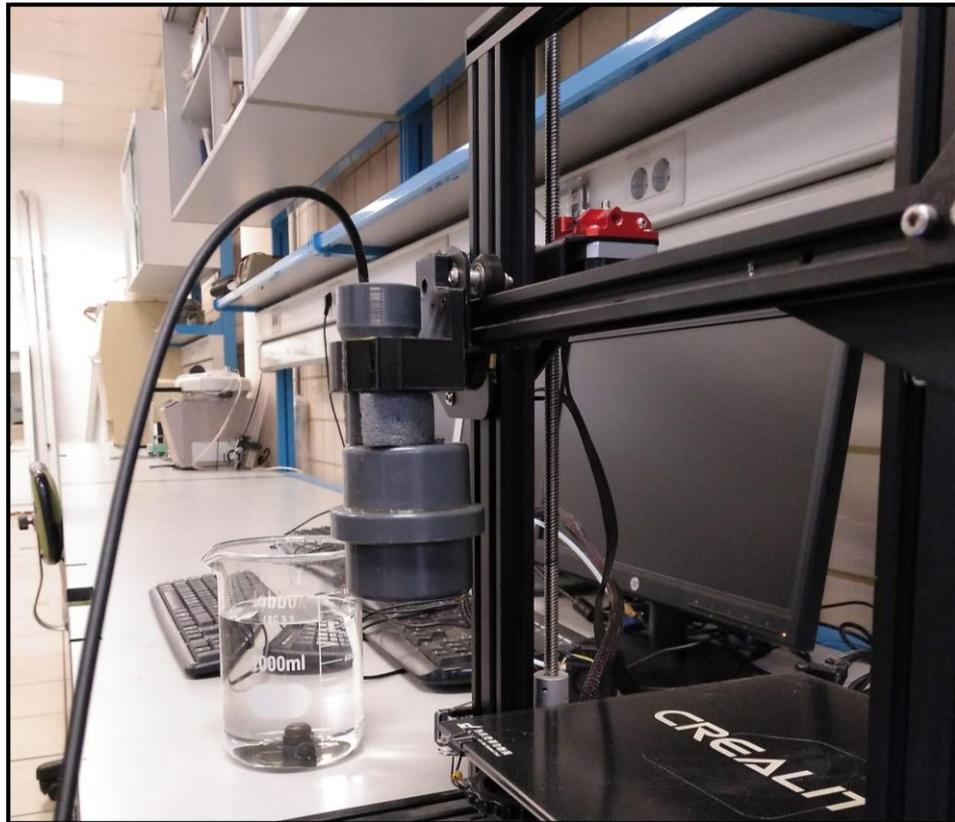


10 – Esquema del funcionamiento del transductor de HIFU utilizado

Esta zona focal tiene cierta forma elipsoidal como se muestra en la figura. Dada a naturaleza completamente manual de la construcción de la maquinaria usada en el laboratorio, se ha debido caracterizar sus propiedades, entre ellas la distancia focal (segmento perpendicular a la superficie del transductor que va desde esta hasta el foco). Para su determinación se han empleado 3 vías:

- **Papel termosensible.** El papel termosensible está fabricado con un tipo de colesterol que le confiere la capacidad de variar su color en función de la temperatura. La idea es colocar el papel horizontalmente sobre la mesa y colocar el transductor verticalmente apuntando a al primero. Se realizarán varios

disparos modificación progresivamente la distancia focal a la vez que se realizan fotos del impacto de los ultrasonidos sobre el papel termosensible. Para sujetar el transductor y controlar de forma precisa su distancia al papel termosensible, se ha utilizado la impresora 3D *Prusa i3* que aparece en la imagen, a la que se le ha sustituido el cabezal por una garra impresa con las medidas del diámetro del mango del transductor como se observa en la figura 10.

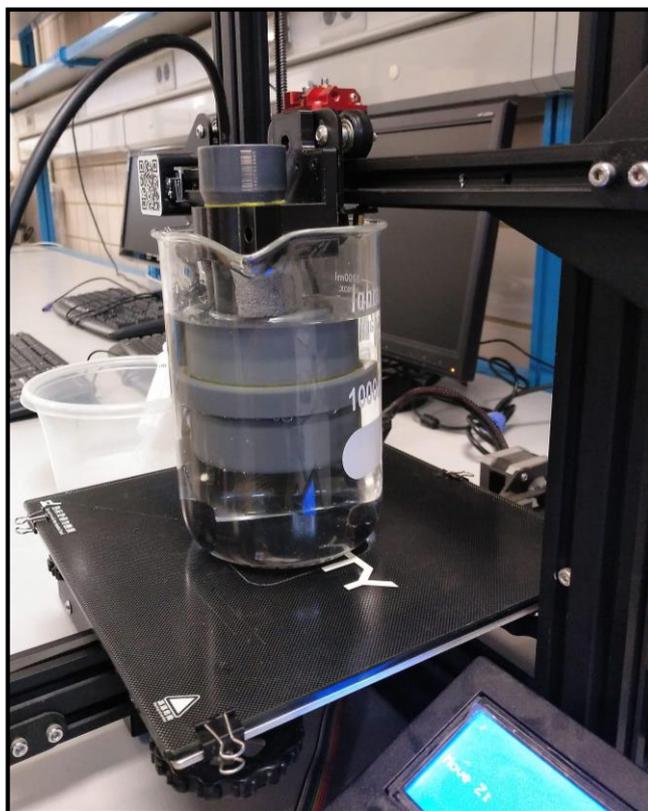


11 – Transductor sujetado con la garra construida a medida con la misma impresora 3D que lo sujeta

A continuación, se introduce el papel termosensible en el fondo del vaso de precipitado que observamos en la imagen, donde luego introduciremos el transductor cuya posición en el eje Z será controlada con la opción manual de la impresora. El set-up final queda como se observa en la *figura 12*.

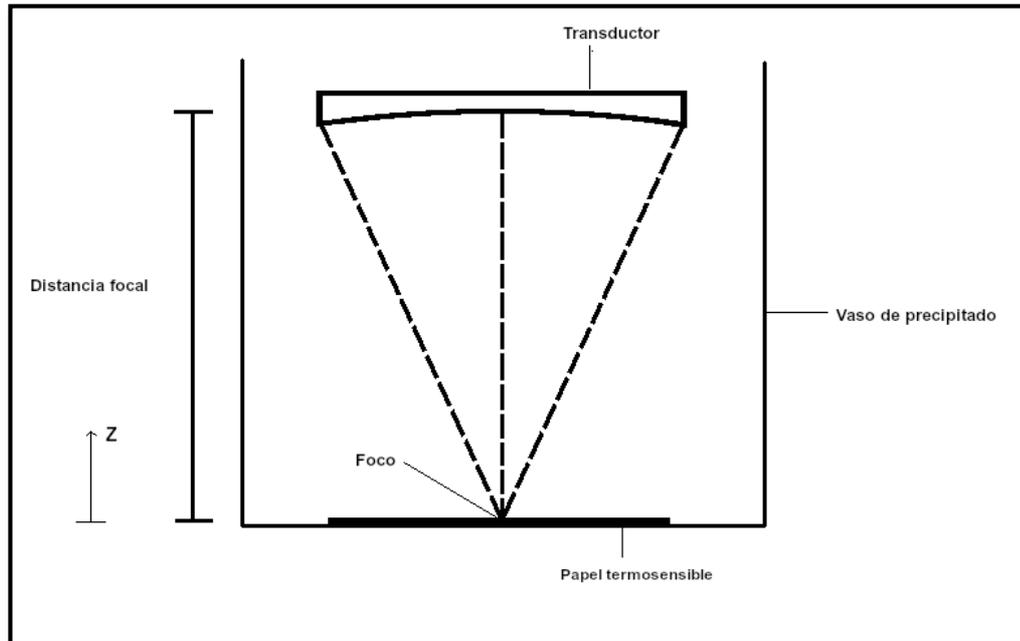


12 – Papel termosensible en el fondo del vaso de precipitado



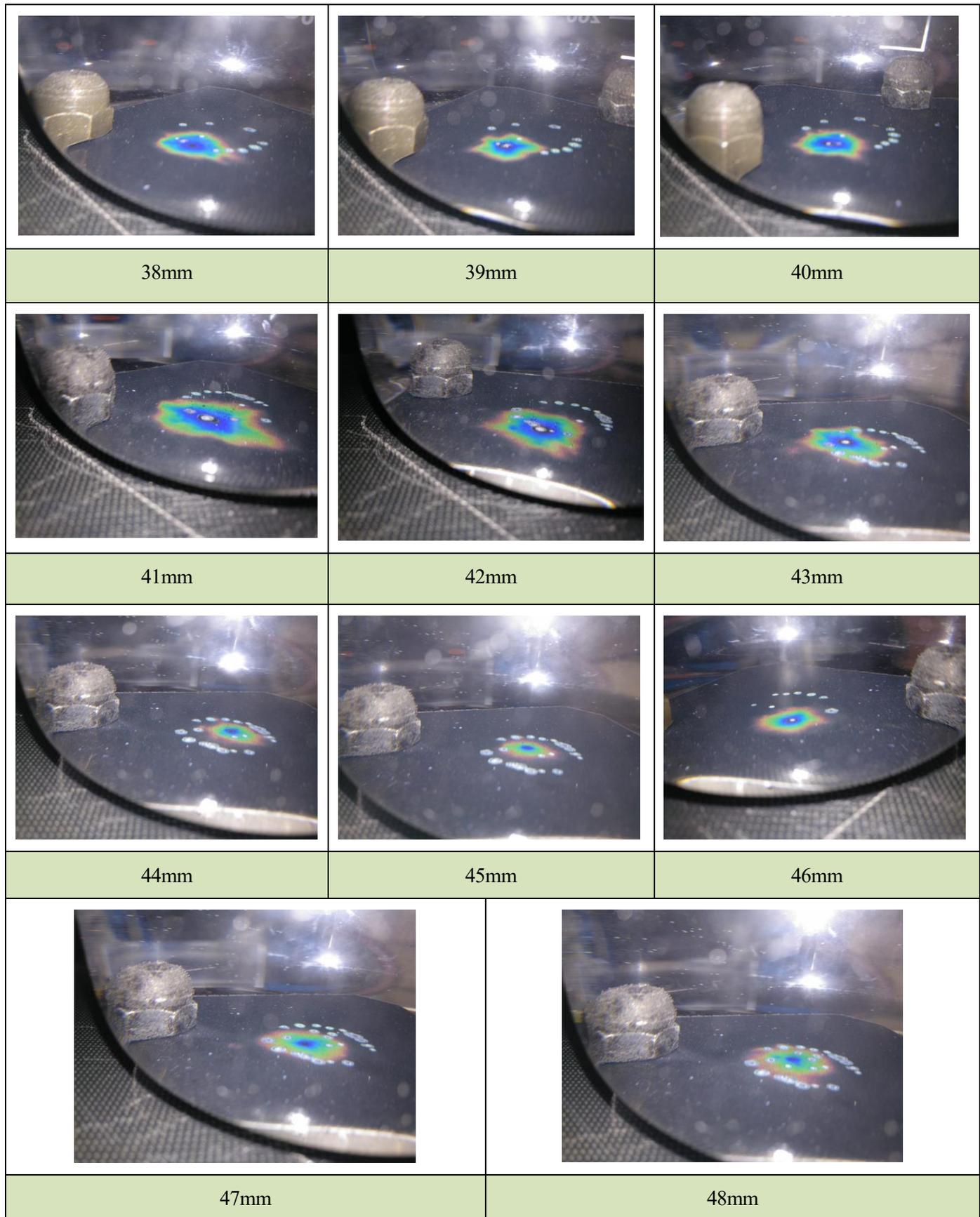
13 – Set-up final para la determinación del foco según el impacto en el papel termosensible desde distintas distancias a lo largo del eje vertical (Z)

El experimento consiste en disparar durante 30 segundos a una potencia de 8W a distintas alturas del eje Z (cambiando la distancia transductor-papel) para encontrar la distancia a la cual el papel recibe un mayor impacto, esta será la distancia focal.



