

Proyecto Fin de Máster  
Ingeniería Electrónica, Robótica y Automática

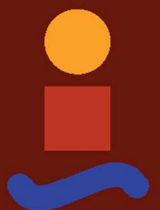
INGENIERÍA APLICADA A LA  
CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDOS PARA  
TRASPLANTES

Autor: Javier López Soria

Tutor: Ramón de Jesús Risco Delgado

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

Sevilla, 2022





Proyecto Fin de Máster  
Ingeniería Electrónica, Robótica y Automática

# **INGENIERÍA APLICADA A LA CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDOS PARA TRASPLANTES**

Autor:

Javier López Soria

Tutor:

Ramón de Jesús Risco Delgado

Profesor titular

Dpto. Física aplicada III  
Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2022



Proyecto Fin de Máster: INGENIERÍA APLICADA A LA CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDOS PARA  
TRASPLANTES

Autor: Javier López Soria

Tutor: Ramón de Jesús 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, 2022

El Secretario del Tribunal



# Resumen

---

La criopreservación es la conservación de material biológico a bajas temperaturas un tiempo indefinido. La técnica liquidus tracking o vitrificación por equilibrio capaz de preservar muestras más voluminosas con igual o mayor viabilidad en comparación con otros métodos. Esto es debido a que, mediante esta técnica, se evita la formación de hielo y la intoxicación propia a la adición de un anticongelante, mediante el control de la temperatura y la monitorización de la concentración de anticongelante.

La aparición de la criopreservación se debe a la necesidad de que los materiales biológicos sean capaces de aguantar más tiempo vivos para su utilización más tarde, teniendo ventajas en campos como en los distintos estudios biológicos o en las donaciones.

Este trabajo, consiste en la puesta a punto de un sistema de liquidus tracking, la creación de protocolos y su utilización para lograr recuperar aortas de ratón después vitrificarlas.

# Abstract

---

Cryopreservation is the conservation of biological material at low temperatures for an indefinite period of time. The liquidus tracking technique or equilibrium vitrification capable of preserving larger samples with equal or greater viability compared to other methods. This is due to the fact that, by means of this technique, the formation of ice and the intoxication caused by the addition of antifreeze are avoided, by controlling the temperature and monitoring the concentration of antifreeze.

The appearance of cryopreservation is due to the need for biological materials to be able to last longer in life for later use, having advantages in fields such as different biological studies or donations.

This work consists of the development of a liquidus tracking system, the creation of protocols and their use to recover mouse aortas after vitrifying them.



Resumen	7
Abstract	8
Índice	9
Índice de Tablas	11
Índice de Figuras	13
<b>1 Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2 Estado de la cuestión</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Criopreservación</i>	3
2.1.1 Fundamentos de la criopreservación	3
2.1.2 Enfriamiento de células	4
2.1.3 Problemas de la criopreservación	5
2.1.4 Métodos de criopreservación	5
2.2 <i>Vitrificación</i>	6
2.2.1 Antecedentes de la vitrificación	6
2.2.2 Proceso de vitrificación	6
2.2.3 Propiedades	6
2.2.4 Problemas en la vitrificación	7
2.2.5 Liquidus tracking	7
<b>3 Sistema liquidus tracking</b>	<b>9</b>
3.1 <i>Esquema general</i>	9
3.2 <i>Sistema de enfriamiento</i>	10
3.3 <i>Control de concentración</i>	11
3.3.1 Instrumentación	12
3.3.2 Programa Matlab	12
3.4 <i>Sistema de monitorización</i>	14
3.5 <i>Contenedor</i>	14
3.6 <i>Conclusión</i>	16
<b>4 Experimentos</b>	<b>17</b>
4.1 <i>Experimentos sin aorta</i>	17
4.1.1 Protocolo hasta -5°C	19
4.1.2 Punto de congelación de 25% de etilenglicol	19
4.1.3 Protocolo hasta -10°C	21
4.2 <i>Experimentos con aorta</i>	21
4.2.1 Protocolos a temperaturas positivas con aortas	22
4.2.2 Protocolos a temperaturas negativas con aortas	24
4.3 <i>Conclusión</i>	29
<b>5 Conclusiones</b>	<b>31</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>33</b>
A. <i>Calibración de las bombas</i>	33
B. <i>Calibración del refractómetro</i>	35



# ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1. Voltajes y ml en 1 minuto de la bomba de PBS.	33
Tabla 2. Voltajes y ml en 1 minuto de la bomba Crioprotector.	33
Tabla 3. Valores obtenidos en el refractómetro.	35



# ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1. El sistema automatizado de seguimiento de liquidus. Un recipiente de muestra central con el baño medio experimenta un aumento de la concentración de CP. Este crioprotector de alta concentración se inyecta desde un depósito externo usando bombas peristálticas. El volumen del baño medio es mantenido constante a través de la extracción del exceso de medio y CPA después de la mezcla.	8
Figura 2. Esquema general del sistema de Liquidus Tracking.	10
Figura 3. Bio-Cool IV controlador de velocidad de enfriamiento.	11
Figura 4. Interfaz del programa de Matlab para el control de la concentración.	13
Figura 5. Pseudocódigo del programa de Matlab. Los estados con forma rectangular son los que necesitan que se interactúen con el, los que tienen forma circular se van cambiando de estado automáticamente.	14
Figura 6. Esquema del área del baño.	15
Figura 7. Gráfica de los puntos de descongelación de distintas cantidades de concentraciones de etilenglicol.	18
Figura 8. Gráfica donde se representa el protocolo hasta $-5^{\circ}\text{C}$ , mostrando la temperatura y la concentración de etilenglicol.	19
Figura 9. Gráfica donde se representa el perfil teórico del experimento, mostrando la temperatura y la concentración de etilenglicol.	20
Figura 10. Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el experimento del 25%. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño.	20
Figura 11. Gráfica donde se representa el protocolo hasta $-10^{\circ}\text{C}$ , mostrando la temperatura y la concentración de etilenglicol	21
Figura 12. Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el protocolo hasta $1^{\circ}\text{C}$ con aorta. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño.	23
Figura 13. Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el protocolo hasta $0^{\circ}\text{C}$ con aorta. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño.	23
Figura 14. Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el protocolo hasta $-5^{\circ}\text{C}$ con aorta 1. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño. También se muestra la concentración de crioprotector que calcula Matlab.	24
Figura 15 . Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el protocolo hasta $-5^{\circ}\text{C}$ con aorta 2. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño. También se muestra la concentración de crioprotector que calcula Matlab.	25

Figura 16. Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el protocolo hasta  $-5^{\circ}\text{C}$  con aorta 3. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño. También se muestra la concentración de crioprotector que calcula Matlab. 25

Figura 17. Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el protocolo hasta  $-10^{\circ}\text{C}$  con aorta 1. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño. También se muestra la concentración de crioprotector que calcula Matlab. 26

Figura 18. Fotografía de las células después del proceso de comprobación de viabilidad, vistas con el microscopio. Los círculos que son círculos con el contorno negro. Las células muertas se tiñen totalmente de azul. 27

Figura 19. Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el protocolo hasta  $-10^{\circ}\text{C}$  con aorta 2. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño. También se muestra la concentración de crioprotector que calcula Matlab. 28

Figura 20. Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el protocolo hasta  $-10^{\circ}\text{C}$  con aorta 2. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño. También se muestra la concentración de crioprotector que calcula Matlab. 28

Figura 21. Gráfica con los datos calculado en la bomba de PBS con la línea de tangencia y su fórmula con el error. 34

Figura 22. Gráfica con los datos calculado en la bomba de crioprotector con la línea de tangencia y su fórmula con el error. 34

Figura 23. Gráfica de calibración del refractómetro. 35

# 1 INTRODUCCIÓN

---

En los últimos años se ha producido un gran interés por la preservación de material biológico, siendo la forma más conocida de todas la criopreservación, proceso en el cual células y tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre  $-80^{\circ}\text{C}$  y  $196^{\circ}\text{C}$ , para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de vida suspendida durante un tiempo ilimitado. A esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que conllevarían a la muerte celular, quedan efectivamente detenidas.

Dos son las técnicas que actualmente se han desarrollado, con multitud de variantes, con el objetivo de conseguir la conservación celular: el enfriamiento lento, también llamado *slow freezing*, y la vitrificación.

El enfriamiento lento es, con diferencia, el procedimiento más usado. Se basa en el control de la tasa de enfriamiento con el objetivo de crear un delicado equilibrio entre los distintos factores que causan daño celular, entre los que se encuentran la formación de hielo, las fracturas y la excesiva deshidratación de la célula [9].

La otra técnica que apareció más tarde es la vitrificación, considerada una mejora de la técnica de enfriamiento lento. Esto se debe a que elimina completamente la formación de cristales de hielo, los cuales suponen el mayor obstáculo para la criopreservación de células vivas [10]. Actualmente con la vitrificación, se ha sido capaz de criopreservar células aisladas con gran viabilidad.

La vitrificación es un proceso mediante el cual un líquido se solidifica en una fase no cristalina (fase vítrea) con un rápido descenso de la temperatura y un aumento en la viscosidad. Varios factores afectan la probabilidad de conseguir una adecuada vitrificación: viscosidad, volumen de la muestra, tasas de enfriamiento y recalentamiento.

Con el objetivo de incrementar la viscosidad de la muestra se utilizan los llamados agentes vitrificantes, también llamados crioprotectores, por su relación con la protección celular. Con algunos de ellos, como el dimetilsulfóxido (DMSO) o el etilenglicol (EG) se han conseguido buenos resultados. Sin embargo, las altas concentraciones necesarias de estos agentes crioprotectores para alcanzar la vitrificación resultan en una alta toxicidad que limita su viabilidad en muchos protocolos de criopreservación celular.

El incremento de las tasas de enfriamiento y recalentamiento aumenta la probabilidad de una adecuada vitrificación, haciendo necesario una menor concentración de agentes crioprotectores. La técnica más usada para conseguir altas velocidades de enfriamiento es la inmersión de la muestra en nitrógeno líquido. Para ello es necesario conseguir una eficiente transmisión de calor entre el nitrógeno líquido y el material celular, para maximizar la velocidad de enfriamiento. Con este objetivo, diferentes contenedores han sido aplicados para introducir células en nitrógeno líquido. Sin embargo, la velocidad de enfriamiento conseguida necesita aún una alta concentración de crioprotectores para producir la vitrificación.

La etapa de recalentamiento es incluso más conflictiva. Todos los procesos de recalentamiento se basan en el traspaso del contenido celular desde el nitrógeno líquido (donde se ha mantenido la muestra por tiempo indefinido) hasta un recipiente contenedor de una solución de recalentamiento (normalmente a  $37,5^{\circ}\text{C}$ ), pasando por el aire entre ambos contenedores. Este paso por el aire supone un grave inconveniente, pues durante este paso el recalentamiento tiene lugar a una velocidad muy lenta, en la que es imposible evitar la formación y el crecimiento de cristales de hielo.

La probabilidad de una adecuada vitrificación depende de la velocidad de enfriamiento, que a su vez depende del volumen de las muestras. El problema surge cuando, al no conseguir la velocidad de enfriamiento deseada, el crioprotector intoxica las células, provocando su muerte. Como solución a este inconveniente, aparece la técnica de *liquidus tracking*, que se basa en un enfriamiento de forma más lenta, donde se le va suministrando crioprotector mientras se va enfriando la muestra. Cuanto más baja sea la temperatura mayor cantidad de crioprotector pueda suministrarse. Este método se considera que será capaz de solucionar los problemas de creación de hielo e intoxicación para las muestras de mayor volumen [2].

El presente proyecto resolverá este problema a través del uso de la técnica de *liquidus tracking* para poder conseguir criopreservación de órganos, evitando la congelación y la intoxicación del mismo. Para lograrlo, se tendrán que crear protocolos de concentraciones y temperatura, que vayan aumentando la concentración, mientras baja la temperatura. También habrá que dejar tiempos donde se mantenga los dos valores, para que el crioprotector difunda correctamente a través del órgano y se empape a la concentración dada.



## 2 ESTADO DE LA CUESTIÓN

---

En este capítulo se va a efectuar un estudio del estado de la cuestión, es decir, de la vitrificación por *liquidus tracking*. Este constará de una revisión bibliográfica de los trabajos más destacables realizados hasta el momento.

El objetivo de este estudio es saber hasta donde se ha conseguido llegar en la técnica de vitrificación por *liquidus tracking* y los métodos que se han desarrollado para conseguirlo.

### 2.1 Criopreservación

#### 2.1.1 Fundamentos de la criopreservación

La criopreservación es el método para la conservación de material biológico más importante. Otros métodos existentes son la deshidratación o anoxia (ausencia total de oxígeno) que buscan también detener toda reacción química.

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionabilidad celular a temperaturas bajas. La criobiología se refiere a estudiar los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares, ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que ralentiza estas reacciones. Sin embargo, este no es un proceso exento de problemas, ya que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas, las cuales pueden alterar las membranas celulares, los orgánulos y la delicada interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar.

La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, su comportamiento durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia de la célula congelada. Los periodos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial del congelamiento y el periodo de retomo a condiciones fisiológicas, es decir, la fase de recalentamiento.

La obtención de un protocolo ideal para criopreservar es dependiente del conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de la célula y/o el tejido, puesto que este proceso está afectado por diferentes variables como la especie, el tipo y el estado de la célula a congelar. Las células tienen diferente tamaño y manejan diferente composición de solutos. En general, el éxito de la criopreservación está inversamente correlacionado con la complejidad de los sistemas biológicos congelados. Criopreservar células suele ser más fácil, a diferencia de hacerlo con ciertos tejidos, como el testicular o el tejido ovárico, porque el hecho de que estén formados por compartimientos los hace mucho más complejos.

La preservación en frío tiene como fundamento la reducción de las reacciones químicas a medida de que se baja la temperatura de el órgano. Se considera que al llegar a los  $-140^{\circ}\text{C}$  se detiene por completo todas las actividades metabólicas, pero el problema es conseguir la detención total de éstas, ya que actualmente no hay ningún método que sea capaz de enfriarlo sin producirle daño.