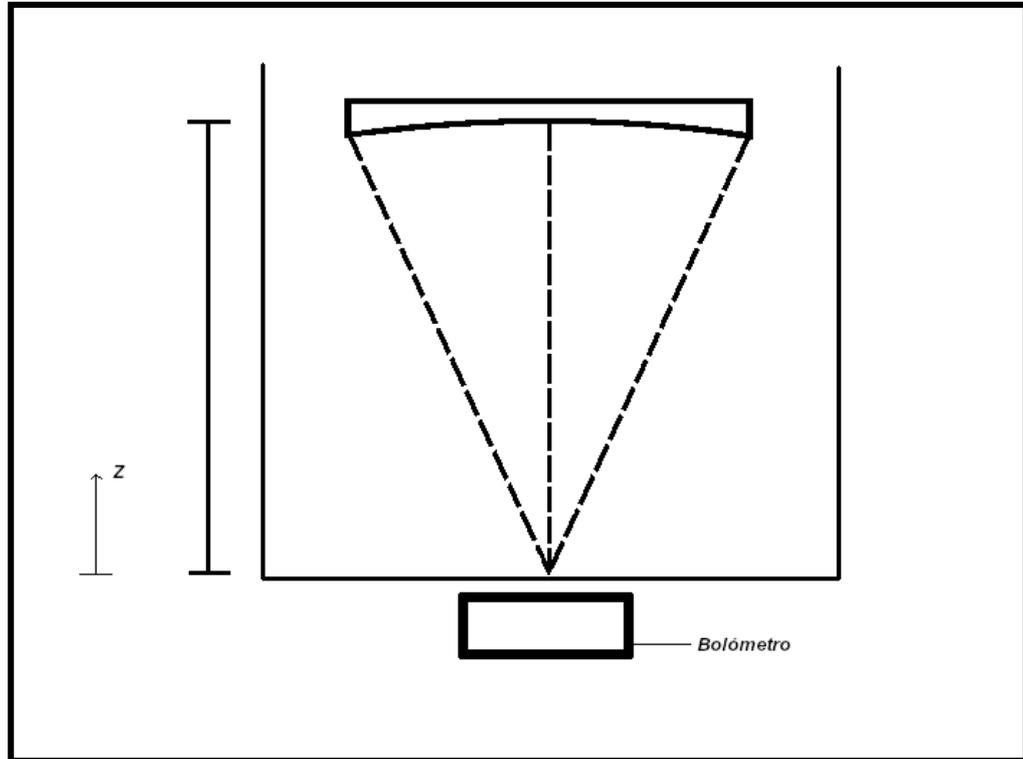
14 – Croquis del experimento: se modifica la altura del transductor a lo largo del eje Z para identificar la posición real del foco según qué altura produjo mayor impacto en el papel termosensible

Se realizó el experimento a 10 alturas diferentes variando la hipotética distancia focal entre 38mm y 48mm. Se concluyó que la distancia focal se situaba en torno a 42 mm (entre 41 y 43mm). A continuación, se muestra una batería de las fotos realizadas a las distintas temperaturas, es fácil observar como en las distancias 41, 42 y 43mm se produce una huella más pronunciada que el resto.



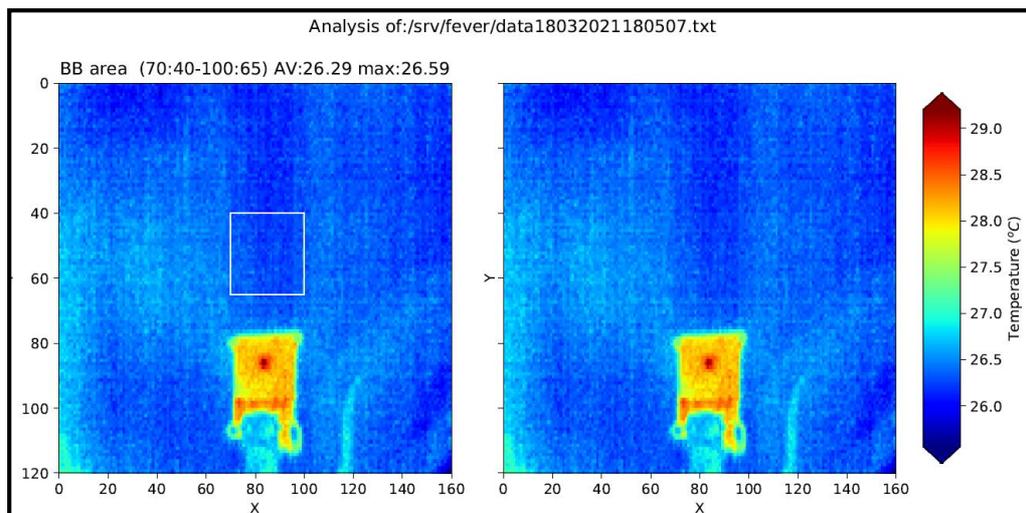
15 – Imágenes del papel termosensible tras los disparos de HIFU a distintas alturas

- **Bolómetro.** Un bolómetro es un instrumento que mide la cantidad total de radiación electromagnética que viene de un objeto en todas las longitudes de onda. En el laboratorio se ha podido acceder a uso de este aparato con el que se han realizado varias fotografías desde la superficie inferior del vaso.



16 - Disposición de la cámara del bolómetro en el set-up

Las fotografías tomadas en el laboratorio nos dan los siguientes resultados:



17 - Imagen tomada con el bolómetro del disparo desde una distancia $Z = 38\text{mm}$

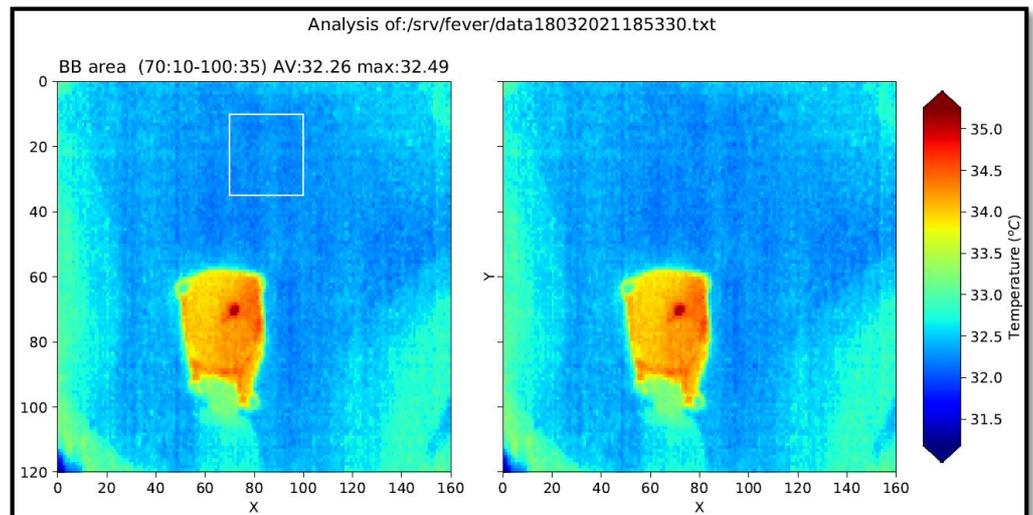


Imagen del disparo desde una distancia $Z = 44\text{mm}$

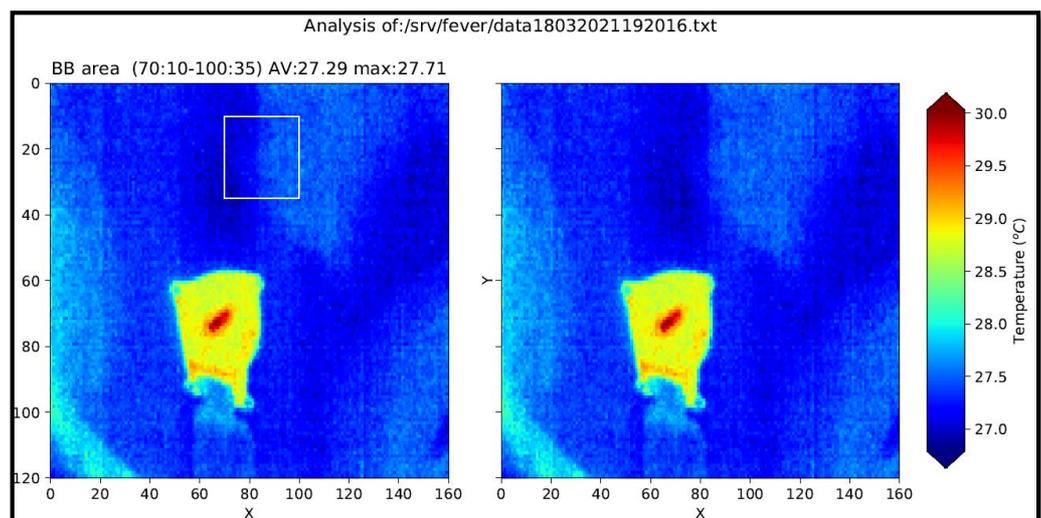
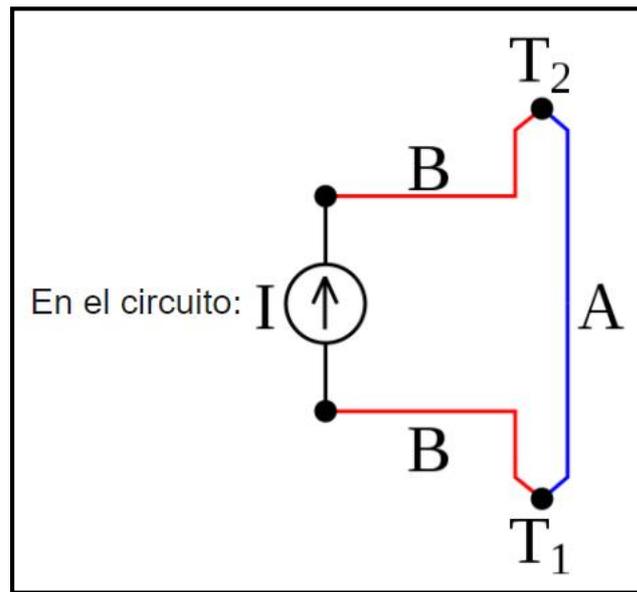


Imagen del disparo desde una distancia $Z = 49\text{mm}$

Encima de la imagen de la izquierda se observan varios datos. El valor máximo que indica es la temperatura máxima registrada en el recuadro blanco señalado en la imagen (que coincide con la zona donde se ha supuesto el foco en el plano XY). La mayor temperatura máxima se sitúa en $Z=44\text{mm}$. Sin embargo, esta medida no puede suponerse del todo certera, pues al medir el bolómetro la temperatura de todos los cuerpos que aparecen en la imagen, capta también la inercia térmica que ha seguido el agua al calentarse en los diversos experimentos. Digamos que la temperatura del agua del vaso de precipitado en el experimento realizado a 38mm era alrededor de un grado inferior a la del experimento de $Z=49\text{mm}$ como podemos observar.

- Termopares.** Como sensor para la medición de temperatura a lo largo del tiempo, se han utilizado termopares, cuyo funcionamiento está basado en el efecto termoeléctrico con el cual se produce una conversión de diferencia de temperatura a diferencia de voltaje y viceversa. En el primer sentido se habla de *efecto Seebeck* y en contrario se habla de *efecto Peltier*. El que utilizan los termopares es el *efecto Seebeck*: al crear una diferencia de temperatura entre los extremos de dos materiales conductores (A y B), se induce una fuerza electromotriz en el circuito que cierran ambos conductores del orden de microvoltios [14].

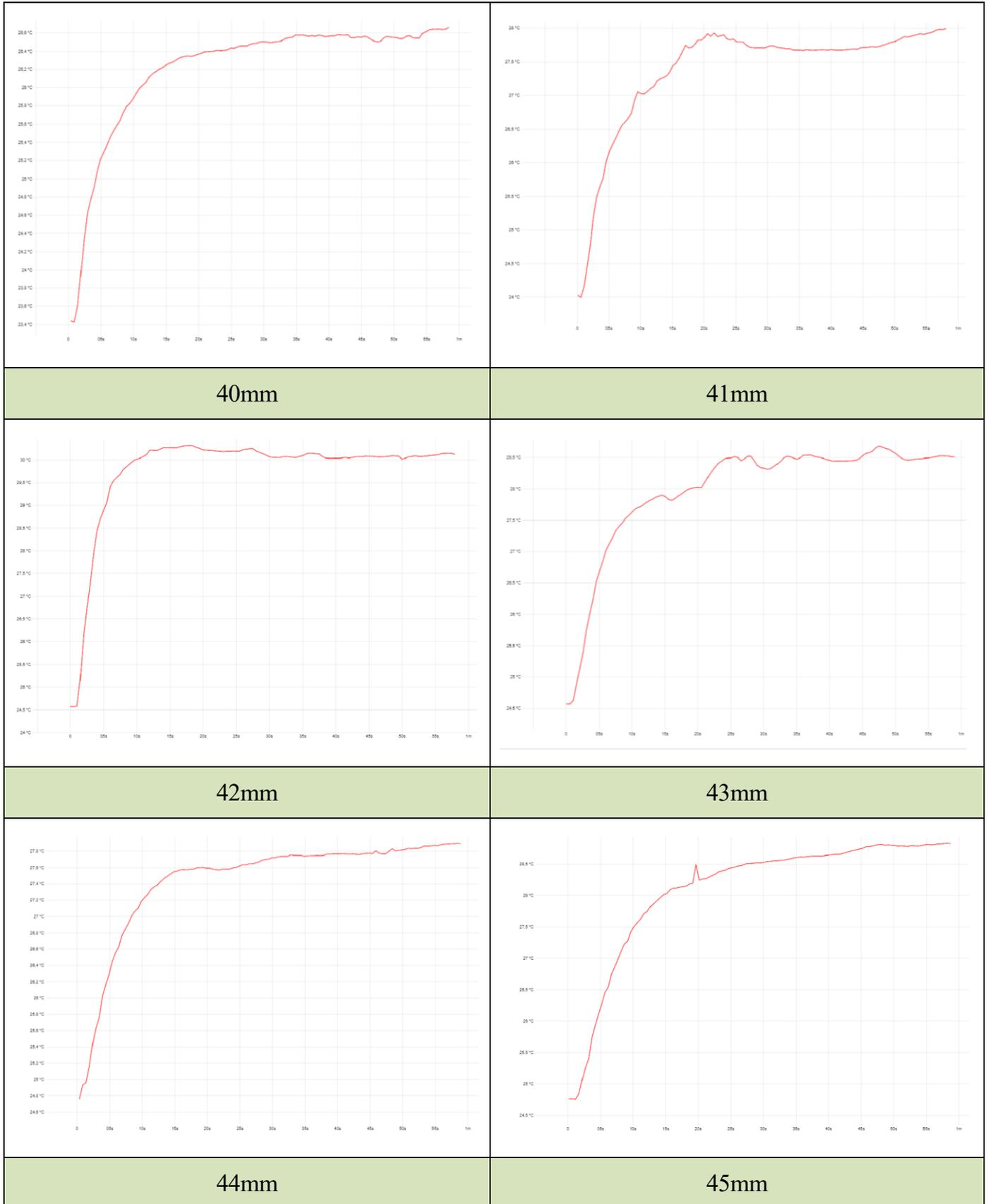


18 – Efecto termoeléctrico

Las lecturas de los termopares se han realizado por medio de un Data Logger para termopares, modelo TC-08 de Pico Technology. Este aparato, junto con el software PicoLog instalado en un ordenador o tablet, permite visualizar en tiempo real las medidas de los termopares enviadas por comunicación serie. Es posible dibujar gráficas de la temperatura, y se pueden obtener los datos en una tabla, mostrando la temperatura registrada en cada instante. El intervalo de muestreo es modificable y se ha optado por 1 registro de temperatura cada segundo.

Situando los termopares en el fondo del vaso (misma zona que el papel termosensible), se han obtenido las curvas observada en la tabla inferior como resultado de diferentes disparos a distintas distancias en el eje Z.

Observamos en todos los casos un comportamiento de un sistema de primer orden que tiende a un permanente que dependerá de la potencia de disparo que se le suministre a los HIFU. En este caso los disparos se realizaron a una potencia modesta de 8W. El alcance de ese permanente se explica por un equilibrio entre el calor aportado por los HIFU y el calor disipado por el agua. De nuevo observamos un máximo en $Z = 42$ mm donde la velocidad de incremento de temperatura en el transitorio es de 0.71 °C/sec al lado, por ejemplo, de 0.15 °C/sec en 40 °C.



Después de estos 3 experimentos para la búsqueda de la ubicación del foco del transductor de ultrasonidos, se concluye que este se encuentra en el centro de la circunferencia (en el plano XY) y a 42 mm del borde del transductor en el eje Z.

3.1.1.2. Placas Petri

Ahora toca decidir el recipiente en el que se alojarán los gusanos para garantizar su confinamiento en la zona focal sin riesgo de escape o pérdidas. Tras valorar numerosas posibilidades, se ha decidido usar placas de Petri.



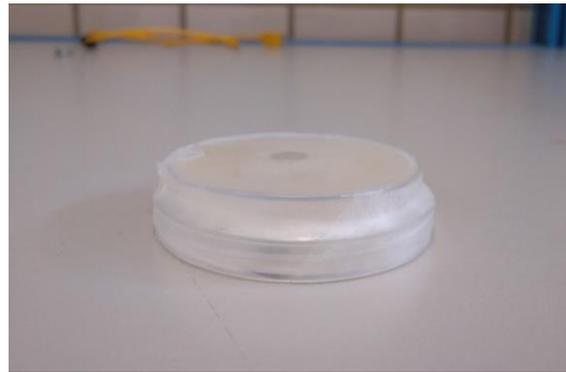
19 - Placas de Petri usadas en el laboratorio

Para garantizar que los *C. elegans* se concentran en la zona focal dentro del plano XY se ha realizado un molde de agar que cubre toda la superficie de la placa excepto un hueco circular en el centro donde se introducirán los gusanos. Después se tapa la placa y se precinta con parafina para garantizar que no hay pérdidas. El proceso completo de su preparación y congelación se detallará en la sección siguiente.

El resultado queda como se observa en las imágenes:

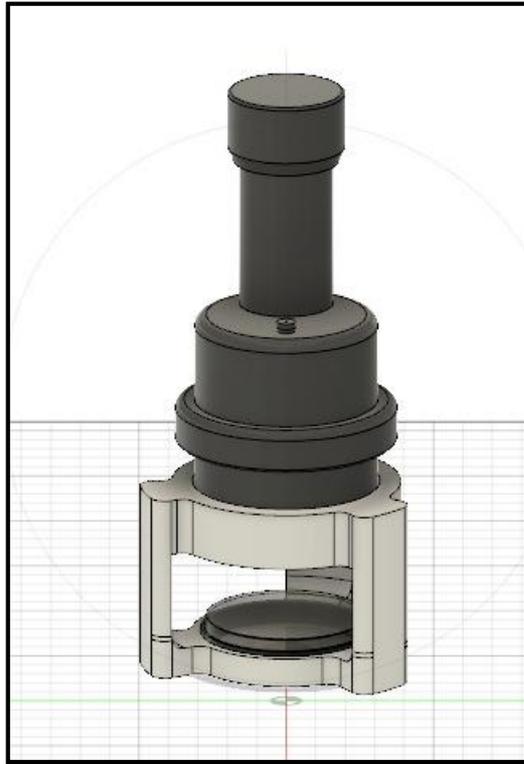


20 - Placa de petri con molde de agar en su interior y precintada con parafina



Misma placa vista de perfil y colocada boca abajo (así se colocará para disparar directamente a la zona donde se encuentran los gusanos congelados: orificio central pegados a la superficie superior de la placa en la imagen)

3.1.1.3. Set-up final



21 – Imagen tomada de la interfaz de trabajo del software Autodesk Fusion 360. Diseño del soporte (gris claro) donde se contiene la placa de Petri y, a distancia de 42mm se sitúa el transductor garantizando que el foco apunta a la zona de la placa Petri donde se han confinado los gusanos con el molde de agar.

Una vez localizado el foco del transductor y decidido el recipiente para contener los gusanos durante los disparos solo queda contar con un soporte donde sujetar la placa Petri dentro del medio líquido y garantizar que el transductor se mantiene siempre a la distancia focal óptima. Para ello, se ha diseñado un soporte (figura 18) en el software Autodesk Fusion 360 y posteriormente impreso en PLA (ácido poliláctico) con la impresora 3D Prusa i3.

A su vez, este soporte junto con el transductor y la placa Petri, serán introducidos en un baño de etilenglicol ($C_2H_6O_2$) a $-30\text{ }^{\circ}C$ (temperatura a la cual el anticongelante se mantiene aún líquido) para garantizar que el contenido de la placa Petri no se descongela durante su colocación y el disparo de ultrasonidos produce un aumento rápido de la temperatura (más adelante se detallarán las curvas de calentamiento en este set-up medidas con termopares).



22 - Proceso de colocación de soporte y el transductor en el baño de etilenglicol para disparar a la placa (en las imágenes no aparece la placa colocada, pero debería estar en la parte baja del soporte como se ha indicado anteriormente).

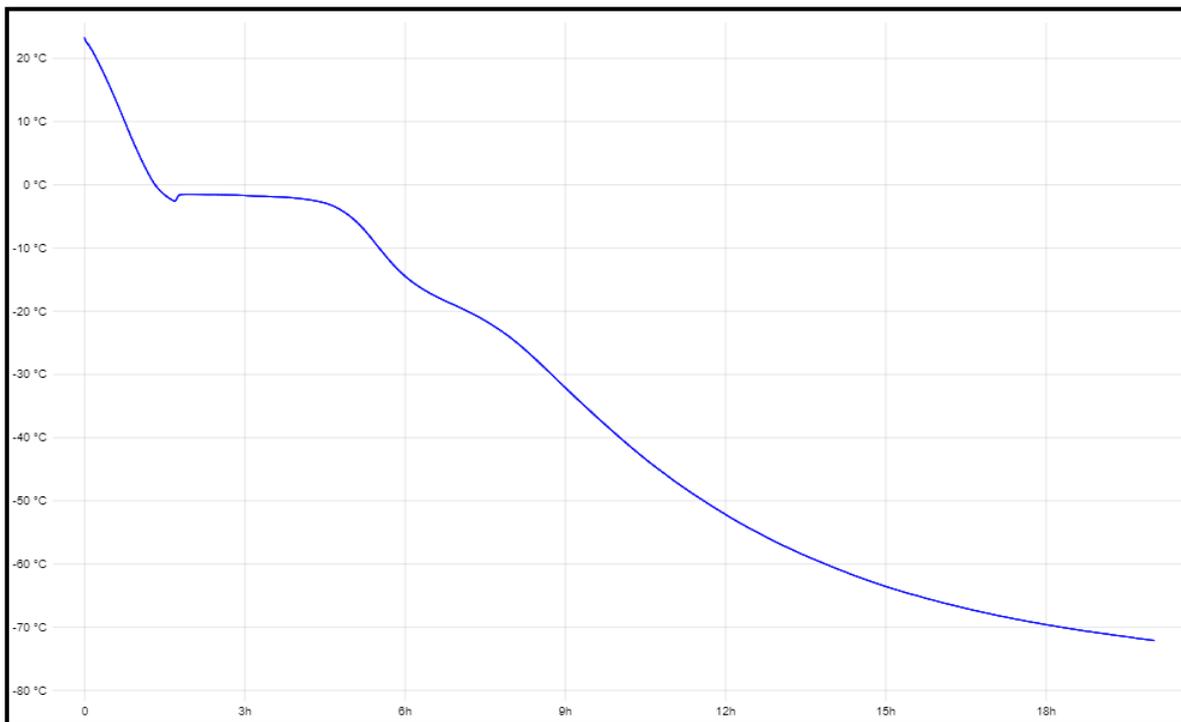
3.1.2 Preparación de las placas y congelación por slow-freezing

Para la preparación de las placas con los gusanos confinados en el molde preparamos primero la base de agar con 24 g de agar comercial por cada litro de agua. Después de disolver el agar en el agua, se vierte la sustancia sobre las placas utilizando puntas de pipeta azules para crear el molde con el agujero en el centro tal y como se observa en la *figura 21*.