### 2.1.2 Enfriamiento de células

Las células están formadas en su interior por agua y sales en el interior, y en la periferia una membrana semipermeable que solo deja pasar el agua. Gracias a esta membrana, cuando el agua sale o entra, la concentración de solutos dentro de la célula aumenta o disminuye, respectivamente.

A la hora de enfriar una célula se deben tener en cuenta dos principios físicos: la ósmosis y el descenso del punto de congelación.

La permeabilidad celular juega un papel relevante en la supervivencia a baja temperatura de las células. Los movimientos de transporte activo de las moléculas se complican a bajas temperaturas y en las velocidades altas de enfriamiento y recalentamiento.

La ósmosis es un tipo de difusión pasiva especial donde a través de una membrana semipermeable, el diluyente pasa de la solución menos concentrada a la más concentrada para lograr el equilibrio entre zonas.

Debido al comportamiento de la membrana plasmática, el paso de agua a través de ella va a depender de la cantidad de soluto en el medio intra y extracelular. El agua pasará a través de la membrana hasta que la presión sea la suficiente para detener el flujo. Esta es la denominada presión osmótica. La presión osmótica se suele expresar en osmoles y depende exclusivamente del número de partículas disueltas (moles) por unidad de volumen, con independencia de su carga eléctrica, peso o fórmula química. Es por tanto una propiedad coligativa (propiedades de una solución que dependen únicamente de la concentración molal: de la cantidad de partículas de soluto por cada kilogramo de solvente) y no de la naturaleza o tipo de soluto.

Este fenómeno es muy importante en la célula, debido a que la membrana celular es semipermeable y, por tanto, sólo permite el paso de determinados iones o sustancias, y además separa dos soluciones: solución intracelular y solución extracelular.

En las soluciones extracelulares pueden ser de dos maneras respecto a la célula: hipertónica (mayor concentración en solutos), hipotónica (menor concentración en solutos) o isotónica (igual concentración en solutos).

Cuando es hipertónica el agua tiende a salir y en la célula se produce un fenómeno de contracción. Si es hipotónica pasará el agua al interior aumentando el volumen y pudiendo llegar a la rotura de la membrana. Por último, si es isotónica, no se produce difusión en ningún sentido puesto que se encuentra en equilibrio.

El punto de congelación es la temperatura en el que el líquido empieza a convertirse en un sólido cristalino. Esta temperatura es la misma que la de fusión, debido a que es el mismo proceso, pero en sentido contrario.

Para poder bajar esta temperatura se puede disolver un soluto dentro del líquido, esto provoca que la presión de vapor del disolvente baje respecto al puro y fuerce al punto de congelación a bajar para equilibrarse entre el líquido y el sólido.

Entonces al bajar la temperatura de congelación, se puede evitar la formación de cristales en el interior de la célula. El soluto que se le introduce se le llama crioprotector. Dependiendo de la concentración y el tipo de crioprotector utilizado varía el descenso crioscópico.

En función de los principios que se han presentado, en el enfriamiento aparecerán una serie de situaciones.

- Congelación de parte del medio extracelular: el calor se extrae antes de fuera que de dentro de la célula.

- Por medio del fenómeno de la ósmosis, el agua comienza a fluir a través de la membrana concentrándose el exterior celular.
- Al aumentar la proporción soluto/agua en el interior celular se va produciendo un descenso del punto de congelación.

### 2.1.3 Problemas de la criopreservación

A la hora de realizar la criopreservación puede aparecer distintos problemas:

- Si se utiliza una velocidad de enfriamiento demasiado alta se puede formar una gran cantidad de cristales provocando daños mecánicos a las membranas celulares, acarreado lesión que pueden ser irreversible en las células.
- Si se utiliza una velocidad de enfriamiento demasiado lenta, el crioprotector puede provocar una intoxicación, produciéndose una deshidratación.
- La pérdida de demasiada agua del citoplasma provoca una disminución del volumen celular, lo que conlleva como en el primer caso al daño mecánico en las membranas celulares.
- Puede ocurrir una precipitación del soluto por una saturación de este, dañando la supervivencia de la célula.

### 2.1.4 Métodos de criopreservación

Existen dos grandes métodos para realizar la criopreservación, que se distinguen por la velocidad de enfriamiento: el *slow freezing* que, como su nombre indica, la velocidad de enfriamiento es baja, y después está la vitrificación, que utiliza velocidades altas de enfriamiento.

En el *slow freezing* se realiza un enfriamiento muy controlado, de manera lenta, hasta llegar comúnmente a -80 °C. Este proceso se suele realizar en un congelador capaz de ser programado.

Durante el enfriamiento lento, las células se enfrían por debajo de su punto de congelación y el hielo se siembra en los medios extracelulares. Esto desemboca en un aumento progresivo en la concentración del soluto en el exterior. Como consecuencia, las células se deshidratan, y la formación de hielo se evita a nivel intracelular.

En este método se suele utilizar crioprotectores, los cuales se pueden introducir en un paso inicial o en varios pasos. La inclusión de los crioprotectores facilitan, aceleran y aumentan la supervivencia de las células.

Las desventajas de este método, son la lesiones producidas por los efectos de las soluciones intracelulares y extracelulares con alta concentración, además de las interacciones que puedan haber entre la célula y el hielo. Otras desventajas de este método es a la hora de la práctica, ya que se requiere un control en la tasa de enfriamiento y en la temperatura de sembrado, provocando variaciones en los resultados.

La vitrificación es un método físico de solidificación. En este método se le introduce una gran cantidad de crioprotector en las soluciones vitrificantes. Al realizar el enfriamiento, no llega a cristalizar pero si aumenta su viscosidad y pasa a un estado sólido no estructurado, con similitudes con el vidrio. Este proceso no suele durar mucho tiempo, ya que se busca altas velocidades de enfriamiento.

Cuando se esta enfriando la célula en la vitrificación, esta sufre una deshidratación y cuando se realiza en recalentamiento se hidrata. La deshidratación se provoca por la formación de hielo con el agua procedente

de la zona intracelular, haciendo que la concentración de solutos aumente en las áreas que no se congelan. Esto puede derivar en un efecto negativo en la supervivencia de las células.

## 2.2 Vitricación

### 2.2.1 Antecedentes de la vitricación

La importancia de la vitricación en el mundo de la criopreservación fue introducida por Luyet en 1937, que apuntó que en los sistemas vivos no puede ser compatible la cristalización, teniendo que evitarlo siempre. También, aseguró que en sistemas vivos pequeños, se podría enfriar a una alta velocidad, siendo capaz de eliminar la formación de hielo y crear en su lugar un estado muy parecido al vidrio.

El método después de un tiempo profundo de estudio se catalogó como un método útil, capaz de realizar la criopreservación de manera eficiente y rápida. Este método se ha utilizado para la recuperación de material biológico más voluminoso como los embriones.

Se ha conseguido recuperar distintos tipos de embriones y mejorando el protocolo, como los de ratones [11]. También se ha recuperado embriones de animales bovinos [12], en este caso mediante el uso de una mezcla de glicerol y propanodiol como crioprotector en altas cantidades.

Además, se ha conseguido el nacimiento en embriones criopreservados en ovinos [13] y caprinos [14], mediante un método de vitricación rápido y simple. Por último, también se ha conseguido la recuperación en embriones de humanos [15] y equinos [16].

### 2.2.2 Proceso de vitricación

De forma general se podría definir un vidrio como un líquido que ha perdido su capacidad para fluir, es decir, es un material sólido que tiene las características estructurales de un líquido. A grandes rasgos, la manera más habitual de alcanzar el estado vítreo es enfriar muy rápidamente, de tal forma que los átomos que componen el líquido no tengan tiempo de ordenarse para dar un cristal, sino que conservan su posición relativa en el momento del enfriamiento.

La temperatura umbral para la cual se produce la vitricación se denomina temperatura de transición vítreo,  $T_g$ . Por encima de ella tenemos una fase líquida subenfriada en la que los átomos pueden describir movimientos de translación muy amplios mientras que, por debajo, los átomos sólo pueden describir movimientos muy cortos alrededor de la posición de equilibrio. Enfriando muy rápidamente es como se consigue que los átomos se queden en la posición en la que estaban y no se ordenen según un cristal.

Como es evidente, el hecho de que un material vitrifique o cristalice con lleva a importantes diferencias en sus propiedades, las cuales son desarrolladas a continuación.

### 2.2.3 Propiedades

La velocidad de enfriamiento afecta en el volumen específico de un sólido vítreo, que normalmente es superior al del cristal, pero se reduce la diferencia cuanto más lento se enfría. El gran volumen del vítreo respecto del cristal, es porque mientras el cristal se ordena para ocupar el mínimo volumen posible, el vítreo no, comportándose como un líquido.

La entalpía específica también tiene un comportamiento parecido. Cuando ocurre la cristalización se produce un cambio brusco en la entalpía, algo que no ocurre en estado amorfo. Esto ocurre también en el volumen específico. Antes de convertirse en vítreo, el líquido se queda en un estado subenfriado.

El comportamiento con esta propiedad es parecido tanto en estado vítreo como en el estado cristalino. La transición está acompañada de un cambio brusco en la capacidad calorífica que, por otro lado, es de menor magnitud que el cambio que se produciría al formarse el cristal.

Vemos que al formarse un sólido vítreo se produce un cambio en la expansión térmica muy cercano al que tiene lugar al formarse un sólido cristalino. Este cambio no requiere del calor latente de solidificación ni de un cambio en el volumen específico, como en los casos anteriores.

La viscosidad va aumentando con el enfriamiento del líquido. La transición vítrea aparece cuando es tan alta la viscosidad que se llega a convertir en un sólido rígido.

#### **2.2.4 Problemas en la vitrificación**

El mayor problema de la vitrificación son las altas velocidades en el enfriamiento, evadiendo la deshidratación en las células y la formación de hielo. Esto en células aisladas es más fácil, pero el problema aparece en la utilización de muestras más grandes como órganos, donde presentan una conductividad térmica finita, por lo que no pueden llegar a estas altas velocidades de enfriamiento.

Para evitar este problema se usará la técnica de *liquidus tracking*.

#### **2.2.5 Liquidus tracking**

*Liquidus tracking* es una técnica de vitrificación donde se va aumentando la concentración de crioprotector mientras se va disminuyendo la temperatura. Este método evita la nuclearización del hielo a través de la introducción de la concentración ideal en cada temperatura. Además, como ventaja se obtiene una menor toxicidad por culpa de los crioprotectores, que son cuanto menor sea la temperatura, considerándose que a -25°C ya no son tóxicos.

Farrant [1] fue el primero en utilizar un método parecido a este, aproximadamente hace unos 60 años. En sus ensayos usaba diferentes recipientes con distintas temperaturas y concentraciones, e iba pasando las muestras biológicas en estos recipientes, modificando primero la concentración para que el crioprotector penetre correctamente y después traspasándolo a otro contenedor con menor temperatura. El objetivo de Farrant era evitar el efecto de las soluciones y mantener un valor constante de electrolitos durante el procedimiento.

Pegg utilizó durante varios años esta técnica, uno de los ejemplos es la criopreservación en cartílagos articulares [6], consiguiendo un 70% de viabilidad. El sistema que utilizaba es el mostrado en la Figura 1.

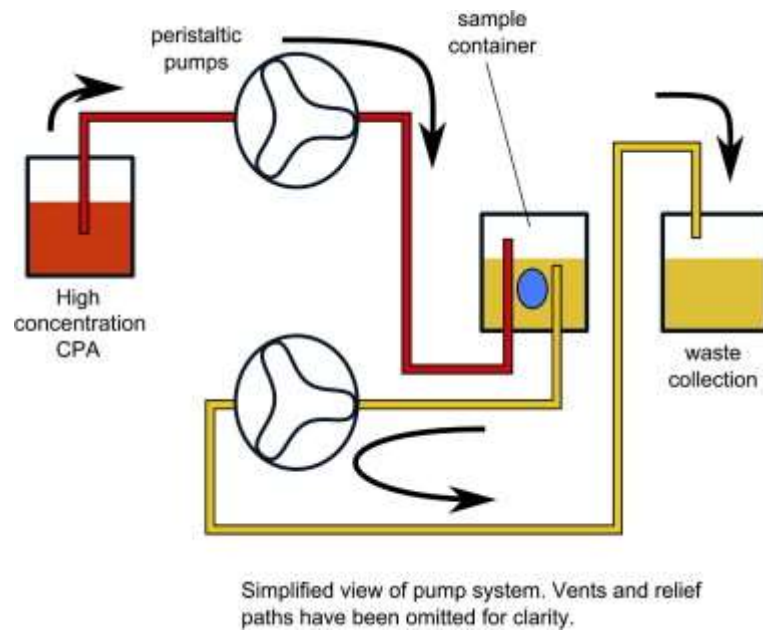


Figura 1. El sistema automatizado de seguimiento de liquidus. Un recipiente de muestra central con el baño medio experimenta un aumento de la concentración de CP. Este crioprotector de alta concentración se inyecta desde un depósito externo usando bombas peristálticas. El volumen del baño medio es mantenido constante a través de la extracción del exceso de medio y CPA después de la mezcla.

Igual que Pegg, otros estudios han conseguido utilizar la técnica con tejidos y volúmenes más grandes, que es el objetivo de esta técnica [2]. Otros organismos que se han recuperado son cultivos de células [3] y óvulos [4][5].

## 3 SISTEMA LIQUIDUS TRACKING

---

*Liquidus tracking* es un método de criopreservación donde se controla el enfriamiento y la concentración de crioprotector. El crioprotector siempre tiene que estar en un rango que evite la congelación y la intoxicación del material biológico. Este control deberá tener en cuenta hasta que se llegue a  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  donde ya no se considera tóxica ninguna cantidad de crioprotector.

En este capítulo se va a presentar el sistema que se ha diseñado para realizar el *liquidus tracking*. Se compone de un contenedor donde se almacenan las aortas, el cual se introduce en el Biocool, que es un baño de rampa controlada que enfría la muestra y se monitorizando a lo largo del experimento. El porcentaje de crioprotector se ajusta a través de un Arduino controlado por Matlab, el cual indica el voltaje introducido a las bombas peristálticas.