Una vez se haya solidificado el molde, en el centro de la placa queda un hueco circular donde se introducen *C. elegans* sanos en una solución de S. Buffer con un 15 % de glicerol tal y como hizo Brenner en el año 1974 (lo que se considera hoy en día slow-freezing convencional). Seguidamente, se cierran las placas y se precintan con parafina, luego se introducen en la caja de porexpán de la *figura 5*, para asegurar un enfriamiento lento. Finalmente, se introduce la caja con las placas en el refrigerador de -80 °C disponible en laboratorios de la ETSI.



23 – Placas Petri después de haber vertido el agar en proceso de reposo hasta que este se solidifique



24 – Curva de enfriamiento de las placas de Petri con moldes de agar y una solución de S. Buffer con 15% de glicerol en el centro

Se ha medido la curva en enfriamiento que siguen las placas mediante el uso de termopares. Esta curva se ha medido a lo largo de una noche completa dado que el proceso de enfriamiento dura varias horas. Esta es la curva obtenida con el programa PicoLog.

La punta de los termopares se ha situado en la solución de S. Buffer-glicerol, para conocer la evolución exacta que siguen los *C. elegans* al ser enfriados. Como se puede observar, se necesitan unas 18h para alcanzar temperaturas inferiores a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se garantiza, por tanto, la condición de enfriar a velocidades inferiores a $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Merece la pena detenerse en el hecho de que esta velocidad variando por bloques:

- Primero se observa una zona de descenso lineal con una pendiente de $-0.33^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
- Seguidamente se alcanza el punto de congelación de la disolución S. Buffer-Glicerol al 15 %. Tal y como vimos en la sección 2.2, dado que el S. Buffer tiene una cantidad de 0.5 % NaCl en agua, esta no es suficientemente significativa en esta fase para diferir con respecto al diagrama de fases glicerol-agua (véase la *figura 3*). Este diagrama presenta la forma expuesta en la *figura 2*, de donde se puede extraer el dato de la temperatura de congelación de la disolución agua 85 % - glicerol 15 %, el cual se sitúa en torno a $-3\text{ }^{\circ}\text{C}/-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta temperatura coincide con la zona horizontal de la curva de la *figura 20* entre la 2h y las 4h de enfriamiento. Por tanto, se interpreta este segmento como un cambio de fase que mantiene la temperatura más o menos constante mientras comienza a formarse hielo.
- La última zona, tras el cambio de fase sigue una evolución asintótica con asíntota horizontal en $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ello implica, por tanto, una disminución progresiva de la velocidad de enfriamiento conforme se alcanza el valor asintótico.

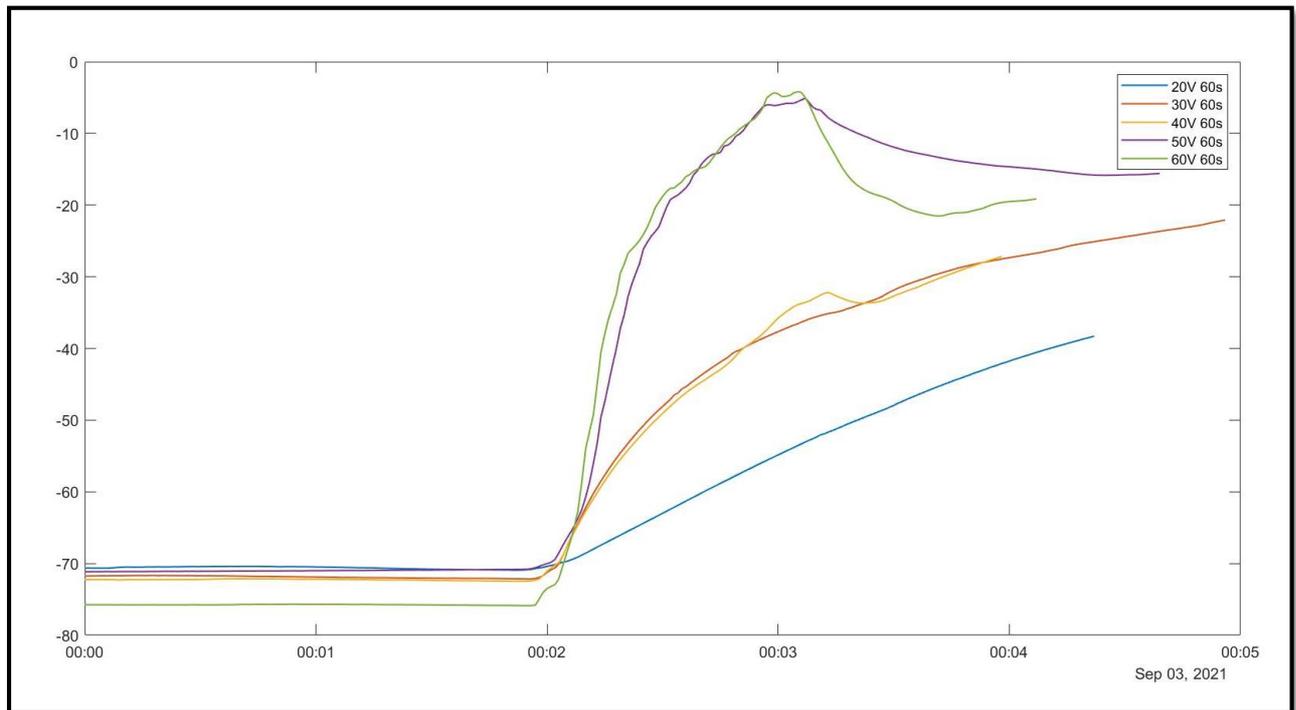
3.1.3 Recalentamiento con disparos a distintas potencias

En esta subsección, se detallarán las curvas de recalentamiento seguidas por los *C. elegans* durante el disparo con ultrasonidos. Las potencias con las que se han realizado mediciones son:

- 13,6W a 20V
- 33,9W a 30V
- 57.6W a 40V
- 90W a 50V
- 132W a 60V

Dado un voltaje seleccionado en la fuente de tensión, la intensidad, y por tanto la potencia, viene determinada puesto que la carga es siempre la misma. En la imagen siguiente se muestran las curvas de calentamiento que han seguido las placas a las potencias indicadas

arriba durante un tiempo de exposición de 1 min:



25 – Curva de recalentamiento seguidas por los *C. elegans* durante el disparo con los HIFU a distintos voltajes (y por tanto potencias). En el eje de abscisas se representa el tiempo en minutos.

Es fácil observar un aumento de la velocidad de recalentamiento a medida que se aumenta la potencia. Desde 15,6 °C/min a 20V hasta 69,2 °C/min a 60V de velocidad media. Cabe señalar que, aunque las curvas de 50V y 60V parezcan similares en la subida, debe tenerse en cuenta que el experimento de 60V se partió de una temperatura 5°C inferior por lo que la pendiente resulta ligeramente más pronunciada que en el caso de 50V.

En el apartado de *Resultados* se detallará la potencia y el tiempo de exposición óptimo para la máxima supervivencia.

3.2 Método de criopreservación de *C. elegans* mediante Liquidus Tracking

En la presente sección se procederá a describir los detalles de los experimentos realizados en el laboratorio siguiendo el método de Liquidus Tracking para la criopreservación de *C. elegans* en estado de vitrificación.

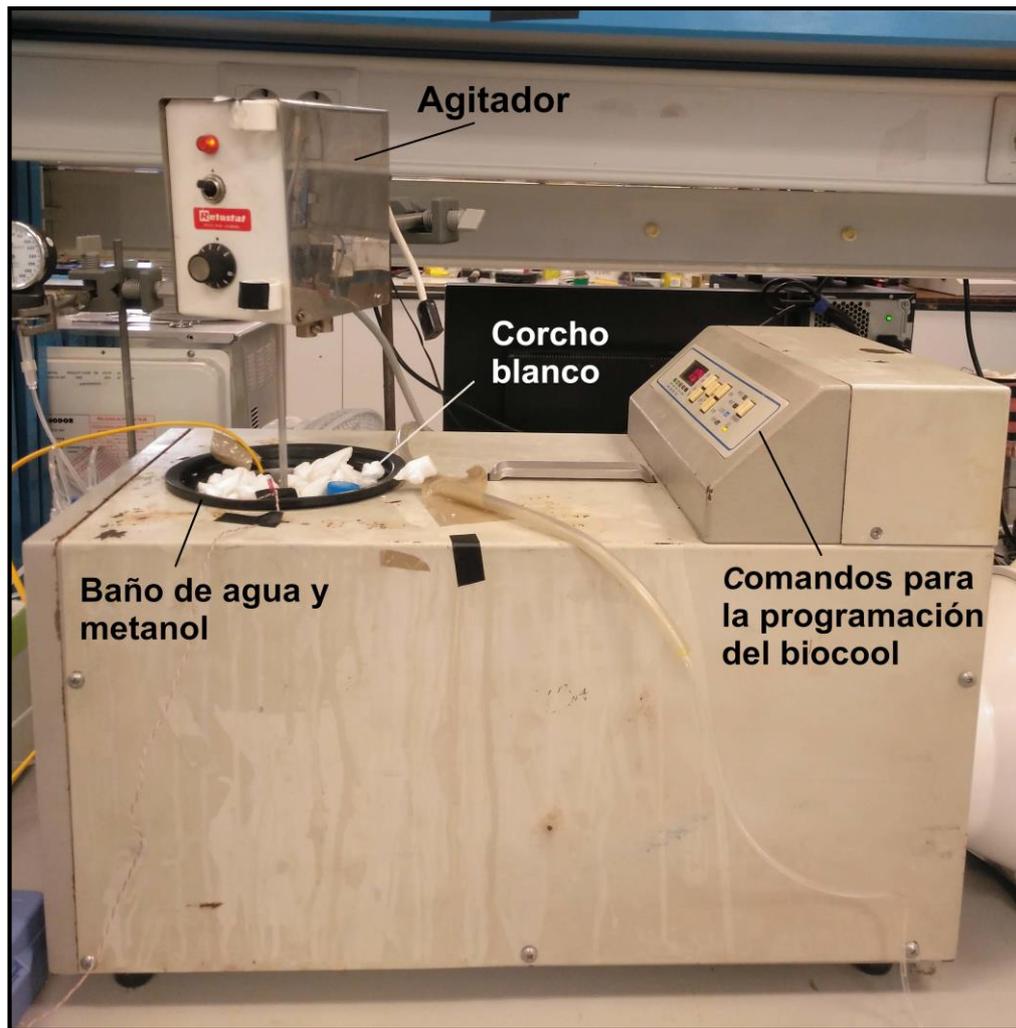
3.2.1 Preparación del set-up

Como se explicó en la sección 2.4, el Liquidus tracking es una técnica que requiere la adición progresiva de anticongelante en el medio de criopreservación de la muestra biológica a medida que desciende la temperatura. Este hecho, ha condicionado en gran medida el diseño del set-up. Además, se ha tenido en cuenta la necesidad de una transferencia de calor rápida, por lo que se ha optado por un recipiente con un ratio Superficie/Volumen alto que se explicará a continuación.