### 3.1 Esquema general

El sistema de *liquidus tracking* cuenta con cuatro partes bien diferenciadas:

- El sistema de enfriamiento, que se realiza en una máquina Biocool.
- El sistema de control de concentración, que se basa en un Arduino y dos bombas peristálticas.
- El sistema de monitorización, compuesto por distintos sensores.
- El contenedor, donde se deposita el material biológico.

El sistema que se ha montado para realizar la criopreservación por *liquidus tracking* se muestra en la Figura 2 de manera esquemática.

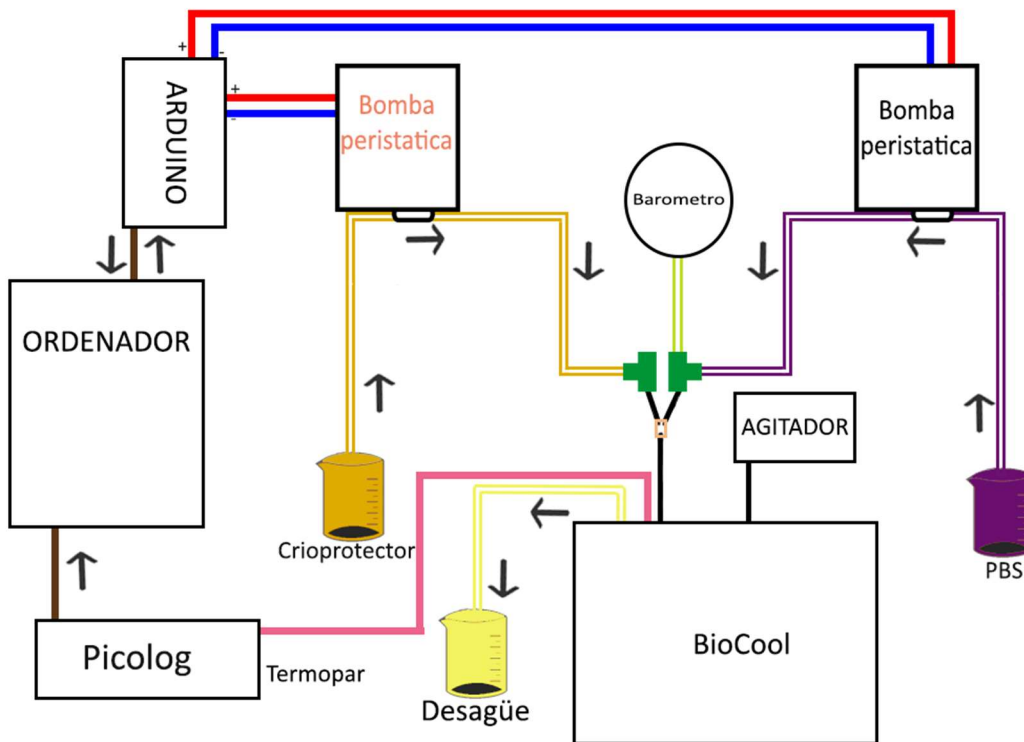


Figura 2. Esquema general del sistema de Liquidus Tracking.

El esquema mostrado en la Figura 2, los tubos se muestran como líneas huecas, los cables como líneas rellenas y las líneas negras agujas.

### 3.2 Sistema de enfriamiento

El Biocool IV (BC-IV-40) es el encargado del sistema de enfriamiento y el control de éste. Esta máquina es un controlador de velocidad de enfriamiento de Biocool®, el cual se produce sobre un baño, se puede ver la máquina en la Figura 3.

El control de temperatura se realiza a través de rampas donde se deben de indicar tanto las temperaturas de inicio como final, así como la pendiente de enfriamiento ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). Después de realizar la rampa se tiene que especificar el tiempo de mantenimiento en la temperatura final. Para que se obtenga una temperatura homogénea en todo el baño, se necesita un agitador que mezcla continuamente el líquido del baño del Biocool, que está formado por 50% de agua y 50% de alcohol etílico.





Figura 3. Bio-Cool IV controlador de velocidad de enfriamiento.

### 3.3 Control de concentración

El nivel de concentración del contenedor de la aorta se controla a través de un Arduino Mega 2560 que alimenta a dos bombas peristálticas que hacen que fluya el crioprotector o PBS (de *Phosphate Buffered Saline* en inglés) al recipiente donde se encuentra la aorta. El PBS es una solución tamponada que contiene sales y demás compuestos (NaCl y D-Glucosa) que necesita la aorta para sobrevivir. El programa que se ha cargado en Arduino está realizado por Matlab. Este programa se basa en crear rampas de concentración, donde se debe indicar la concentración final y el tiempo en el que se debe realizar.

Las bombas peristálticas se controlan a través de la salida PWM de Arduino y tienen una retroalimentación por sensores de efecto hall, para controlar el caudal suministrado. A fin de utilizar las bombas, se necesita calcular sus respectivas funciones que relacionen el caudal (ml/min) que suministran y el voltaje (V) de alimentación, por lo que necesitan una calibración previa. La calibración se puede ver en el Anexo A.

Para calibrar las bombas se suministran distintos voltajes y se observa cuantos mililitros ha suministrado en un minuto en una pipeta graduada de plástico. Una vez realizado la prueba con varios voltajes, se calcula una función que relacione el caudal (ml/min) con el voltaje (V).

Para comprobar el correcto funcionamiento del sistema de control de concentración, se realizó una prueba del programa con distintas concentraciones, verificando que a la salida del contenedor que la concentración es la misma que la teórica.

Las bombas tienen un offset de funcionamiento, por lo que tienen un límite inferior que controlan cuanto caudal pueden suministrar. También está el problema de que las bombas tienen una sensibilidad, por lo que irá cambiando el caudal en grandes pasos. Estos problemas se han solucionado vertiendo en el vaso de crioprotector PBS para que no sea 100% puro. Por lo tanto, se va a tener un vaso con 100% de PBS y otro con una concentración de crioprotector variante, que cambia según la máxima cantidad de crioprotector que se quiera tener en el contenedor durante un protocolo.

Por último, se ha comprobado el correcto funcionamiento del sistema de control de concentración. Se ha realizado una prueba del programa con distintas concentraciones y se ha comprobado a la salida del

contenedor que la concentración es la misma que la teórica, para ello se ha utilizado un refractómetro.

El refractómetro debe de haber sido previamente calibrado. Para conseguir dicha calibración se han utilizado distintos eppendorfs con diferentes concentraciones de crioprotector, se ha calculado una función, cuya entrada es el valor que nos proporciona el refractómetro y la salida es el porcentaje de concentración. La calibración se puede ver en el Anexo B.

Después de tomar distintas medidas se ha comprobado que el control de concentración tiene un pequeño error que no llega a ser crítico.

### 3.3.1 Instrumentación

Como se ha contado anteriormente, se va a utilizar un Arduino Mega 2560, que es una placa de desarrollo basada en un microcontrolador ATmega2560. Este tiene unas 54 entradas/salidas digitales, las cuales 15 de ellas tienen PWM y 16 entradas analógicas. El Arduino siempre debe estar conectado al ordenador mediante conexión USB, ya que a lo largo de su ejecución le tendremos que seguir introduciendo nuevos datos y nos mostrará también datos.

Los sensores están alimentados por la fuente que suministra Arduino de 5 voltios y todas las tierras deben estar conectadas a la de Arduino. Tiene dos salidas digitales en los puertos de PWM, conectadas a las bombas. La salida D5 es para controlar la de PBS y la D6 para controlar la de crioprotector.

En el Arduino hay conectado 4 entradas analógicas. Los sensores hall están conectados a las entradas A1 y A2. Para el efecto hall se tiene en las bombas dos imanes colocados para que cada vez que pasen por el efecto hall indica que ha completado la mitad de una vuelta. La entrada analógica A15 es para el sensor de presión.

El termopar max31865 está conectado a los pines digitales de 50-53, que son los pines de MISO, MOSI, SCK y SS, respectivamente.

### 3.3.2 Programa Matlab

El programa de Matlab tiene una interfaz que es mostrada en la Figura 4. Los botones importantes son el de "PBS-FILLING" que sirve para hacer el cabeceo de la bomba de PBS y el botón de "CRIO-FILLING" con la misma función pero para la del crioprotector. El botón "OFF" es usado para parar de ejecutar un código y el "RESET" para borrar todas las variables y que se pueda ejecutar otra orden.

En el bloque de "App selection" siempre elijeremos "Ramps" que es para realizar un protocolo con rampas. Una vez ejecutado la rampa nos pedirá un caudal (ml/min) y concentración (%) inicial. Una vez puesto las condiciones iniciales nos pide el caudal y concentración final y el tiempo con el tiempo que queremos que se realice la rampa. Cada vez que llega al final de una rampa el programa vuelve a solicitar las concentraciones y el caudal final, tomando como condiciones iniciales las del punto anterior donde finalizó la rampa. El tiempo que se introduce siempre es el total de todo el protocolo. Si se quiere que se mantenga constante, se introducen los mismos datos finales que iniciales.

En la parte de la derecha de la interfaz tenemos varias gráficas; "Flow" que es el caudal en ml/min a lo largo del tiempo y "Volumetric Fraction\*100" que es el porcentaje de caudal que está inyectando cada bomba sobre el total. También tiene dos gráficas más, "Pressure" y "Temperatura", que muestran la presión y la temperatura a lo largo del protocolo, respectivamente.

Al finalizar el programa registra un excel con los siguientes datos: tiempo, caudal de la bomba de PBS, la del crioprotector, el porcentaje volumétrico, la molaridad, la temperatura, los voltajes de las bombas de PBS y Crioprotector, y la presión.

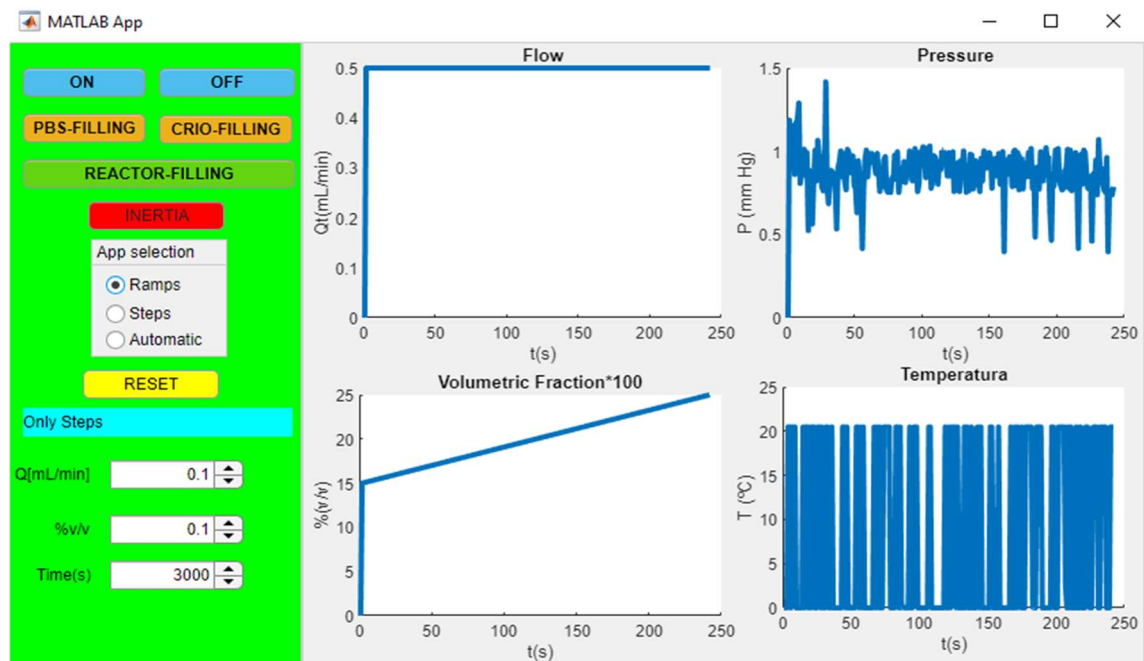


Figura 4. Interfaz del programa de Matlab para el control de la concentración.

El pseudocódigo del programa se puede ver en la Figura 5. Empieza cuando se pulsa el botón de rampa que se ha comentado anteriormente, saltando después una ventana donde nos pide que indiquemos el caudal máximo inicial en ml/min y la concentración inicial de crioprotector. Justo después se pide que el valor final del caudal máximo, de la concentración y el tiempo en que queremos que se realice.

Ahora el programa entra en bucle calculando los caudales iniciales y finales de cada bomba. Como el frasco de vidrio contenedor de crioprotector no tiene una pureza del 100%, si no que está diluido en PBS, hay que realizar un ajuste. Se toma el porcentaje de crioprotector que queremos aplicar multiplicarlo por el caudal máximo y dividirlo por el porcentaje de crioprotector que hay en el frasco. El caudal del recipiente de PBS puro, se calcula restando el caudal máximo con el de la bomba de PBS. Los caudales calculados son los iniciales y finales en las bombas. Luego se calculan los caudales que hay que suministrar en este momento por cada bomba, a través de una interpolación.

Ahora tomamos el tiempo que tarda en dar media vuelta cada bomba, que se identifica porque cuando pasa el imán, el sensor de efecto hall suministra una tensión de 0.2 V. Con esto se sabe cual es el caudal suministrado en cada bomba, que es el que se registra en el excel. También si la velocidad no es la correcta, se usa el caudal para un paso más adelante.

En los últimos pasos, calculamos los voltajes que hay que suministrar a las bombas, gracias a su calibración mostrada en el Anexo A. Una vez suministrado el voltaje, ya solo quedaría tomar los datos de temperatura y presión, y actualizar las gráficas que se muestran en la interfaz y se guardan los nuevos datos en un excel.

El proceso desde la interpolación hasta el guardado de datos, se repite hasta que el tiempo actual sea igual al final de la rampa, que es cuando se solicita otra vez los valores finales de la rampa. Hay que tener en cuenta que el tiempo siempre es el total, si acabamos de hacer una rampa de 120 segundos, e introducimos en el tiempo de la nueva rampa 180 segundos, la rampa nueva se realizará en 60 segundos. Además, los valores iniciales de las nuevas rampas son los finales de la anterior. Para acabar el programa se tendrá que poner en el tiempo de la rampa el valor de -1 en el tiempo. Mientras se está poniendo los nuevos valores de la rampa, se deja en las bombas el último voltaje introducido.