3.2.1.1. Biocool

Para realizar el proceso de enfriamiento progresivo, controlando la velocidad de enfriamiento en todo momento, se ha optado por empleo del llamado *Biocool*. El *Biocool IV Controlled Rate Freezer* de FTS Systems es un baño refrigerado mecánicamente con una rampa de enfriamiento única de velocidad controlada para muestras biológicas. Este baño suele llenarse con metanol o etanol que asegure un punto de congelación inferior a la temperatura de trabajo (-40 °C es la mínima temperatura alcanzada por el Biocool). Para su funcionamiento utilizado un controlador PID con una entrada en rampa que es programada previamente junto con las temperaturas de inicio y fin deseadas.

En la *figura 25*, se observan varias fotos del Biocool utilizado en el laboratorio. A la derecha se señalan una serie de botones junto con una pequeña pantalla a través de los cuales puede programarse la rampa deseada. A la izquierda se sitúa el baño de etanol y agua donde se introducirá la muestra. Este baño sigue la curva de enfriamiento programada y en la pantalla de los comandos se indica la temperatura de este en cada momento. Como puede observarse, este baño va recubierto de corcho blanco con el objetivo de aislarlo de la temperatura ambiente y evitar que “se escape el frío”. Finalmente, se señala el agitador, cuyo sistema consiste en dos palas que giran en torno a un eje vertical metálico. Su objetivo es mantener la temperatura del baño uniforme.



26 – Fotografía del Biocool utilizado en el laboratorio. Se indican con flechas las partes de este.

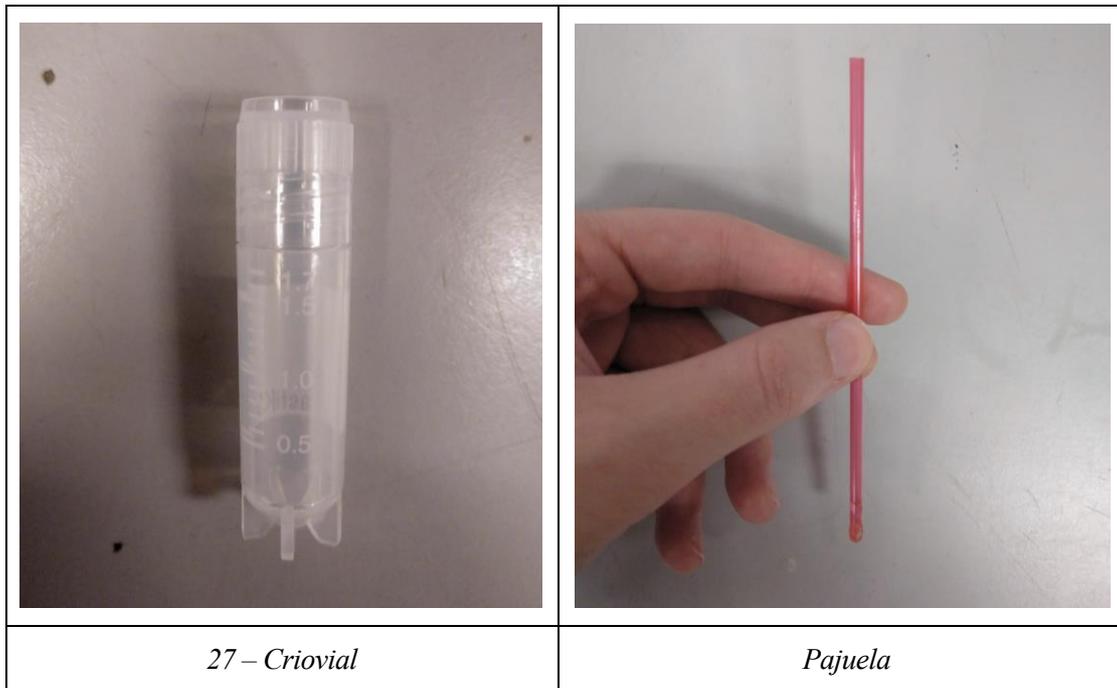
3.2.1.2. Elección de la pajuela como medio donde confinar los *C. elegans*

A la hora de elegir un recipiente donde contener los gusanos dentro del baño en el Biocool se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones que este debía cumplir:

- Debe permitir una transferencia de calor rápida (superior a la velocidad de enfriamiento del baño) para garantizar que los gusanos siguen la rampa de enfriamiento deseada en todo momento.
- Interesa un ratio superficie/volumen elevado, no solo para facilitar la transferencia de calor si no para garantizar la homogeneidad del enfriamiento de la muestra.
- Debe poder confinar volúmenes pequeños inferiores a 1ml para tener más fácilmente localizados los *C. elegans* en la solución de PBS y anticongelante.

- Debe permitir la introducción de anticongelante en distintas etapas y su mezclado efectivo con la solución de PSB para que el crioprotector llegue uniformemente a todos los nematodos.

Los candidatos eran principalmente dos: un criovial de 1,7 ml y una pajuela policarbonato.



El criovial permitía mayor facilidad para la introducción de anticongelante y su mezcla efectiva, sin embargo, hacía menos uniforme y rápida la transferencia de calor dado que el ratio superficie/volumen es menor que en el caso de la pajuela. Dadas estas circunstancias, se optó por utilizar la **pajuela** para alojar a los *C. elegans* dentro del baño del *Biocool*. La pajuela es una especie de pajita de beber cilíndrica de diámetro 1 mm y altura 110 mm. En un principio, la pajuela está libre por ambos orificios superior e inferior, sin embargo, interesa tener un único orificio por el que introducir y retirar la solución con *C. elegans* para evitar que se escapen de alguna manera. Es por ello que se ha sellado con pegamento epoxi uno de los orificios.

La elección de la pajuela condujo a la necesidad de buscar varias herramientas adicionales para permitir el desarrollo correcto de los experimentos y el cumplimiento de todas las condiciones descritas arriba.

3.2.1.3. Descripción de las herramientas adicionales ideadas para el set-up

Diversas ideas adicionales han sido pensadas para solucionar numerosos problemas que han ido apareciendo en el desarrollo de los experimentos. A continuación, se describen estos problemas surgidos y las herramientas pensadas para solucionarlos:

- ¿Cómo mantener la pajuela dentro del baño de etanol con orientación vertical en todo momento y el orificio libre fuera del baño para evitar que entre etanol y poder introducir el anticongelante durante el experimento?

La posición de la pajuela dentro de un baño de casi 1 litro de etanol puede ser difícil de controlar, para ello, se ha pensado la utilización de un trozo de espuma de polietileno, a la cual se le ha practicado un agujero de diámetro igual al de la pajuela por donde esta se introducirá y quedará sujeta a la altura que deseemos. El resultado es el que vemos en la *figura 27*.



28 – Pajuela insertada en un trozo de espuma de polietileno que funciona a modo de flotador

- ¿Cómo alcanzar el fondo de la pajuela con la pipeta para introducir la solución con gusanos y el anticongelante sin formar burbujas?

Ninguna de las puntas de pipeta del laboratorio son lo suficientemente alargadas y finas como para alcanzar el fondo de la pajuela. Este problema resulta más crítico de lo que parece: si no tenemos facilidad para depositar el anticongelante a cualquier altura de la pajuela, la mezcla no será efectiva y la disolución con *C. elegans* correrá el riesgo de congelarse. Para ello se ha hecho uso de otro modelo de pajuela, más fino que se ha pegado con epoxi a una

punta de pipeta amarilla, esta a su vez se engancha a la pipeta y el resultado es el que vemos en la *figura 29*.



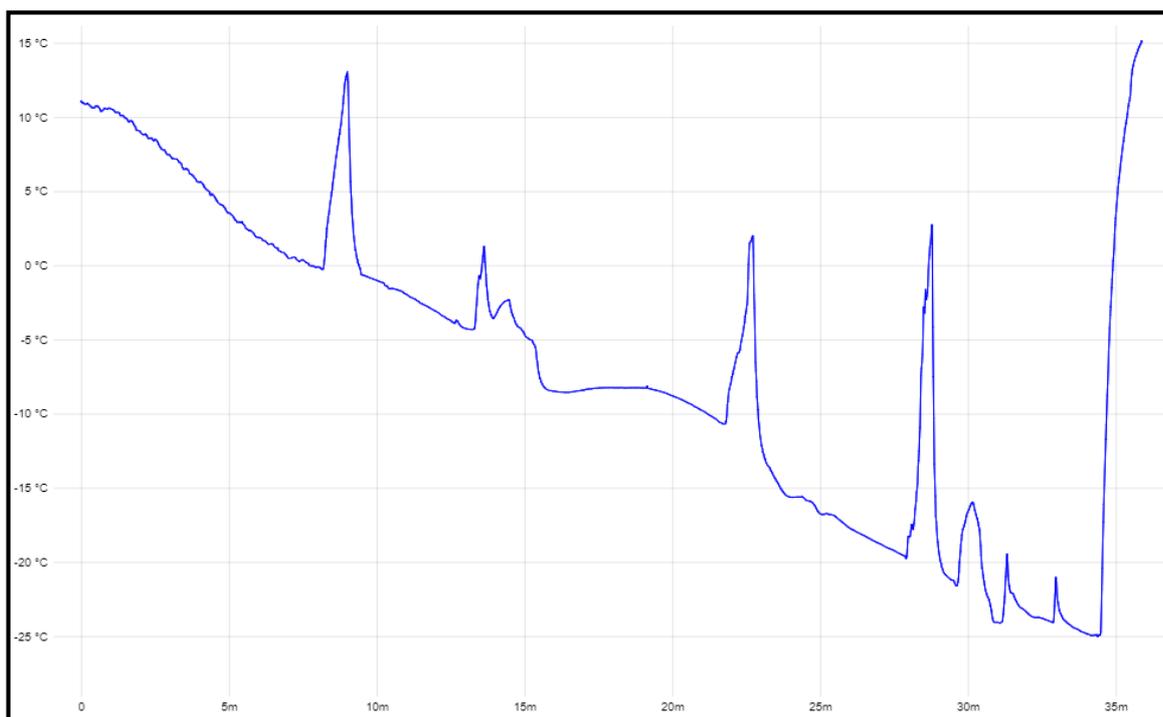
29 – Punta de pipeta amarilla con extensión a base de pegarle una pajuela de diámetro fino en su origen

- La adición de anticongelante en los distintos puntos del enfriamiento debe ser a temperatura similar a la de la mezcla de gusanos para no alterar su proceso de enfriamiento progresivo. Es decir, debemos meter el anticongelante también en el baño junto a la pajuela para que, al introducirlo en esta, la temperatura sea la misma y no haya choque térmico. Para ello, se ha rellenado un tubo de centrifuga de glicerol al 80 % (en el siguiente punto se explicará por qué no glicerol puro) y se ha hecho uso de un alambre que funciona a modo de gancho para mantener el tubo a flote apoyándose en los corchos blancos de su alrededor. El resultado es el que se observa en la *figura 30*:



30 - Detalle del baño de etanol del Biocool en el que se enfrían las muestras

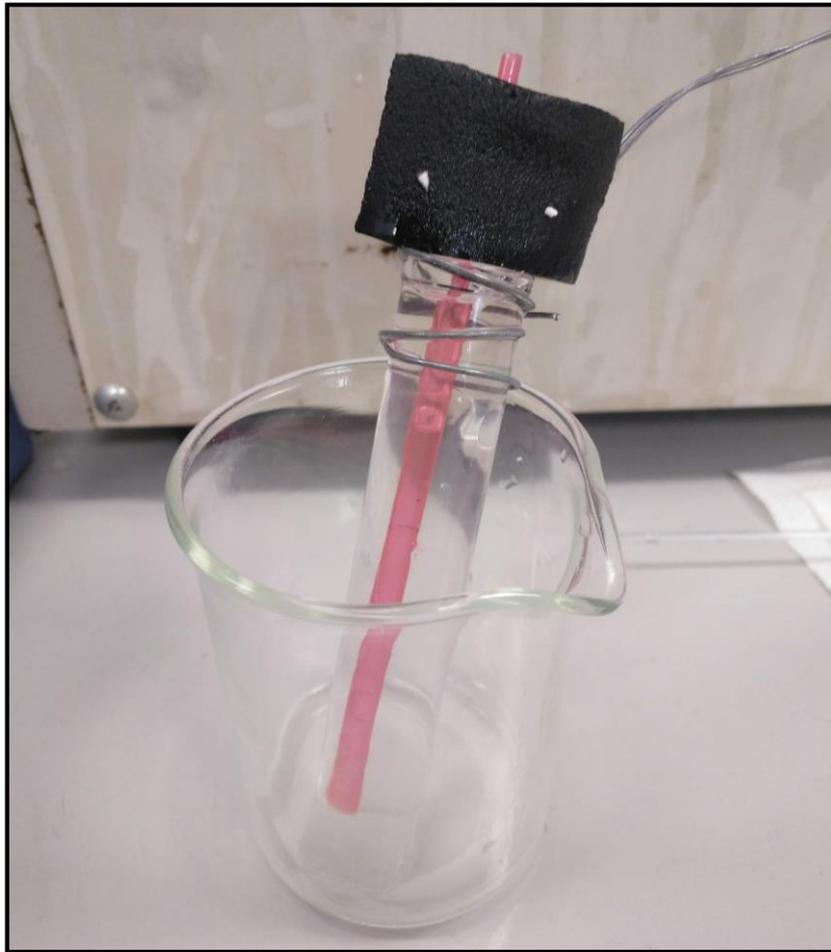
- El glicerol es una sustancia viscosa que hace difícil su pipeteo y, por tanto, la adición de esta a la disolución interior de la pajuela sin formar burbujas y permitiendo una buena mezcla. Además, la viscosidad del glicerol aumenta con la disminución de temperatura, es por ello que se ha decidido diluir el glicerol con un poco de S. Buffer de forma que la solución que mantenemos en el tubo de centrifuga tiene una composición de 80 % glicerol-20 % S. buffer. Así, la viscosidad se reduce significativamente (aunque no todo lo deseable) y facilita en gran medida su manejo.
- En el momento de introducir la pipeta en la pajuela, es muy recomendable poder observar que efectivamente llegamos todo lo posible al fondo de la pajuela sin verter la solución interior de esta. El objetivo de añadir el crioprotector de forma uniforme en la solución contenedora de los *C. elegans* marca la diferencia entre el éxito y el fracaso del experimento. Sacar la pajuela del baño para poder observar el pipeteo y volver a introducirla rápidamente después de la adición del anticongelante, no era una opción ambiciosa, aunque esa acción durara apenas 10 segundos. De hecho, se registró con termopares la evolución térmica de todo el experimento realizando la adición de anticongelante de esta forma. En la *figura 31* pueden observarse la curva registrada con el software PicoLog.



31 - Evolución térmica del experimento de *Liquidus Tracking* sacando la pajuela del baño para añadir el anticongelante

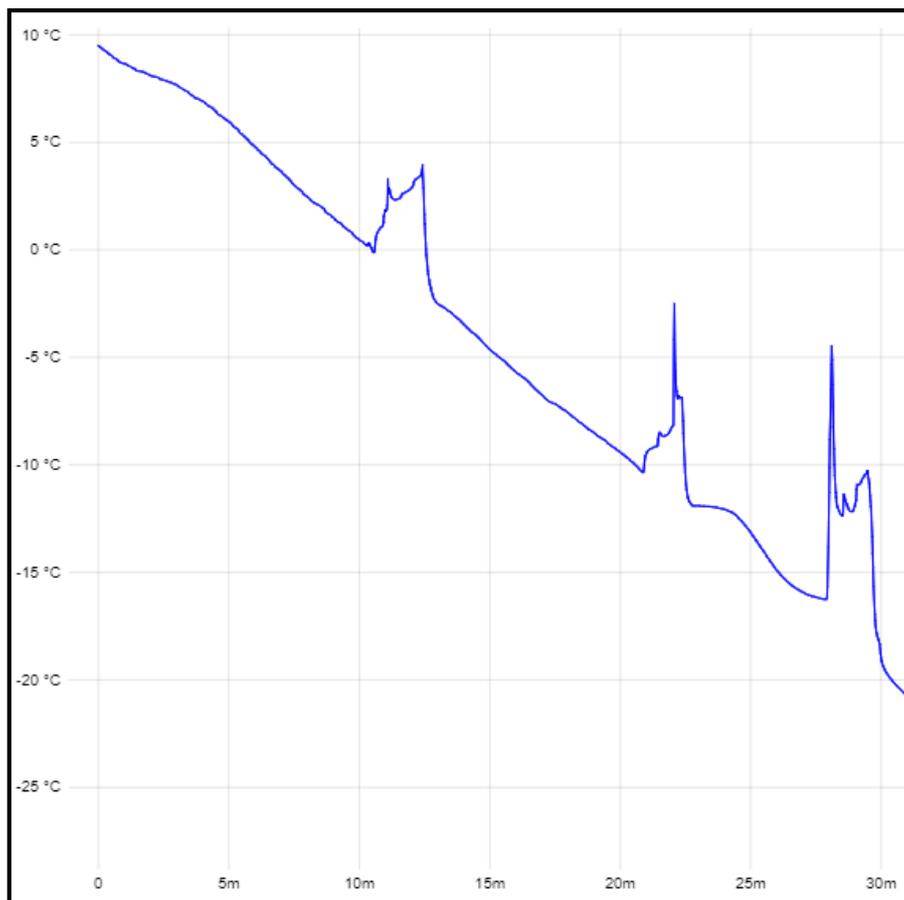
En el experimento realizado, la adición de glicerol se realizó en 3 etapas: una a 0°C, otra a -10 °C y otra a -20 °C. Puede observarse que estas coinciden con los picos observados en la gráfica (hay un pequeño pico en -5 °C que no debe tenerse

en cuenta pues correspondería a una rápida observación del estado de la pajueta. La subida de temperatura final corresponde con la retirada de la pajueta del baño al haber alcanzado la temperatura final de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.) Estos picos intermedios suponen un incremento de temperatura repentino superior a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ que no pueden despreciarse. Para subsanar este problema, se ha hecho uso de un pequeño tubo de ensayo transparente que se llenará del líquido del baño y se introducirá en él la pajueta para luego extraerlo y poder mantener la pajueta a temperaturas cercanas a las del baño durante varias decenas de segundos. En la *figura 32* puede observarse la pajueta introducida en este tubo en un momento de introducción de anticongelante en esta.



32 - Pajueta introducida en tubo de ensayo con el líquido del baño en su interior para evitar su calentamiento durante la adición de anticongelante

Aunque no obtiene una curva completamente lineal, esta solución permite subidas de temperatura mucho menores del orden de $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a lo sumo. Se registró también la curva de temperatura para el caso en el que se empleó este sistema y el comportamiento fue el que se muestra en la *figura 33*.



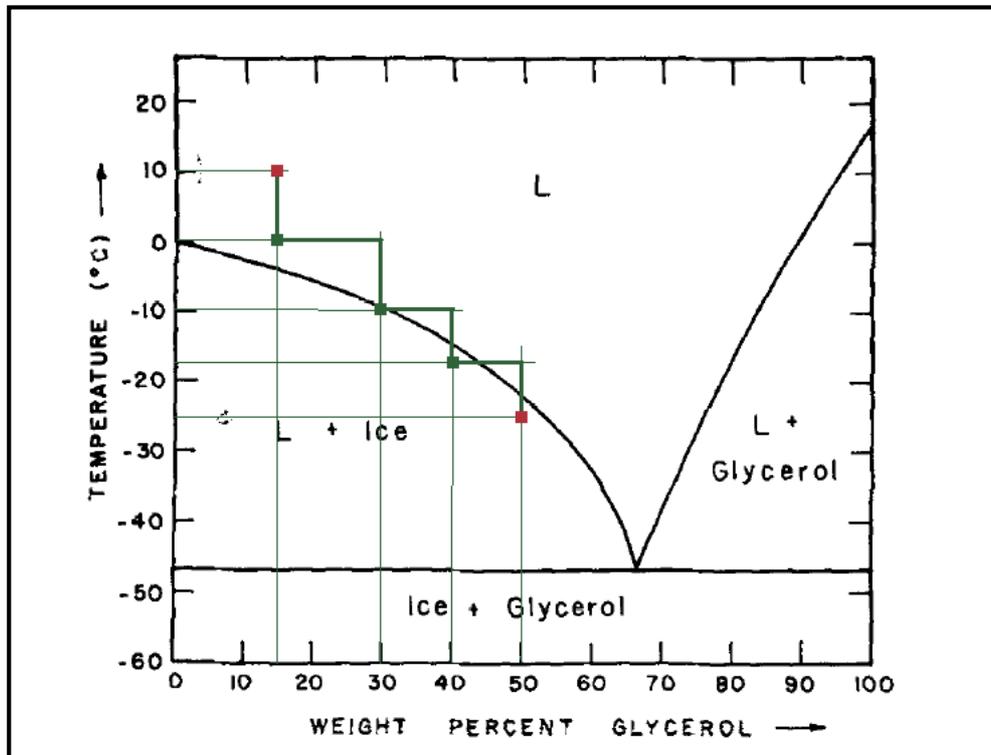
33 - Evolución térmica del experimento de Liquidus Tracking sacando la pajuela del baño para añadir el anticongelante utilizando el sistema del tubo de ensayo para mantener el frío

3.2.2 Descripción del experimento paso a paso

En esta subsección se procederá a describir detalladamente la evolución del experimento de liquidus tracking, tanto su diseño teórico como su ejecución práctica.

Antes de nada, debe diseñarse de forma teórica el seguimiento de la línea de liquidus de la solución glicerol-agua (dada la baja concentración de NaCl en S. buffer podemos simplificar su comportamiento térmico al del agua) estableciendo el número de puntos en los que se añade el anticongelante, el porcentaje de glicerol que se quiere obtener en cada momento y cuanta cantidad de glicerol hay que añadir para obtener en cada uno de estos puntos para obtener ese porcentaje de glicerol deseado. Se decide establecer una temperatura inicial de 10 °C en la rampa del Biocool en la cual se partirá con los gusanos en una solución de S. buffer con 15 % la cual son capaces de soportar durante varias horas incluso días (una concentración superior aumentaría exponencialmente la toxicidad para esa temperatura y los gusanos podrían morir fácilmente). Seguidamente, se establecen 3 puntos de adición de anticongelante en el diagrama de Liquidus Tracking con el fin de seguir la línea de liquidus de la disolución agua-glicerol dentro de la banda permitida que se describió en la sección 2.4, concretamente con la *figura 7*. Para explicar la evolución de nuestra disolución en términos de temperatura-

concentración, se hará uso del diagrama glicerol-agua sobre el que se ha dibujado la línea teórica seguida durante el experimento (véase la *figura 34*).



34 - Diagrama de fases glicerol-agua. Los puntos rojos indican la concentración y temperatura inicial y final. La línea verde gruesa indica la evolución seguida por la solución de gusanos durante todo el experimento.