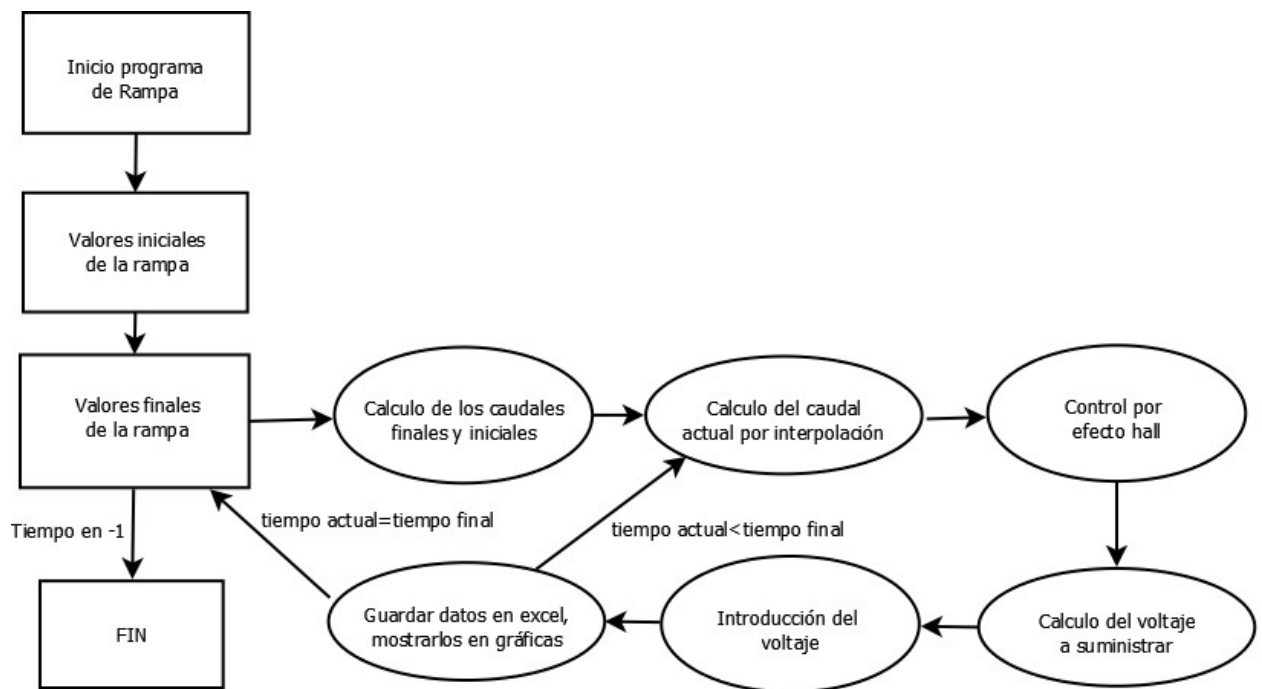


Figura 5. Pseudocódigo del programa de Matlab. Los estados con forma rectangular son los que necesitan que se interactúen con el, los que tienen forma circular se van cambiando de estado automáticamente.

### 3.4 Sistema de monitorización

El sistema tiene dos variables que necesitamos saber: la presión en el contenedor de la aorta y la temperatura.

La presión se calcula a través de un barómetro analógico que está conectado en la entrada del crioprotector, como todo el sistema de tubos está conectado entre sí, la presión debe de ser igual en todas las zonas. Un aumento repentino y alto en la presión, indica que el contenedor se ha congelado.

La temperatura se calcula a través de termopares de cobre/constantán conectados en un interfaz de termopar de ocho canales Pico (PC-08), conectados al ordenador con el programa software PicoLog. Dos termopares están colocados dentro del contenedor y uno en el baño.

El software de PicoLog toma las medidas de los termopares y las representa en una gráfica. La toma de datos las empezamos a tomar cuando empieza el protocolo. Las gráficas las podemos guardar luego en PDF o también guardar todos los valores en un CSV. Siempre que finalice un protocolo se guarda tanto en PDF como en CSV para tener disponible siempre los datos.

### 3.5 Contenedor

Anteriormente se ha comentado que en el baño del Biocool se introduce un contenedor donde se almacena la aorta a criopreservar. Este contenedor es donde se quiere controlar el porcentaje de crioprotector. El esquema del contenedor se puede ver en la Figura 6.

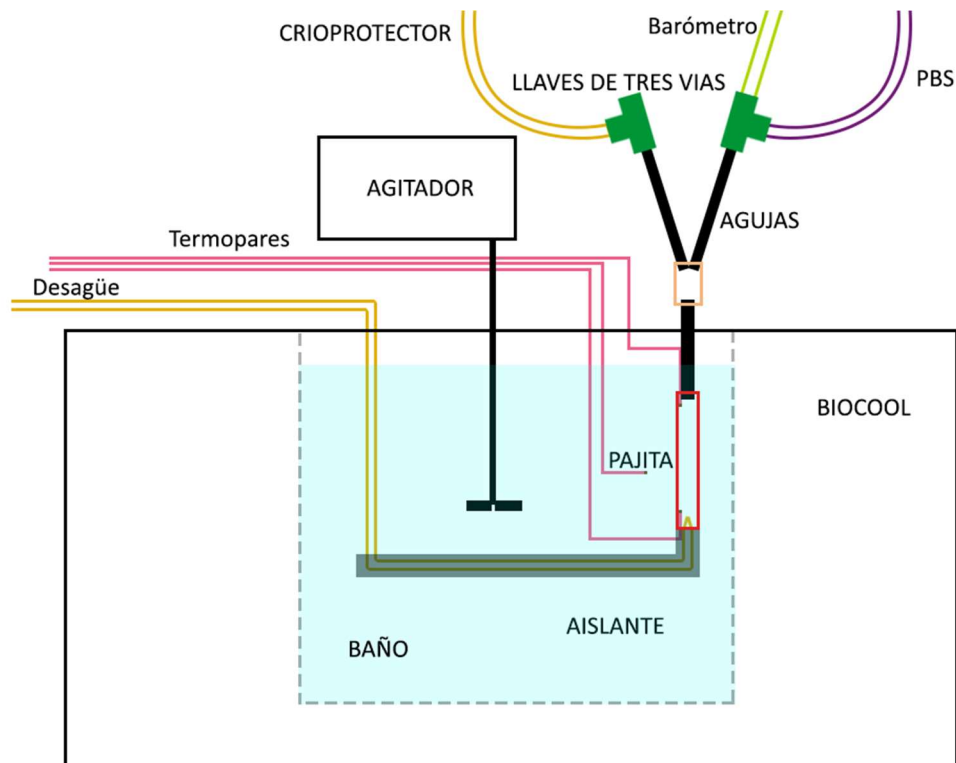


Figura 6. Esquema del área del baño.

El contenedor empieza con dos llaves de tres vías, por una de sus entradas se introduce el PBS y por otro el crioprotector, también en una de las llaves se conecta el barómetro. Estas llaves tienen en la salida una aguja que acaba en un vestíbulo donde se mezclan los dos líquidos. Las agujas están puestas en el contenedor para que se cree la mezcla más homogénea posible. El contenedor tiene una salida en la parte inferior con una aguja Abbocath. La parte inferior de la aguja es introducida en el baño del Biocool para que el líquido se vaya enfriando para que llegue a la temperatura deseada en donde se encuentra la aorta.

La aguja está conectada a una pajuela que está completamente introducida en el baño. En la pajuela es donde se introduce la aorta. A la salida de la pajuela se encuentra el desagüe, que evacua la solución crioprotectora del sistema.

La entrada del desagüe tiene forma de cono, el cual se introduce dentro de la pajuela, funcionando como tapón. La punta del cono, que es por donde se evacua el líquido, debe ser lo suficientemente estrecho para que la aorta no se cuele por ella. El primer tramo del desagüe está dentro del baño y como está en la parte inferior del baño, donde están las temperaturas más bajas y la concentración de crioprotector siempre va con bastante retardo de la indicada por el programa, tiene dos aislantes que le protegen del congelamiento.

En el contenedor hay colocados dos termopares; uno en la entrada de la pajuela y otro a la salida. El termopar a la salida es el que tiene la temperatura más parecida al de la aorta.

### 3.6 Conclusión

En este capítulo se ha descrito el sistema con el que se va a realizar el *liquidus tracking*, exponiendo las distintas partes de las que se componen.

Primero se ha explicado el sistema de enfriamiento, por el que se usa el Biocool y se basa en la utilización de rampas de temperaturas y tiempo de mantenimiento de la temperatura final.

La otra parte del sistema que se ha explicado es el control de concentraciones, que se basa en un Arduino que controla dos bombas peristálticas. Este sistema se ha tenido que calibrar para su utilización.

Con la presentación de todo el sistema de liquidus tracking, quedaría probar su funcionamiento, a través de distintos experimentos.

## 4 EXPERIMENTOS

---

En el capítulo anterior se ha explicado el sistema de *liquidus tracking*, por lo que este capítulo se centrará en comprobar su correcto funcionamiento. Para ello se va a realizar primero una serie de experimentos sin aorta, donde se probará distintos protocolos para llegar a la máxima temperatura negativa con la menor cantidad de crioprotector.

Después de haber concentrado los protocolos se replicarán con la aorta y se comprobará la viabilidad entregándosela al equipo biológico del laboratorio.

### 4.1 Experimentos sin aorta

En este apartado se van a realizar distintos protocolos buscando la mínima cantidad de crioprotector que se tiene que suministrar al contenedor para que no congele. El crioprotector que se va a utilizar es el etilenglicol.

Además de interesar que el sistema no se congele, se busca que la temperatura del termopar de abajo, que es donde se encuentra la aorta, sea muy parecida a la del termopar que está fuera. Esto indicaría que el control de temperatura que aplica el Biocool se haría directamente en la zona de la aorta.

También hay que tener en cuenta que el sistema existen una serie de inercias, por lo que la cantidad de concentración de crioprotector tiene que estar adelantada entre 1 y 2 minutos para que la concentración en la zona de la aorta se corresponda con la deseada a cada temperatura.

Antes de realizar un protocolo se hizo un experimento donde se comprobó a qué temperatura se descongelaban las distintas concentraciones de crioprotector estudiadas. Para realizar el experimento se introdujo una serie de eppendorfs con concentraciones desde el 5% al 40% con pasos del 5%. El baño se programó a -25 °C y se dejó que se calentara solo.

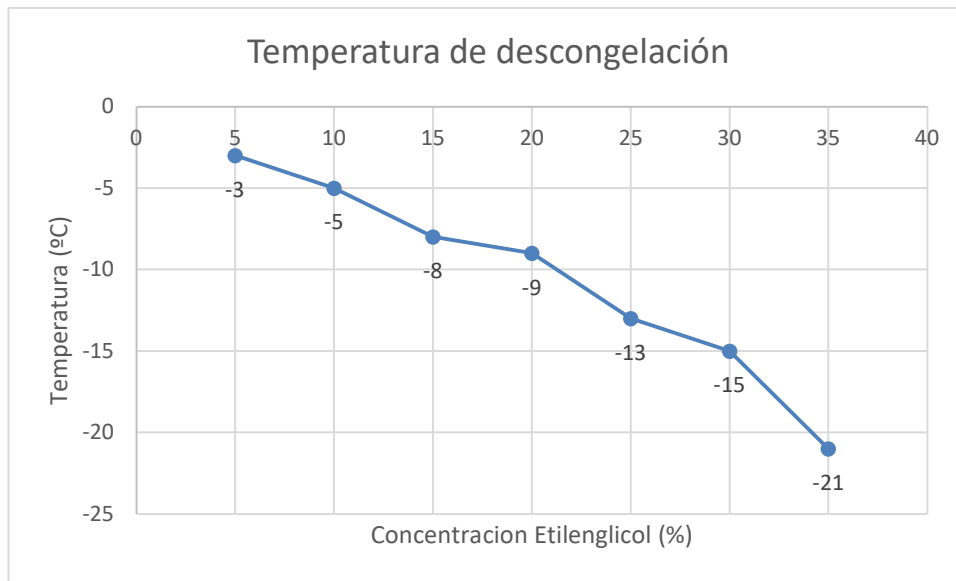


Figura 7. Gráfica de los puntos de descongelación de distintas cantidades de concentraciones de etilenglicol.

Los datos obtenidos en este experimento se muestran en la Figura 7. El eppendorf con concentración 40% no se congeló a  $-25^{\circ}\text{C}$ . Con estos datos se consigue obtener una idea general de cuáles son los porcentajes de concentración que hay que aplicarle a cada temperatura. Aunque estos datos se obtienen con el líquido estático, al aplicarle un caudal conseguirá evitar el congelamiento en temperatura más bajas a las calculadas.

En los protocolos, además de rampas, habrá un tiempo de mantenimiento de la temperatura final o *holding time*. El objetivo de estos experimentos es asegurar que el sistema no se congela, extrapolando que los desarrollados en aorta la difusión de crioprotector será la adecuada y no se congelará.



#### 4.1.1 Protocolo hasta -5°C

El primer protocolo que se va a realizar tiene como temperatura final -5°C y como inicial la temperatura ambiente, aunque no se ha controlado la rampa de bajada hasta los 0°C. La rampa de bajada tiene una pendiente de 1°C/min. Desde la temperatura ambiente hasta la 0°C solo se suministra PBS y a partir de esta temperatura hasta -5°C se va aumentando la concentración en 1%/min hasta 5% de etilenglicol. Después de llegar a -5°C se mantiene esta temperatura durante 5 minutos, la concentración también se mantiene en 5%. Durante todo el protocolo, el caudal total era de 5 ml/min. El protocolo se puede ver en la Figura 8.

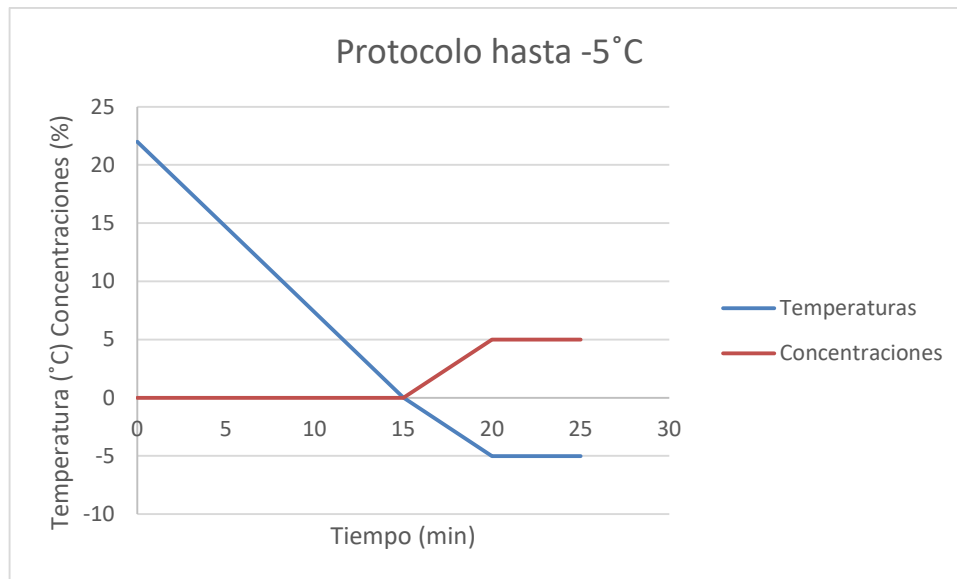


Figura 8. Gráfica donde se representa el protocolo hasta -5°C, mostrando la temperatura y la concentración de etilenglicol.

La mayor cantidad de crioprotector que se le va a suministrar es 5% por lo que el frasco de crioprotector solo tendrá un 5% de etilenglicol y el resto PBS.

Con este protocolo, después de repetirlo varias veces, no se ha congelado en ningún momento el contenedor por lo que se podrá replicar con aorta y comprobar su viabilidad.

#### 4.1.2 Punto de congelación de 25% de etilenglicol

Después de tener el anterior protocolo, se intentó llegar a -15 °C con una parada de 5 min en -5 °C y en -10° C. Se intentó con distintas concentraciones y con resultados negativos, todos acabaron congelándose en -10 °C. Por tanto, se realizó un experimento que llegando a -10 °C se tuviera una concentración de 25% y a partir de ahí avanzar en pasos de 5 °C para comprobar en qué punto se congela con una concentración del 25% con caudal de 0.5 ml/min. El perfil teórico del experimento se muestra en la Figura 9.

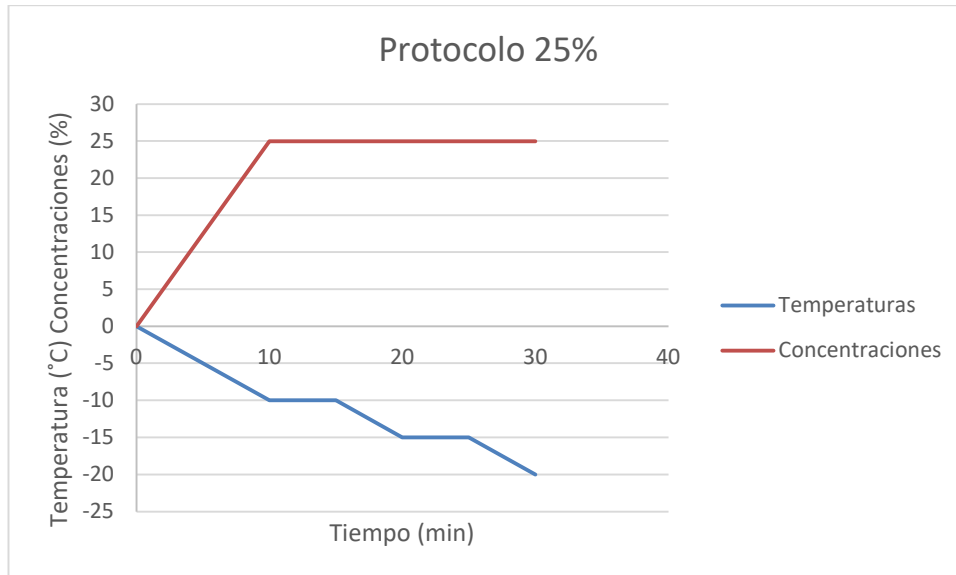


Figura 9. Gráfica donde se representa el perfil teórico del experimento, mostrando la temperatura y la concentración de etilenglicol.

La mayor cantidad de crioprotector que se le va a suministrar es 25%, por lo que el frasco de crioprotector solo tendrá un 25% de etilenglicol y el resto PBS.

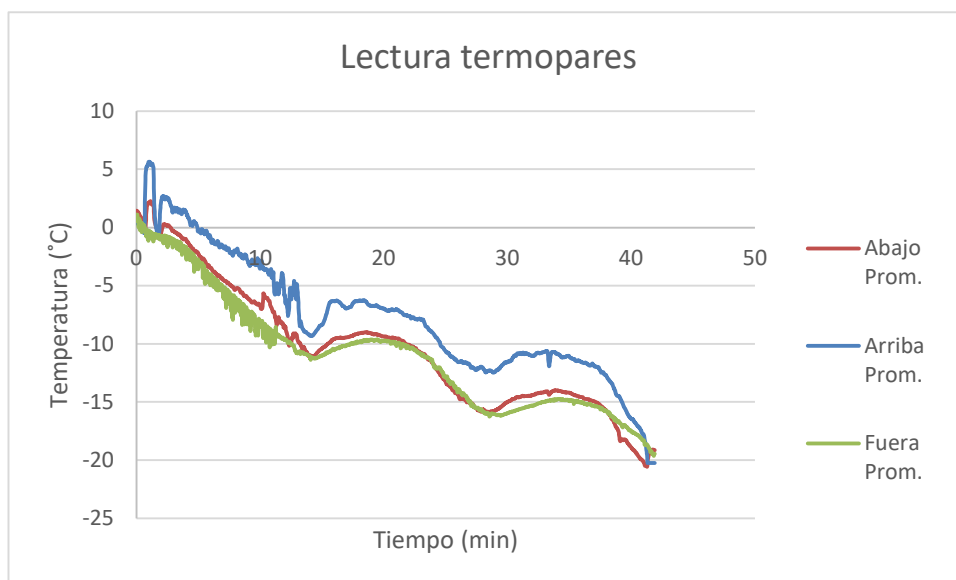


Figura 10. Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el experimento del 25%. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño.

El perfil de temperaturas calculadas se muestra en la Figura 10, donde se puede ver poca diferencia entre el termopar de abajo con el de fuera, que es el objetivo. El aspecto que destacar en este experimento es que se

congeló a  $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ , indicando que se puede llegar hasta un poco más bajo de esa temperatura sin que haya ningún problema. El punto aproximado donde se congela, que se conoce porque aumenta súbitamente la presión, el termopar de arriba hace esa caída súbita, igualándose a los otros termopares. Esto ocurre ya que, al congelarse, el caudal se pone a 0 y al no correr el líquido, procedente de una temperatura ambiente ya no calienta la zona y se iguala a la temperatura del Biocool.

#### 4.1.3 Protocolo hasta $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$

Por último, se va a realizar un protocolo que llegue a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En este protocolo queremos que hasta  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  sea igual que el primer protocolo ya que se tiene controlado hasta ese punto y queremos ampliar a partir de ese punto.

En este caso se va a empezar a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las rampas de enfriamiento entre  $4$  y  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  son de  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , con una parada de 5 minutos en  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La concentración en temperaturas positivas son 0 y sube hasta 5% en  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se mantiene en el *holding time* y aumenta hasta 25% en  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se mantiene 10 minutos, en estos valores. En la Figura 11 se puede ver el protocolo.

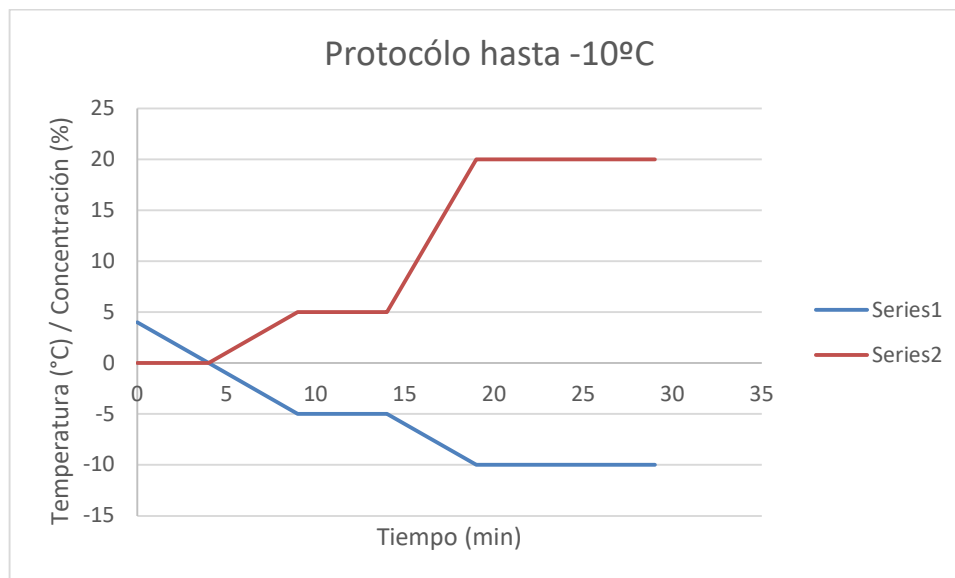


Figura 11. Gráfica donde se representa el protocolo hasta  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mostrando la temperatura y la concentración de etilenglicol

La mayor cantidad de crioprotector que se le va a suministrar es 20%, por lo que el frasco de crioprotector solo tendrá un 20% de etilenglicol y el resto PBS.

Con este protocolo, después de repetirlo varias veces, no se ha congelado en ningún momento el contenedor por lo que se podrá replicar con aorta y, posteriormente, comprobar su viabilidad. Cabe destacar que la sensibilidad del protocolo, ya que si se aplica una concentración menor no se asegura el éxito.

Con estos resultados, es una idea viable introducir aortas en el contenedor.

## 4.2 Experimentos con aorta

En este apartado replicaremos el protocolo hasta  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  y hasta  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pero con aortas en el contenedor.

Las aortas se obtienen de ratones sacrificados minutos antes. Las aortas se extraen y son limpiadas

posteriormente. Una vez limpias, se cortan en anillos de 1 mm de altura. En el contenedor se introducen dos anillos de aorta, que vienen en un eppendorf con 1 ml de PBS. Para introducirlos se usa unas pinzas quirúrgicas, se llena la pajuela de PBS y se introduce con la pajuela en posición horizontal. Las aortas se introducen en el tercio inferior de la pajuela, que es la zona por donde se introducen. Mientras se introducen las aortas, las bombas están sin funcionar. Una vez que se han introducido en la pajuela o contenedor y se cierra el contenedor, no sin antes activar la bomba de PBS para que no se creen burbujas en el interior. Una vez cerrado se le pone el segundo protector al desagüe y se introduce en el Biocool con el baño a temperatura ambiente. Una vez introducido el contenedor y el agitador, se programa al Biocool que llegue a la temperatura inicial sin control.

Al acabar el protocolo, se paran las bombas, se saca el contenedor y se abre con cuidado, colocándose la pajuela en horizontal. Una vez abierto se sacan las aortas del contenedor. Estas suelen estar entre la zona baja de la pajuela o en el tapón del desagüe junto al termopar. Las aortas dentro de la pajuela se sacan suministrando con una bomba PBS para que se acerque al final de la pajuela y se puedan sacar fácilmente. Una vez sacadas con las pinzas quirúrgicas, se meten otra vez en un eppendorf con 1 ml de PBS y se le someten a las pruebas de viabilidad, que se basa en el uso de un método colorimétrico mediante el uso de la tinción Trypan Blue. Las células vivas lucirán relucientes y de color azul claro mientras que las células muertas se mostrarán de color azul oscuro.

Los frascos con PBS y el de mezcla de PBS y crioprotector, se limpian y llenan cada día con PBS y etilenglicol fresco. Los tubos del sistema también se tienen que vaciar y llenar con el contenido de los nuevos frascos.

Para el tema de viabilidad, se contabilizará el número de células vivas, siendo la viabilidad del 100% la de una aorta fresca con un contenido de más de 1.000 células por muestras.

#### **4.2.1 Protocolos a temperaturas positivas con aortas**

Los primeros protocolos que se probaron consistieron en llegar a temperaturas positivas para ver que efecto tenía la máquina sobre la aorta.

##### **4.2.1.1 Protocolo hasta 1°C**

El primer protocolo fue llegar de temperatura ambiente a 1°C con una rampa de enfriamiento de 1°C/min. Solo se le suministró PBS con un caudal de 0.5 ml/min.

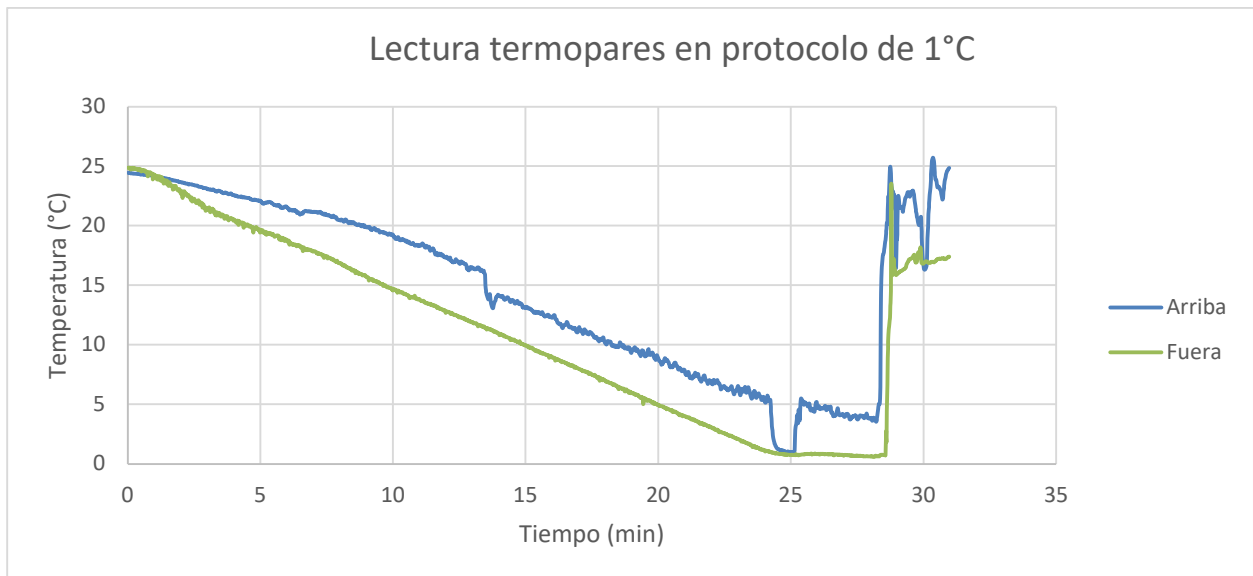


Figura 12. Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el protocolo hasta 1°C con aorta. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño.