Obsérvese que los puntos rojos representan la concentración y temperatura inicial y final, por otro lado, los puntos verdes son aquellos en los que se suministra glicerol a la solución produciendo un consecuente aumento de la concentración del crioprotector (línea horizontal). Seguidamente se produce un descenso de temperatura (línea vertical) debido a la rampa de enfriamiento del Biocool. Nótese que en todo momento la solución se sitúa en la banda de maniobra para el Liquidus tracking que se describió en la sección 2.4. El objetivo es seguir la curva de liquidus lo más fielmente posible, es por ello que un número mayor de puntos hace más óptimo el proceso, es una vía que queda por explorar en investigaciones futuras.

Para el cálculo de la cantidad de glicerol al 80 % que hay que añadir en cada punto para obtener las concentraciones de 30 %, 40 % y 50 % respectivamente se ha creado un script de Matlab que permite, a partir del dato del volumen inicial de solución de S. buffer con glicerol al 15 %, calcular los volúmenes de glicerol al 80 % que deben añadirse para obtener la concentración deseada en cada punto. En la *figura 35* se muestra una captura de la interfaz del Matlab con el código del script.

```
Vini=100; %volumen de la solución inicial (en microlitros)
Vt=Vini; %Volumen total en cada iteración (volumen máximo: 600microlitros)
Vgli=0.15*Vini; %Volumen de glicerol en todo momento
%porcentajes de glicerol para cada iteración
porc=[0.15 0.3 0.4 0.5]; % porcentajes correspondientes
% con las temperaturas: [10°C 0°C -10°C -18°C]
V2=zeros(3,1); %Volumen de glicerol al 80% que añadimos en cada iteración

for i=1:3
    V2(i)=(porc(i+1)*Vt-Vgli)/(0.8-porc(i+1));
    Vt=Vt+V2(i);
    Vgli=Vgli+V2(i)*0.8; %El glicerol que añadimos está al 80%
end

%Representamos graficamente la linea de T/%glicerol
T=[10 0 -10 -18];
plot(porc,T,'o')
xlim([0 1])
ylim([-25 25])
```

35 - Script de Matlab para el cálculo de volúmenes de glicerol al 80% que deben añadirse durante el Liquidus tracking

El bucle *for* calcula el volumen a añadir en cada punto según el porcentaje deseado (*porc*) y lo almacena en el array (*V2*), luego actualiza las variables *Vt* y *Vgli* para recalcularse en la siguiente iteración. El script dibuja además una gráfica temperatura-concentración donde se representa la posición de estos puntos donde debe añadirse el glicerol.

Dadas las dimensiones de la pajuela, se ha considerado 100 µl un volumen inicial adecuado. Al correr el programa con este volumen inicial, los volúmenes obtenidos para cada punto son los que se muestran en la siguiente tabla:

Temperatura	Porcentaje de glicerol deseado (%)	Volumen de glicerol al 80% que debe añadirse (µl)
0°C	30	30
-10°C	40	32,5
-18°C	50	54,2

Una vez preparado el set-up y diseñado el experimento a nivel teórico, se procede a realizarlo experimentalmente:

- 1) Inicialmente, se prepara la disolución de S. buffer con 15 % de glicerol donde se inyectan los *C. elegans*. Todo ello se conserva en un eppendorf de 2ml en la

vinoteca del laboratorio a 17 °C durante 20 °C. Esto permite que los gusanos vayan absorbiendo cierta cantidad de anticongelante en su interior.

- 2) Una vez transcurrida la espera, con la pipeta de punta de pajuela, se toman 100 µl de la disolución con gusanos y se introducen en la pajuela con cuidado de no formar burbujas. Se coloca la goma negra que hace de flotador en la pajuela y ya queda lista para ser introducida en el Biocool.
- 3) Se enciende el Biocool y se introduce la siguiente programación:

Temperatura inicial	10 °C
Temperatura final	-25 °C
Velocidad de enfriamiento	-0.7°C/min

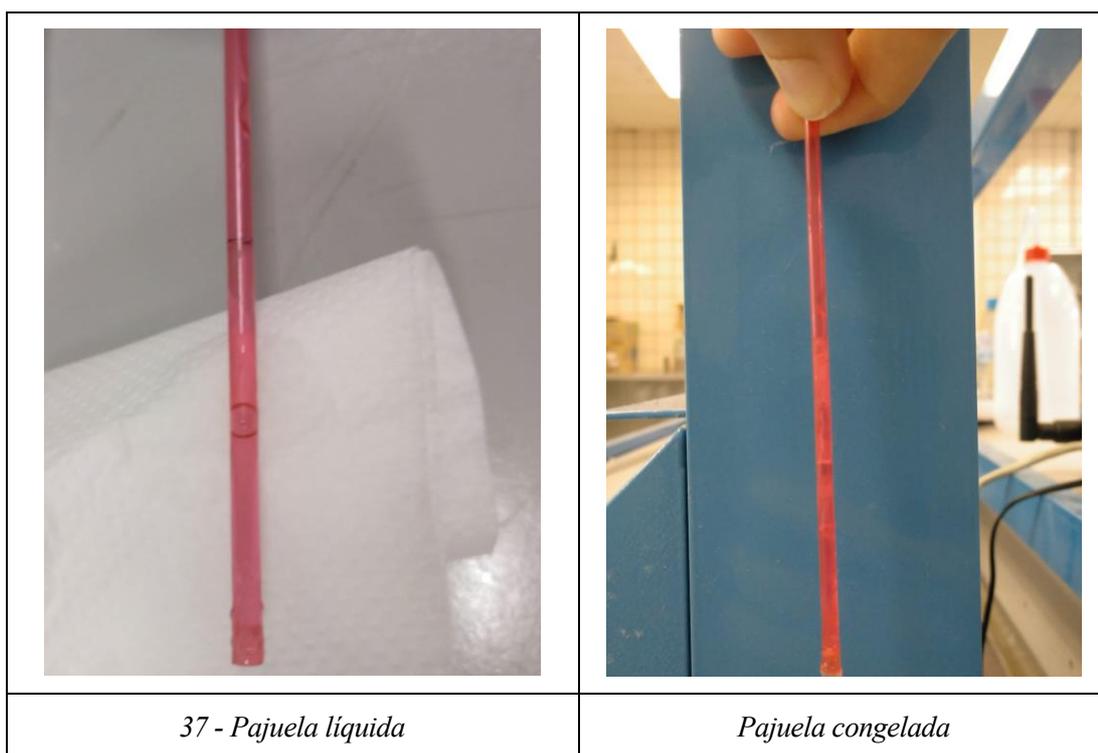
Interesa tener una velocidad de enfriamiento inferior a -1 °C/min por varios motivos: el más inmediato, para poder realizar las inyecciones de glicerol a una temperatura más o menos constante sin que afecte significativamente a la evolución de la rampa, también, por otro lado, los *C. elegans* deben tener tiempo suficiente para absorber las cantidades incrementales de glicerol y así alcanzar el estado de vitrificación a bajas temperaturas.

- 4) Se introduce la pajuela y el tubo de centrifuga con el 80 % de glicerol en el interior del baño. Una vez alcance la temperatura de inicio, comenzará la rampa controlada del Biocool.



36 - Set-up inicial. A la derecha, el display del Biocool marcando la temperatura del baño (temperatura inicial). En el baño están introducidos la pajuela y el tubo de centrifuga

- 5) Comenzado el proceso de enfriamiento del Biocool, debe esperarse a alcanzar la temperatura de cada punto para añadir el glicerol tomado del tubo de centrífuga también introducido en el baño. Como se ha explicado anteriormente, para realizar este proceso es muy importante asegurar la buena mezcla del glicerol con el resto de la solución, es por ello que se emplea el tubo de ensayo para recoger la pajuela a modo de cazo y extraerla fuera del baño donde se pueda realizar la inyección de glicerol pudiendo observar en todo momento que la mezcla se realiza correctamente. Una vez completada esta tarea con éxito, se devuelve el tubo de ensayo al baño donde se deposita con cuidado la pajuela procurando exponerla lo mínimo posible a la temperatura ambiente.
- 6) El proceso anterior debe repetirse en todos los puntos hasta que se alcanza la temperatura final de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7) A continuación, se retira la pajuela del baño, esta debe tener un aspecto líquido (no debe haberse formado hielo) como el que se muestra en la *figura 36*.



Inmediatamente después se procede al lavado de los gusanos para evitar que la toxicidad del crioprotector pueda ser perjudicial a temperatura ambiente. Esto se explicará en la subsección siguiente.

3.2.3 Proceso de lavado de *C. elegans*

Una vez retirada la pajuela del baño, el proceso de lavado debe ser rápido, pues el calentamiento hasta llegar a temperaturas cercanas al ambiente es del orden de minutos debido a la morfología de la pajuela. Se practicaron varios métodos menos óptimos antes de empezar a emplear este que se va a describir, el cual se ha elegido por su mayor eficiencia al eliminar el crioprotector de la solución con *C. elegans* y, por tanto, disminuir su posibilidad de intoxicación. Cabe decir que este sigue sin presentarse como un método óptimo, pero si asegura mejores resultados que los anteriores, puede demostrarse, de hecho, una mayor supervivencia cambiando únicamente el método de lavado.

- 1) Se extrae el contenido de la pajuela con la pipeta de punta de pajuela y se introduce en un eppendorf donde previamente se ha introducido una cantidad algo superior al volumen extraído de la pajuela (así reducimos la concentración de glicerol al 20 % aprox.).
- 2) Luego esperamos unos minutos a que los gusanos sedimenten en el fondo del eppendorf (una vía más óptima y pendiente de realización en líneas futuras es la utilización de una máquina centrífuga para enviar los *C. elegans* al fondo del recipiente en pocos segundos).
- 3) Tomamos una placa Petri vacía y con una pipeta vamos retirando de la solución con gusanos las capas superiores. Cada vez que retiramos una capa (de unos 80µl), observamos en la placa Petri con el microscopio si hay algún gusano en ella. Normalmente no suele haber ninguno en las primeras capas por lo que se logra reducir los gusanos a una solución de menor volumen.
- 4) Una vez retiradas las capas superficiales se vuelve a inyectar S. Buffer y pasados unos minutos se vuelve a repetir el proceso anterior.
- 5) Concentrados los gusanos en una solución de menor volumen y menor concentración de glicerol, se vierten una placa NGM (Nematode Growth Medium). Se cierra la placa y se precinta con parafina para evitar contaminaciones por otros agentes. Finalmente se incuba en la vinoteca a temperaturas en torno a 20 °C.

4 RESULTADOS

En este apartado se expondrán los resultados obtenidos en los diferentes experimentos. Además, se discutirá su relevancia y se valorarán otras vías posibles para mejorarlos.

4.1 Resultados de los experimentos realizados con HIFU

Tras haber solucionado todos los problemas mecánicos del disparo, se presenta la duda de cuál debe ser la potencia óptima de disparo. En la subsección 3.1.3, se despliega una interesante gráfica con la evolución térmica de la solución en la que se alojan los gusanos tras una batería de disparos a distintas potencias. Resulta esperable observar que para la potencia máxima de 132W, la pendiente de incremento de temperatura en el tiempo es también máxima. Aunque este comportamiento es, en principio el más deseable, no podemos descartar que la potencia sea demasiado elevada para ser soportada por los gusanos y que estos mueran quemados.

Los primeros experimentos se realizaron a 50V (90W) durante distintos tiempos de exposición de 30, 40 y 50 segundos. En ningún caso se observó supervivencia. Cabe destacar el aspecto constantemente observado de los *C. elegans* tras esos experimentos: aparecían claramente deshidratados (*Figura 38*), probablemente debido a un recalentamiento insuficiente o a un slow-freezing no realizado correctamente.