En la Figura 12 se puede leer la lectura de los termopares. En este experimento el termopar de abajo dejó de funcionar, por lo que no se pudieron tomar medidas. La subida súbita de las temperaturas se produce cuando se acaba el experimento y se saca el contenedor para extraer las aortas.

Se encontraron más de 400 células vivas, siendo una viabilidad del 40%.

#### 4.2.1.2 Protocolo hasta 0°C

El segundo protocolo fue llegar de temperatura ambiente a 0°C con una rampa de enfriamiento de 1 °C/min. Solo se le suministró PBS con un caudal de 0.5ml/min.

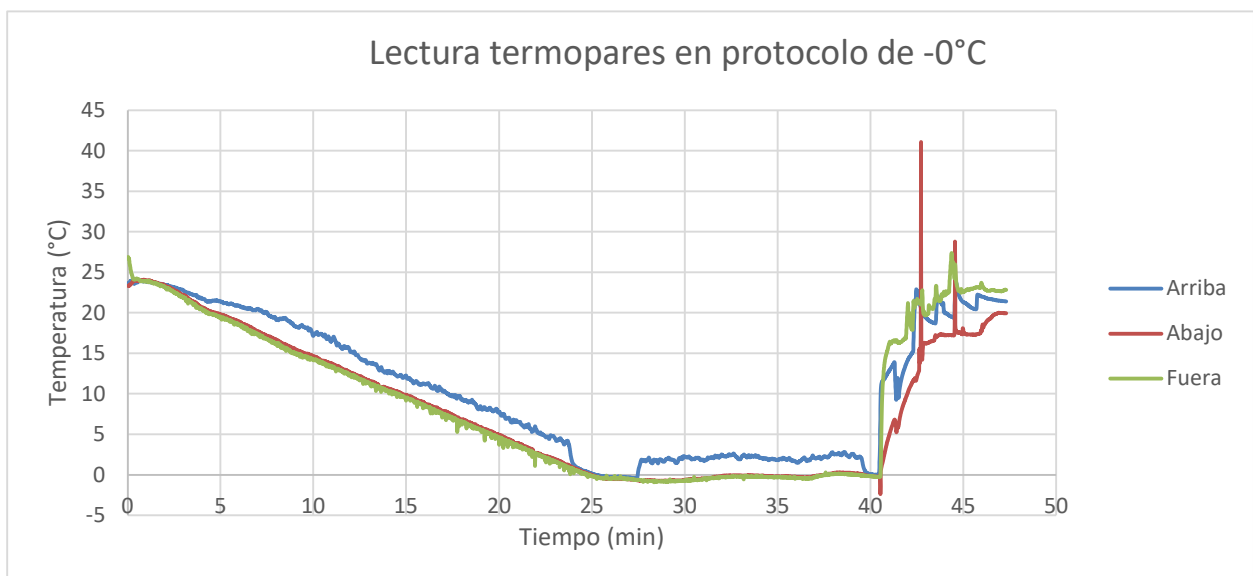


Figura 13. Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el protocolo hasta 0°C con aorta. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño.

En la Figura 13 se puede ver la lectura de termopares en el experimento, en el final pasa lo mismo que antes.

También, se ha dejado a 0 °C unos 15 minutos. Aunque se observe que se alcanzan temperaturas negativas, no supone un problema para el experimento.

De igual modo se vieron más de 400 células vivas.

Estos dos protocolos nos indican que la máquina no ejerce ningún tipo de estrés, ni provoca ningún daño sobre la aorta que disminuya la viabilidad considerablemente, por lo que empezaremos a realizar protocolos con temperaturas negativas.

#### 4.2.2 Protocolos a temperaturas negativas con aortas

A continuación se aplicarán protocolos alcanzando temperaturas negativas, después de comprobar que no afecta la introducción y la extracción de la aorta, igual que todos los demás aspectos del sistema en la viabilidad.

##### 4.2.2.1 Protocolo hasta -5°C

El protocolo que se ha utilizado es el mostrado en la Figura 8, que llega hasta -5°C.

El frasco de crioprotector contiene 5% de etilenglicol y el resto es PBS. Puede tener un error de + 1% el bote, siempre buscando que tenga un error positivo en vez de negativo.

##### 4.2.2.1.1 Experimento 1

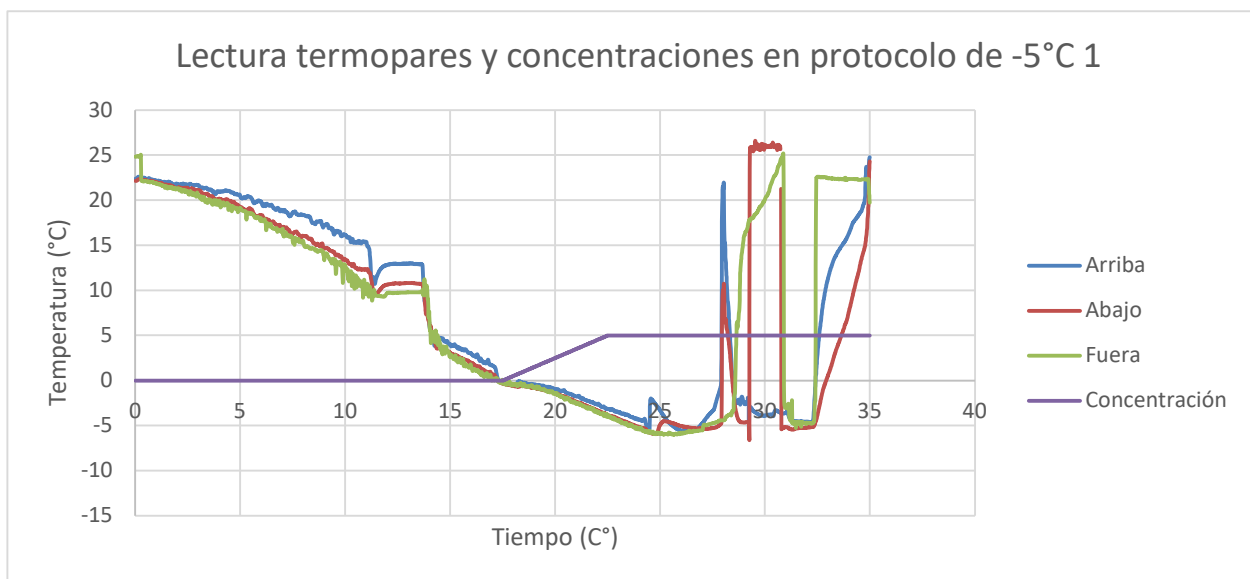


Figura 14. Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el protocolo hasta -5°C con aorta 1. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño. También se muestra la concentración de crioprotector que calcula Matlab.

En la Figura 14 se puede ver la lectura de los termopares y la concentración suministrada de crioprotector. En este experimento, se congeló un par de veces el contenedor al no ponerle el segundo aislante y, además, al finalizar la rampa se paraban las bombas hasta que se le meta los nuevos valores y este tiempo parado provoca que se congele. Las subidas de temperaturas son debidas a que se sacó para que se descongelaran las vías. La concentración llega antes al descanso, por el tema de inercias.

En este experimento bajo un poco la viabilidad, viéndose alrededor de 300 células vivas.

## 4.2.2.1.2 Experimento 2

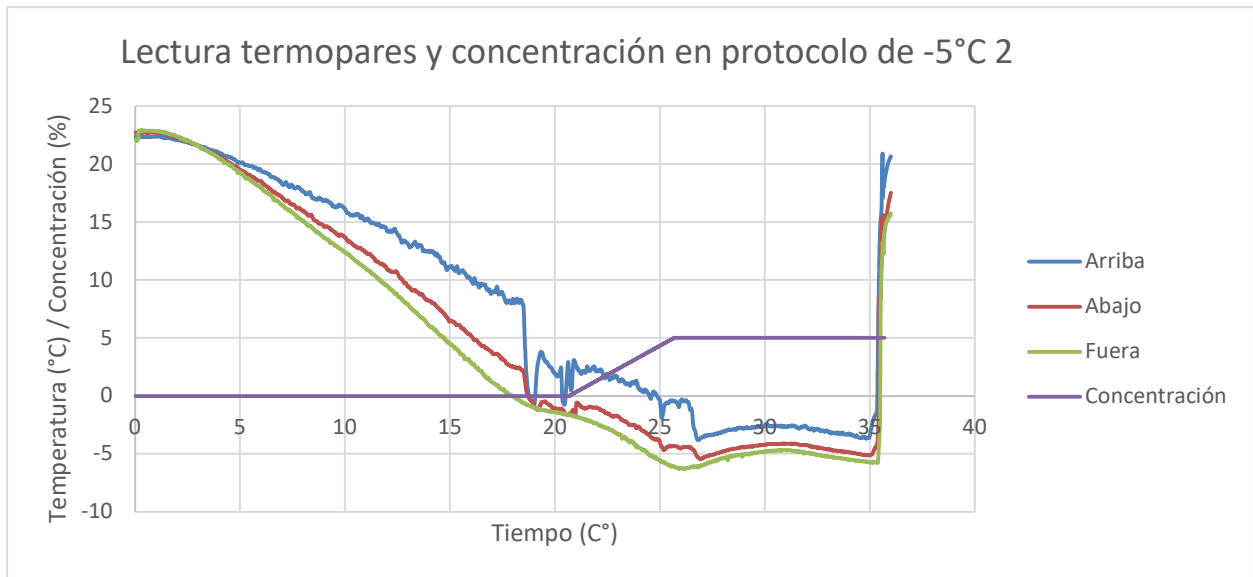


Figura 15 . Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el protocolo hasta  $-5^{\circ}\text{C}$  con aorta 2. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño. También se muestra la concentración de crioprotector que calcula Matlab.

En la Figura 15 se pueden ver tanto las concentraciones como la lectura de los termopares. La rampa concentración es más rápida que la de temperatura, por las inercias que hay. No hubo incidencias.

En este experimento fue mejor que el anterior, ya que no hubo incidencias y se vieron más de 400 células vivas.

## 4.2.2.1.3 Experimento 3

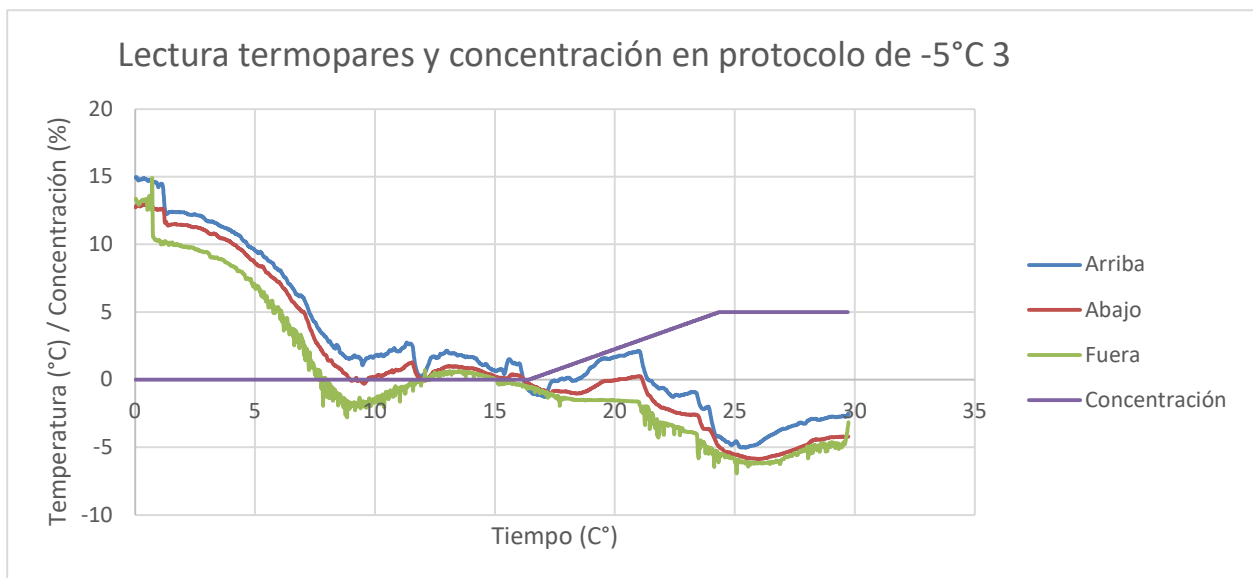


Figura 16. Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el protocolo hasta  $-5^{\circ}\text{C}$  con aorta 3. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño. También se muestra la concentración de crioprotector que calcula Matlab.

En el experimento mostrado en la Figura 16 no hubo ningún tipo de altercado y todo funcionó correctamente.

En el último experimento fue el que mejor viabilidad presentó. Se vieron más de 400 células vivas, aunque con mejor viabilidad y aspecto que la anterior.

#### 4.2.2.2 Protocolo hasta -10°C

Una vez que se ha asegurado el enfriamiento de la aorta hasta -5 °C se realiza un protocolo hasta -10 °C que tenga como base el anterior. El protocolo que se va a seguir es el de la Figura 11. Hubo un problema en los tres primeros experimentos, por falsos valores en la viabilidad, por eso se redujo hasta 3 minutos el tiempo de constante final, en los dos primeros siguientes experimentos. En el último el *holding time* final fue de 10 minutos.

Otro aspecto a tener en cuenta es la concentración; siempre la inicial es de 3%, que es la mínima que se puede suministrar con 20% de etilenglicol en el frasco de crioprotector. También, se empieza a suministrar un poco antes el crioprotector por las inercias, suministrándolas 2 minutos antes las concentraciones.

El bote de crioprotector tiene 20% de etilenglicol y el resto es PBS. El error en el porcentaje del etilenglicol es de +1%, siempre estimando hacia arriba, porque si es la concentración es insuficiente se congela el sistema.

##### 4.2.2.2.1 Experimento 1

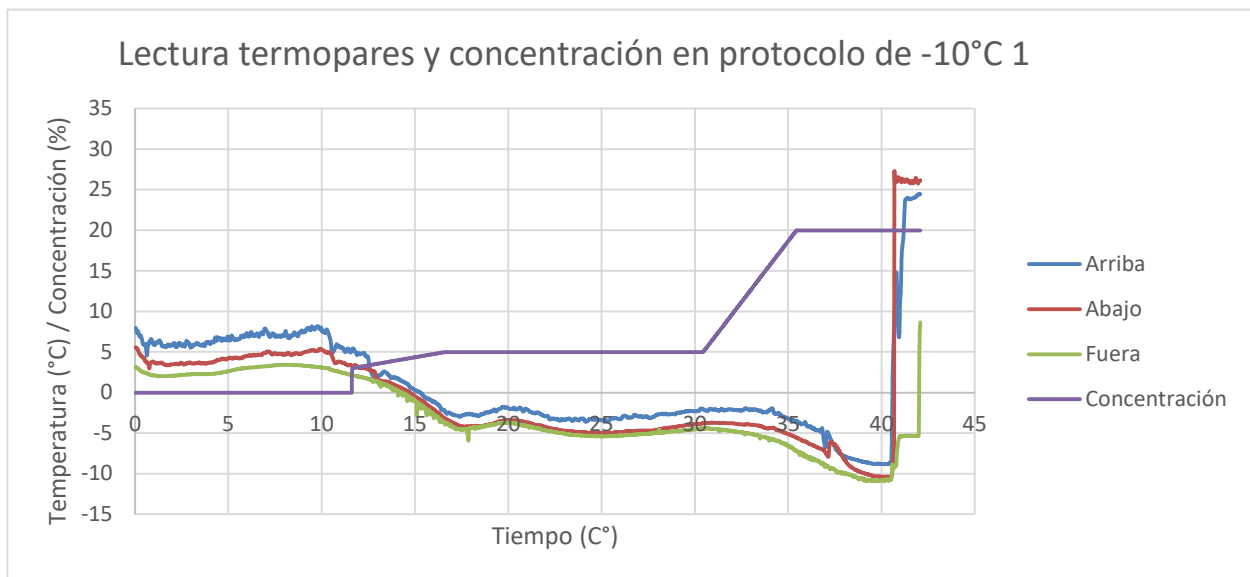


Figura 17. Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el protocolo hasta -10°C con aorta 1. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño. También se muestra la concentración de crioprotector que calcula Matlab.

En el experimento mostrado en la Figura 17, el aumento de la concentración iba demasiado lento comparado con la temperatura, por lo que se mantuvo un tiempo en -4 °C para evitar el congelamiento.

Este experimento es el que mayor viabilidad tuvo de todos, viéndose más de 500 células vivas.

En la Figura 18 se puede ver como se cuentan las células, utilizando el método de Trypan Blue, que es un colorante que diferencia las células vivas de las muertas. Para verlas se utiliza un microscopio óptico donde se buscan las células y se realiza un recuento. Este proceso es realizado por el mismo personal encargado de extraer y manipular la aorta.



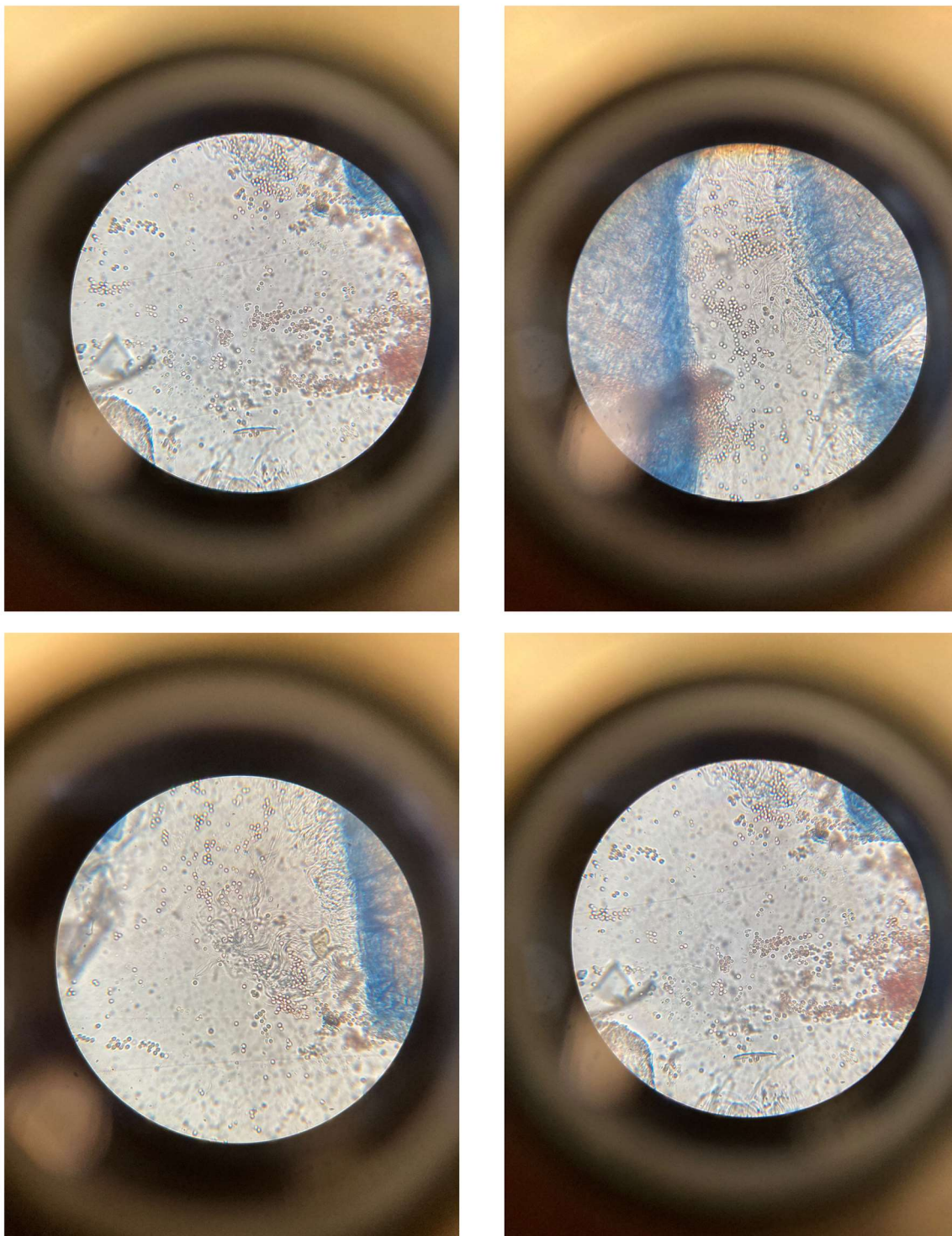


Figura 18. Fotografía de las células después del proceso de comprobación de viabilidad, vistas con el microscopio. Los círculos que son círculos con el contorno negro. Las células muertas se tiñen totalmente de azul.

4.2.2.2.2 Experimento 2

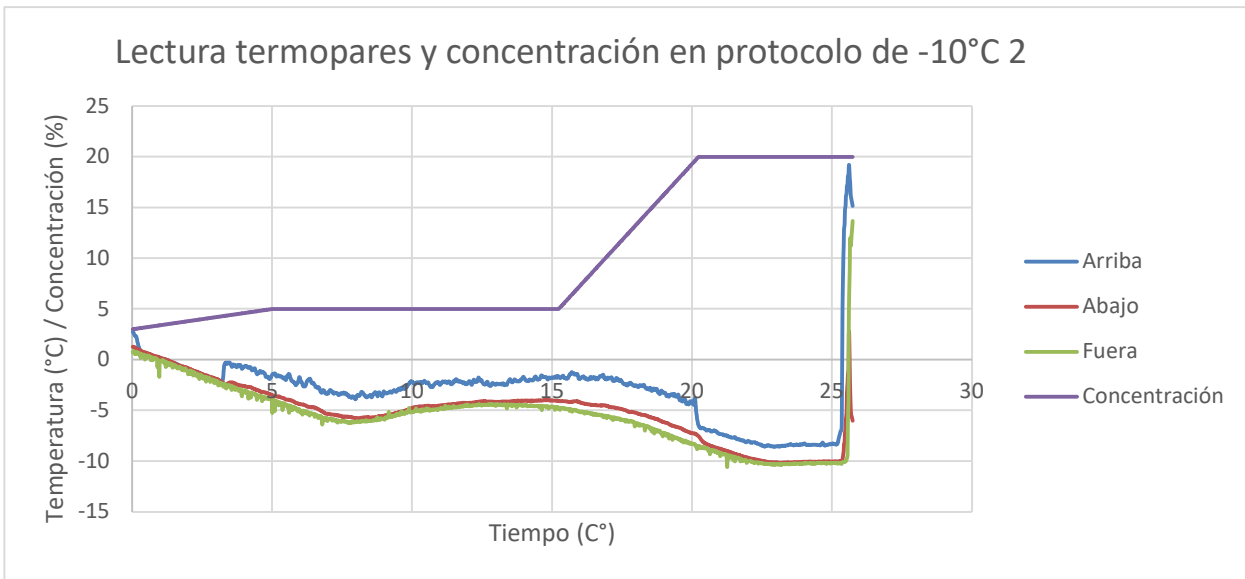


Figura 19. Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el protocolo hasta -10°C con aorta 2. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño. También se muestra la concentración de crioprotector que calcula Matlab.

En el experimento de la Figura 19 no hubo ninguna incidencia.

Se observaron entre 200 y 300 células.

4.2.2.2.3 Experimento 3

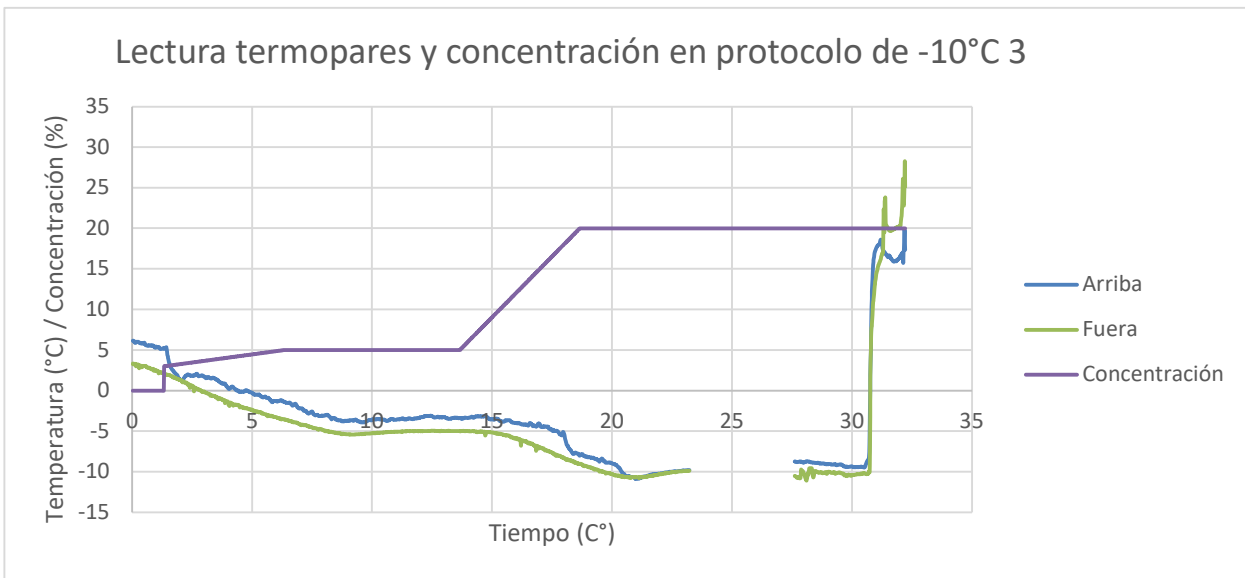


Figura 20. Gráfica de las lecturas de los termopares puestos en el sistema para el protocolo hasta -10°C con aorta 2. Las lecturas de Arriba corresponden al termopar que se encuentra en la parte superior de la pajueta. Las lecturas de Abajo corresponden al termopar que se encuentra en la parte inferior de la pajueta. Las lecturas de Fuera corresponden al termopar que se encuentra en el baño. También se muestra la concentración de crioprotector que calcula Matlab.

En el experimento mostrado en la Figura 20 se congeló el desagüe por lo que hubo que sacar el contenedor. Ya que estuvo poco tiempo fuera, se volvió a introducir cuando bajó la presión. Cuando se fue a sacar el contenedor se detuvo la toma de los termopares y se volvió a poner tiempo después, por eso hay un tramo donde no se muestran datos. También el termopar de abajo no se pudo poner porque se rompió el tapón antes de empezar el experimento, por motivos externos al experimento.

Se vieron más de 300 células vivas.

### 4.3 Conclusión

En este capítulo se han realizado distintos experimentos con el *liquidus tracking*. Primero se ha comprobado que no se congelará el contenedor y se han realizado protocolos con la mínima cantidad de crioprotector. Lo más importante del capítulo es que se ha conseguido bajar hasta -10 °C con 20%.

La viabilidad ha sido alta, teniendo una viabilidad de 40% (más de 400 células vivas) en la mayoría de los casos. Esta viabilidad es considerada como excelente, puesto que en experimentos previos donde el recalentamiento se realiza a temperatura ambiente, se observa una viabilidad realmente deficiente. Hubo más experimentos con aortas, pero solo se muestran los que no tuvieron un error fatal, como problemas de congelación del sistema que no se pudieron solucionar como en algunos casos mostrados o problemas en el proceso de comprobación de viabilidad que dieron datos erróneos.