En consecuencia, se mejoró el slow-freezing introduciendo los gusanos en las placas de Petri a temperatura ambiente y cubriendo estas de abundante material aislante dentro de la caja de porexpán. Además, se midió la curva de enfriamiento con termopares (véase la figura 24) y se corroboró que no se superaba en ningún momento la velocidad de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Además, se comprendió que era necesario alcanzar temperaturas cercanas o superiores a 0 para evitar recristalización y teniendo en cuenta la pequeña bajada de temperatura que se produce durante la retirada de la placa del recipiente de etilenglicol. Es por ello que se decidió aumentar el tiempo de exposición de 60 segundos. Además, se agilizó la retirada de la placa del etilenglicol para que el decremento de temperatura final se minimizase. Con 50V y 60 segundos de exposición se obtuvo el primer resultado con supervivencia. Sin embargo, esta no superaba el 10 % de gusanos vivos.



38 – Imagen tomada del microscopio: *C. elegans* con aspecto deshidratado tras los disparos con HIFU a 50V y tiempos de exposición entre 30 y 50 segundos

Seguidamente, se decidió incrementar la potencia a 132W (límite soportado por la máquina), equivalente a 60V en la fuente de tensión. Para esta potencia, también se probaron varios tiempos de exposición entre 40s y 70s. El máximo de supervivencia de todos los experimentos realizados se obtuvo con esta potencia a 60s de tiempo de exposición. Este máximo fue de un 70 % de gusanos vivos lo que supone una notable mejoría respecto a la supervivencia observada en el slow-freezing convencional.

Puede concluirse de ello, que un rápido recalentamiento resulta claramente favorable y debe tratarse tan minuciosamente como el enfriamiento. Además, se corrobora la compatibilidad del material biológico con la exposición a este nuevo tipo de tecnología para el recalentamiento, siempre que su potencia y tiempo de exposición sean cuidadosamente controlados y adaptados al tipo de material que vaya a exponerse.

4.2 Resultados de los experimentos realizados por Liquidus Tracking

A continuación, se muestra una tabla donde se describen los experimentos realizados, así como los resultados obtenidos y los comentarios específicos que quepa realizar en cada uno de ellos:

Número	Descripción del experimento	Supervivencia	Comentarios
1	Batería de experimentos sin gusanos para la calibración y el manejo de los utensilios. Objetivo principal: acabar el experimento con la pajueta vitrificada, sin formación de hielo	-	Se consiguieron los objetivos planteados
2	Primer experimento con gusanos. PBS usado: M9 Velocidad de enfriamiento: 1°C/min Glicerol añadido a 0°C, -10°C y -18°C en las cantidades especificadas en la subsección 3.2.2	13 %	Sin formación de hielo. Formación mínima de burbujas
3	PBS usado: S. Buffer Tini=10°C Tfin=-25°C Velocidad de enfriamiento: 0.7°C Mismas cantidades de glicerol añadidas a 3°C, -5°C y -15°C	75 %	Sin formación de hielo, formación mínima de burbujas. Mejora en las condiciones de mezcla. Puede que la adición temprana de glicerol haya contribuido
4	PBS usado: S. Buffer Tini=10°C Tfin=-25°C Velocidad de enfriamiento: 0.7°C Experimento doble para comprobar la influencia de la adición de glicerol a distintas temperaturas. Mismas cantidades de glicerol añadidas, en una pajueta, a 0°C, -10°C y -18°C y en la otra a 3°C, -5°C y -15°	Alta supervivencia en ambos experimentos. Difícil para dar un dato debido al alto número de larvas L1 y L2 que, dado su tamaño, son difíciles de contabilizar	Sin formación de hielo y mínimas burbujas en ambos casos. Puede concluirse la existencia de esa banda imaginaria permitida en torno a la línea de liquidus de la que se habla en la sección 2.4
5	PBS usado: S. Buffer Tini=10°C Tfin=-25°C Velocidad de enfriamiento: 0.7°C Mismas cantidades de glicerol añadidas a 0°C, -10°C y -18°C Posterior introducción inmediata en el refrigerador de -80°C	2 %	Liquidus Tracking seguido de un slow-freezing en pajueta. Posterior recalentamiento rápido en agua a 40°C durante 5 segundos. Puede que la realización del slow-freezing en un recipiente no convencional en lugar de un criovial pueda haber afectado.

<p>6</p>	<p>Experimento de control: slow freezing con pajuelas y posterior recalentamiento a temperatura ambiente para comprobar la viabilidad de la pajuela como recipiente de los <i>C. elegans</i> en este experimento</p>	<p>No hubo supervivencia</p>	<p>Conclusión: se considera la pajuela como un recipiente inadecuado para la realización del slow-freezing</p>
<p>7</p>	<p>PBS usado: S. Buffer $T_{ini}=10^{\circ}\text{C}$ $T_{fin}=-25^{\circ}\text{C}$ Velocidad de enfriamiento: 0.7°C Mismas cantidades de glicerol añadidas a 0°C, -10°C y -18°C Posterior introducción inmediata en el refrigerador de -80°C tras haber trasladado la solución con gusanos en un criovial</p>	<p>No hubo supervivencia</p>	<p>Liquidus Tracking seguido de un slow-freezing en criovial. Los gusanos también fueron recalentados rápidamente, esta vez en agua a 30°C para evitar su exposición a temperaturas excesivas fuera de su rango de supervivencia habitual. Se desconoce el motivo de la muerte de los gusanos.</p>

En conclusión, se observan muy buenos resultados en los experimentos realizados con Liquidus tracking siguiendo la curva de enfriamiento hasta -25°C (temperatura a la que el metabolismo de los *C. elegans* está prácticamente paralizado). Los resultados de supervivencia, al igual que en los experimentos con HIFU, superan con creces los del slow-freezing convencional, haciendo la técnica de Liquidus Tracking altamente llamativa.

5 CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS

Este proyecto se plantea desde un primer momento con un papel iniciador de nuevas líneas de investigación, tanto en lo referente a los HIFU para el recalentamiento de muestras biológicas criopreservadas (un campo bastante poco explorado y del cual se muestran las primeras evidencias experimentales en este proyecto), como a la realización de experimentos de Liquidus Tracking con *C. elegans* (nunca antes llevados a cabo).

Los resultados favorables de Liquidus Tracking con *C. elegans* suponen una noticia esperanzadora a favor de esta técnica que se muestra plausible para organismos completos más allá de células aisladas o tejidos ya empleados en otros laboratorios [11] también con resultados que apoyan la viabilidad del Liquidus Tracking. Cabe decir que la supervivencia alcanzada en estos experimentos supera con creces la del método tradicional por slow-freezing presentado por Brenner lo que evidencia un avance en este sentido. Daniel Barranco et al. [8] ya demuestran en su artículo las ventajas de la vitrificación en la supervivencia de *C. elegans*, aunque el método utilizado en ese caso sea por enfriamiento ultrarrápido y no por seguimiento de la línea de liquidus como se expone en el presente proyecto.

Queda por investigar el alcance de temperaturas inferiores a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ donde la criopreservación a largo plazo es factible. Para ello, habría que explorar la viabilidad del slow-freezing tras alcanzar temperaturas en torno a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el LT donde las membranas de las células dejan de ser permeables y el metabolismo de los nematodos se ha paralizado prácticamente, o, por el contrario, probar un enfriamiento ultrarrápido que mantenga el estado de vitrificación y lo lleve a temperaturas criogénicas. En este punto debe mencionarse la importancia de explorar nuevos tipos de anticongelante, así como mezclas de estos que permitan ganar propiedades en cuanto a disminución de viscosidad, punto de congelación y toxicidad.

En lo referente a los *C. elegans*, aunque se ha demostrado en este estudio la supervivencia de todos los estados larvarios L1, L2, L3 y L4, aún queda por realizar un estudio más exhaustivo de la viabilidad de este método en todos los estados de crecimiento de los nematodos, incluida la etapa adulta. Por otro lado, cabe mencionar el carácter principalmente manual de este experimento, con todos los errores humanos que ello conlleva, los cuales deben optimizarse o automatizarse para eliminar la incertidumbre. En este mismo laboratorio ya se han comenzado experimentos de liquidus tracking con perfusión continua de anticongelante y PBS en la propia pajuela, pero aun sin resultados positivos debido a numerosos problemas mecánicos aún sin resolver.

Finalmente, esta técnica debe ser extrapolada a órganos humanos de mayor volumen, los cuales puedan ser criopreservados para el objetivo final de la creación de un banco de órganos de uso práctico en la medicina mundial.

En lo referente a los experimentos de recalentamiento realizados con HIFU, estos dan una evidencia de la compatibilidad de esta tecnología con material biológico sin provocar su muerte o daño severo. Sin embargo, la descongelación ultrarrápida para la cual están

previstos los HIFU no busca, en un primer momento, ser aplicada en organismos enfriados mediante slow-freezing, si no en organismos vitrificados que necesitan altas velocidades de calentamiento con el fin de evitar la formación de hielo en el proceso. Es por ello, que el próximo paso en esta vía de investigación será la aplicación de los HIFU en material previamente vitrificado.

Así mismo, queda pendiente la escalabilidad del sistema de HIFU para que pueda ser extrapolable al tamaño de un órgano humano. A. Olmo et al. [12] ya muestran una simulación de este hipotético sistema escalado, donde se cuenta con 26 transductores colocados en forma de esfera en torno al órgano que se busca recalentar con el fin de garantizar la homogeneidad del recalentamiento, objetivo que se alcanza con éxito en las simulaciones.

REFERENCIAS

- [1] Giwa, S., Lewis, J., Alvarez, L. et al. "The promise of organ and tissue preservation to transform medicine". *Nat Biotechnol* 35, 530–542 (2017).
- [2] J. K. Lewis *et al.*, "The Grand Challenges of Organ Banking: Proceedings from the first global summit on complex tissue cryopreservation," *Cryobiology*, vol. 72, no. 2, pp. 169–182, Apr. 2016.
- [3] Biological Miracle - Gates Of The Arctic National Park & Preserve (U.S. National Park Service)
- [4] Alcalá Guerrero, Enrique (2019). *Diseño y desarrollo experimental de sistemas y dispositivos electrónicos para el apoyo a la criopreservación mediante equilibrio termodinámico de órganos*. Trabajo Fin de Grado, Sevilla
- [5] S. Brenner, "THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS," *Genetics*, vol. 77, no. 1, 1974.
- [6] M. L. Shepard, C. S. Goldston, and F. H. Cocks, "The H₂O-NaCl-glycerol phase diagram and its application in cryobiology" *Cryobiology*, vol. 13, no. 1, pp. 9–23, Feb. 1976.
- [7] WIKIPEDIA: <https://es.wikipedia.org/wiki/Glicerol>
- [8] Daniel Barranco, Verónica Cabo-Ruiz and Ramón Risco, "High performance cryopreservation and recovery of *Caenorhabditis elegans* based on vitrification"
- [9] L. R. Girard *et al.*, "WormBook: the online review of *Caenorhabditis elegans* biology," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. suppl_1, pp. D472–D475, Jan. 2007.
- [10] J. FARRANT, "Mechanism of Cell Damage During Freezing and Thawing and its Prevention," *Nat.* 1965 2054978, vol. 205, no. 4978, pp. 1284–1287, 1965.
- [11] E. Puschmann, C. Selden, S. Butler, and B. Fuller, "Liquidus Tracking: Controlled Rate Vitrification for the Cryopreservation of Larger Volumes and Tissues."
- [12] A. Olmo, P. Barroso, F. Barroso, and R. Risco, "The Use of High-Intensity Focused Ultrasound for the Rewarming of Cryopreserved Biological Material," *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 68, no. 3, pp. 599–607, Mar. 2021.
- [13] Cava Pérez, José (2019). *Recalentamiento de material criopreservado mediante Ultrasonidos Focalizados de Alta Intensidad*. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Sevilla.
- [14] WIKIPEDIA: https://es.wikipedia.org/wiki/Efecto_termoel%C3%A9ctrico