## 5 CONCLUSIONES

En el trascurso del proyecto surgieron varios tipos de problemas en el sistema de *liquidus tracking*. Normalmente estos problemas fueron debidos a la baja cantidad de crioprotector utilizado y/o problemas de índole estructural que obligaron a cambiar y/o reemplazar algunos materiales.

Para empezar, el sistema de *liquidus tracking* se encontraba en una etapa de inactividad temporal, lo que se tuvo que volver a optimizar el sistema para poder utilizarse. Las conexiones que tenía de los líquidos por los tubos tenían fugas, tanto en la llave de tres vías como en la de entrada y salida de las bombas. Todos estos materiales se reemplazaron por nuevos y se sustituyó por un nuevo sistema en las bombas donde facilitaban el cambio de tubos. La sustitución de los tubos se completó una vez más en los tiempos finales del proyecto, estas modificaciones fueron provocadas por los aumentos de presión que hicieron que hubiera fugas.

El contenedor se modificó varias veces de diseño ya que no se encontraba el sistema ideal que evitara la congelación del mismo. Al final se colocaron aislantes, consiguiendo alcanzar temperaturas muy bajas sin congelar.

El contenedor tuvo que ser cambiado varias veces, por roturas a la hora de manipularlo o por fallo de los termopares que dejaban de tomar medidas y que tuvieron que ser retirados y reparados, por lo que se necesitaba que se montara de nuevo el contenedor. Para paliar este inconveniente se dispuso un duplicado del sistema, aunque este no tenía termopares instalados.

El mayor problema al que nos hemos enfrentado en este trabajo es la congelación del contenedor, por la gran cantidad de diferentes protocolos y tener que repetir varias veces los experimentos para encontrar la mínima cantidad de crioprotector con el cual no se congele el sistema.

También hubo varios problemas para determinar la viabilidad, dándonos resultados que no eran válidos, por lo que se tuvieron que repetir varios experimentos con aorta.

En lo referente a lo conseguido en el proyecto, es la creación de un contenedor para la aorta, la creación de un protocolo y el objetivo final la recuperación de una aorta después de haber sido criopreservada hasta -10 °C con una viabilidad alta.

Una vez presentado todos los resultados que se han conseguido en este trabajo y el estudio acabado, es fundamental destacar cuales son las posibles líneas futuras de investigaciones, que pueden hacer uso de la información presentada en el presente trabajo.

El primer aspecto sería bajar a menores temperaturas, la idea sería llegar a -25 °C, que es cuando ya no existe intoxicación, y a continuación introducir las en nitrógeno líquido para su preservación.

Otro aspecto sería referente a la viabilidad, en este trabajo solo se ha comprobado a nivel celular, pero se podría utilizar otros métodos de viabilidad para conocer si la aorta sería capaz de realizar sus funciones perfectamente. Un ejemplo de estos métodos es el uso de un miógrafo diseñado en las instalaciones del laboratorio.

También, una vez enfriadas, habría que probar distintos métodos de recalentamiento capaces de recuperar las aortas a bajas temperaturas y conseguir que sobrevivan.

Por último, mejorándose estudiará mejor el sistema de *liquidus tracking* para que haya menos errores y sea más automático.



# ANEXOS

## A. Calibración de las bombas

Antes de poder utilizar las bombas se necesita calibrarlas para conocer su función que pasa el caudal en voltios. Para realizar la calibración probamos a meter distintos voltajes a las bombas que están conectadas a una pipeta de plástico.

Para calcular el caudal se suministra un voltaje y durante 1 minuto se comprueba cuantos mililitros se ha llenado. En la Tabla 1 y Tabla 2.

Bomba PBS	
Voltaje	ml en 1 minuto
1	0,13
1,5	0,27
2	0,43
2,5	0,55
4	0,72

Tabla 1. Voltajes y ml en 1 minuto de la bomba de PBS.

Bomba Crio	
Voltaje	ml en 1 minuto
1	0,11
1,5	0,15
2	0,19
2,5	0,23
3	0,27
3,5	0,31
4	0,33
4,5	0,38

Tabla 2. Voltajes y ml en 1 minuto de la bomba Crioprotector.

Con estas tablas realizamos las gráficas mostradas en la Figura 21 y la Figura 22.

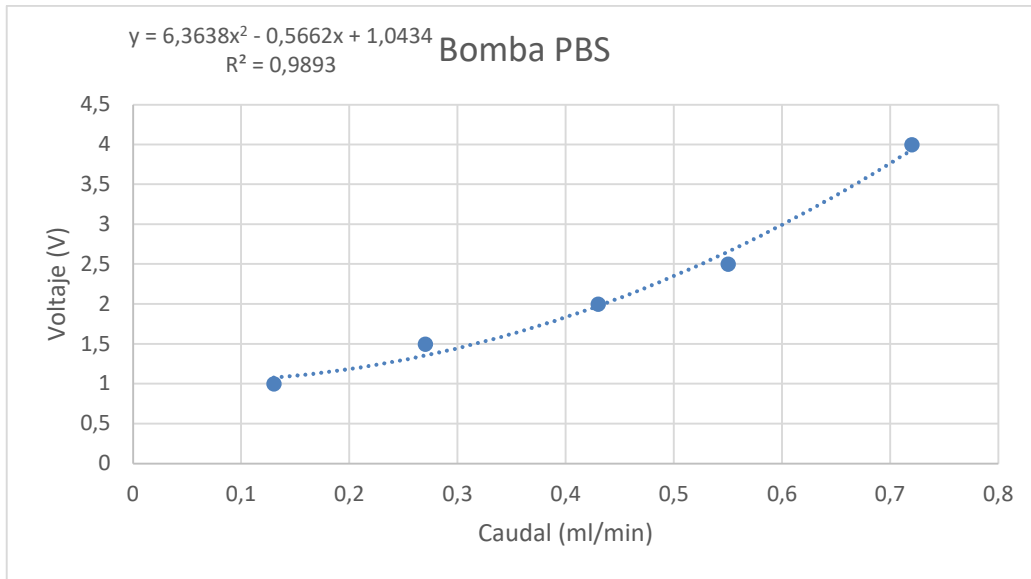


Figura 21. Gráfica con los datos calculado en la bomba de PBS con la línea de tangencia y su fórmula con el error.

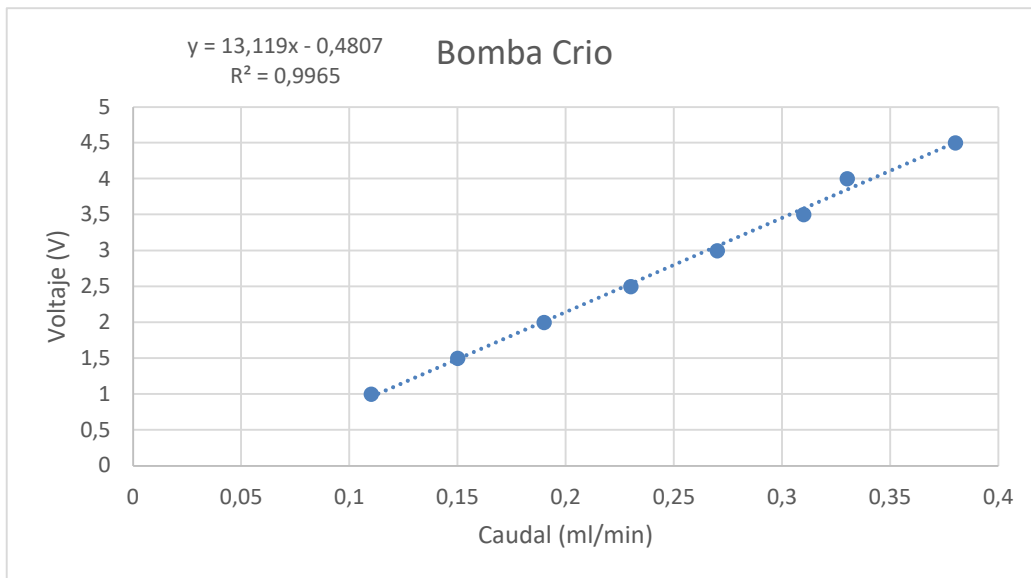


Figura 22. Gráfica con los datos calculado en la bomba de crioprotector con la línea de tangencia y su fórmula con el error.

En la Figura 21 se muestra la línea de tendencia y calculamos su función (1), esta función es de segundo orden ya que se reduce considerablemente el error que con una de primer orden.

$$y = 6,3638x^2 - 0,5662x + 1,0434 \quad (1)$$

En la Figura 22 se muestra la línea de tendencia y calculamos su función (2), esta función es de primer orden ya que con la de segundo orden no mejoraba el error.

$$y = 13,119x - 0,4807 \quad (2)$$

En Tanto la función (1) y (2), la X representa el caudal (ml/min) y la Y el voltaje (V). Estas funciones las metemos en el código teniendo de variable de entrada el caudal y de salida el voltaje que se le va a suministrar a la bomba.



## B. Calibración del refractómetro

El refractómetro es un dispositivo de medida con una escala, que si se le introduce una gota de alguna mezcla nos marca un valor en una escala, dependiendo de la concentración, nos da un distinto valor. Antes de poder utilizar el refractómetro necesitaremos calibrarlo para saber el significado del valor que nos da en la escala.

Usamos varios botes eppendorf con distintas concentraciones y se va anotando el valor en la escala del refractómetro. Los valores se pueden ver en la Tabla 3.

Etilenglicol (%)	Refractómetro
5	3
10	6
15	10
20	12
25	16
30	17
35	22

Tabla 3. Valores obtenidos en el refractómetro.

Los datos Tabla 3 se muestran también en la gráfica de la Figura 23.

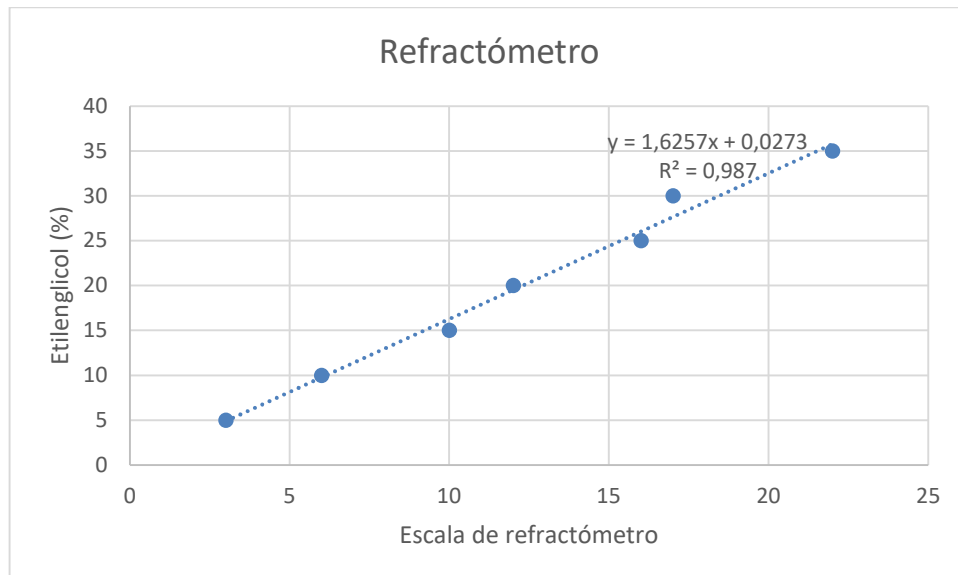


Figura 23. Gráfica de calibración del refractómetro.

Con los datos se calcula una línea de tendencia y sacamos una función lineal (3), que la X representa la escala que nos da el refractómetro y en la Y la concentración de etilenglicol.

$$y = 1,6257x + 0,0273 \quad (3)$$



## REFERENCIAS

- [1] Farrant J. Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention. *Nature*. 1965;4987
- [2] Puschmann E, Selden C, Butler S, Fuller B. Liquidus tracking: controlled rate vitrification for the cryopreservation of larger volumes and tissues. *CryoLetters*. 2014;35(4):345-355.
- [3] Puschmann E, Selden C, Butler S, Fuller B. Liquidus Tracking: Large scale preservation of encapsulated 3-D cell cultures using a vitrification machine. *Cryobiology*. 2017;76:65-73.
- [4] Corral A, Claverob M, Gallardoc M, Balcerzyk M, Amorim CA, Parrado-Gallegoa A, Dolmans MM, Paulinid F, Morrisf J, Risco R. Ovarian tissue cryopreservation by stepped vitrification and monitored by X-ray computed tomography. *Cryobiology*. 2018;81:17-26.
- [5] Leonel EC, Corral A, Risco R, Camboni A, RobertoTaboga S, Kilbride P, Vazquez M, Morris J, Dolmans MM, Amorim C. Stepped vitrification technique for human ovarian tissue cryopreservation. *Nature*. 2019;9:20008.
- [6] Pegg D, Wang L, Vaughan D. Cryopreservation of articular cartilage. Part 3: The liquidus-tracking method. *Cryobiology*. 2020;93:12-17.
- [8] Kay AG, Hoyland JA, Rooney P, Kearney JN, Pegg D. A liquidus tracking approach to the cryopreservation of human cartilage allografts. *Cryobiology*. 2015;71:77-84.
- [9] Mazur P. Freezing of living cells: mechanism and implications. *American Journal Physiol*. 1984 Sep;247(3 Pt 1):C125-42.
- [10] Fahy GM, Wowk B, Wua J, Paynterb S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology*. 2004 Feb;48(1):22-35.
- [11] Whittingham DG, Wood M, Farrant J, Lee H, Hasley JA. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196 degrees C. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1979;98:139-145.
- [12] Massip A, Van der Zwalmen P, Scheffen B, Ectors F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrificación. *Cryo-letters*. 1986;7:270-273.
- [13] Schiewe MC, Rall WF, Stuart LD, Wildt, DE. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vifrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology*. 1991;36:279-293.
- [14] Yuswiati E, Holtz W. Successful transfer of vitrified goat embryos. *Theriogenology*. 1990;34: 629-632.
- [15] Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for cell mouse embryos. *Human Reproduction*. 1990;13:2874-2879.
- [16] Oberstein N, O'Donovan MK, Breummer JE, Seidel G, Carnevale EM, Squires EL. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology*. 2001;55: 607-613.