

Proyecto Fin de Grado

Ingeniería Química

Criopreservación de aorta de *Mus Musculus* mediante técnicas de Ultrasonidos Focalizados de Alta Intensidad y validación por elementos finitos

Autor: Virginia Armas Quiaro

Tutor: Ramón Risco Delgado

Cotutor: Enrique Alcalá Guerrero

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

Sevilla, 2023



Proyecto Fin de Grado
Ingeniería Química

Criopreservación de aorta de Mus Musculus mediante
técnicas de Ultrasonidos Focalizados de Alta Intensidad
y validación por elementos finitos

Autor:

Virginia Armas Quairo

Tutor:

Ramón Risco Delgado

Cotutor:

Enrique Alcalá Guerrero

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

Sevilla, 2023

Agradecimientos

Muchas gracias a mis tutores por tenerme paciencia. Mi padre y mi madre por apoyarme a estudiar una ingeniería. Y a mis hermanas por valorar mis aciertos y equivocaciones como hermana mayor. A mis compañeros de laboratorio por todas las mañanas que pasamos juntos. A mi novio que siempre me tenía una sonrisa y ánimos cada vez que me estresaba con este trabajo. A mis profesores y amigos de la carrera que tan buenos recuerdos me dejan.

Virginia Armas Quiaro

Sevilla, 2023

Resumen

El ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU) es una tecnología pionera que se abre camino en el ámbito de la criopreservación. Su uso ha dado resultados competentes en la preservación de larvas y adultos de *C-elegans*. Esta tecnología es potencialmente prometedora para la criopreservación de órganos y tejidos cuando se emplean varios transductores y se acopla a la imagen médica. Por esto, se ha decidido hacer experimentos con tejido tanto en simulaciones como con el transductor real. En los experimentos reales se han trabajado con 30 aortas criopreservadas y recalentadas con el método estándar y con la técnica HIFU para extraer conclusiones ilustrativas. Las restricciones de estos experimentos incluyen un transductor de 60W, 1.224MHz, aplicando ultrasonidos a un anillo de aorta de ratón de 1 mmx1mm almacenado a -80°C.

Debido a la naturaleza invisible de la acústica, averiguar el mapa de presión y temperatura producido por un transductor facilita la búsqueda de combinaciones de trabajo de velocidades de calentamiento, volúmenes y características generales del transductor. Estas buenas prácticas pueden ejemplificarse en trabajos anteriores de nuestro grupo. Un enfoque de simulación por elementos finitos proporciona una visión precisa y rápida de este asunto. Por lo tanto, en este trabajo ampliamos dichas prácticas a la criopreservación de tejido vascular con HIFU.

Las simulaciones implican replicar la geometría del experimento deseado y resolver el conjunto de ecuaciones diferenciales sujetas a las restricciones de nuestro experimento. Las ondas simuladas atraviesan diferentes materiales como los utilizados en el experimento real, que son, etilenglicol, agar, agua (hielo) y músculo.

Los resultados de estas simulaciones coinciden satisfactoriamente con los experimentos realizados con aortas reales en términos de velocidad de calentamiento y homogeneidad. Las aortas simuladas se llevaron hasta 0°C en 60 segundos tras la aplicación de ultrasonidos. El gradiente térmico dentro del volumen de interés era mínimo. Los experimentos reales mencionados permitieron recuperar las células de los tejidos con una supervivencia pareja a las técnicas existentes actualmente.

Abstract

High intensity focused ultrasound (HIFU) is a pioneering technology that is making its way into the field of cryopreservation. Its use has yielded competent results in the preservation of *C. elegans* larvae and adults. This technology is potentially promising for organ and tissue cryopreservation when multiple transducers are employed and coupled with medical imaging. For this reason, it has been decided to perform tissue experiments both in simulations and with the real transducer. In the real experiments, 30 cryopreserved and reheated aortas have been worked with the standard method and with the HIFU technique to draw illustrative conclusions. The constraints of these experiments include a 60W, 1.224MHz transducer, applying ultrasound to a 1 mmx1mm mouse aortic ring stored at -80°C.

Due to the invisible nature of acoustics, finding out the pressure and temperature map produced by a transducer facilitates the search for working combinations of heating rates, volumes and general transducer characteristics. These best practices can be exemplified in previous work by our group. A finite element simulation approach provides an accurate and rapid insight into this issue. Therefore, in this work we extend such practices to vascular tissue cryopreservation with HIFU.

The simulations involve replicating the geometry of the desired experiment and solving the set of differential equations subject to the constraints of our experiment. The simulated waves pass through different materials as used in the actual experiment, namely ethylene glycol, agar, water (ice) and muscle.

The results of these simulations agree satisfactorily with the experiments performed with real aortas in terms of heating rate and homogeneity. The simulated aortas were brought to 0°C within 60 seconds after ultrasound application. The thermal gradient within the volume of interest was minimal. The aforementioned real experiments allowed tissue cells to be recovered with survival on par with currently existing techniques.

Agradecimientos	v
Resumen	vii
Abstract	ix
Índice	xi
Índice de Tablas	xiii
Índice de Figuras	xv
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>La criopreservación</i>	1
1.2 <i>El recalentamiento</i>	7
1.3 <i>Criopreservación de aorta</i>	8
1.4 <i>Objetivos</i>	8
2 MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.1 <i>Transductor HIFU</i>	9
2.1.1 <i>Cálculo del foco del HIFU</i>	11
2.1.2 <i>Soporte 3D</i>	15
2.1.3 <i>Curvas de temperatura del HIFU</i>	16
2.2 <i>Preparación de muestras</i>	18
2.3 <i>Protocolo de Slow freezing de aorta</i>	21
2.4 <i>Protocolo de recalentamiento con HIFU</i>	22
2.5 <i>Protocolo de viabilidad de aorta</i>	24
2.6 <i>Simulaciones con Comsol Multyphysics</i>	26
2.6.1 <i>Geometría del modelo</i>	26
2.6.2 <i>Materiales del modelo</i>	27
2.6.3 <i>Módulo de Presión acústica</i>	29
2.6.4 <i>Módulo de Transferencia de Biocalor</i>	30
2.6.5 <i>Mallado</i>	31
3 RESULTADOS	33
3.1 <i>Recalentamiento con HIFU</i>	34
3.2 <i>Recalentamiento baño a 37°C</i>	38
3.3 <i>Simulaciones COMSOL</i>	40
4 DISCUSIÓN	45
5 CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO	51
Referencias	53

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 2.1 CARACTERÍSTICAS DE IMPRESIÓN DEL SOPORTE	15
TABLA 2.2 VELOCIDADES DE CALENTAMIENTO	17
TABLA 2.3 MATERIAL ETILENGLICOL	27
TABLA 2.4 MATERIAL AGAR	27
TABLA 2.5 MATERIAL HIELO	28
TABLA 2.6 MATERIAL BIOLÓGICO	28
TABLA 3.1 CLASIFICACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS	33
TABLA 3.2 DATOS MUESTRA Y SACRIFICIO HIFU	34
TABLA 3.3 DATOS SLOW FREEZING HIFU	35
TABLA 3.4 DATOS RECALENTAMIENTO HIFU	36
TABLA 3.5 DATOS VIABILIDAD CELULAR HIFU	37
TABLA 3.6 DATOS MUESTRA Y SACRIFICIO BAÑO 37°C	38
TABLA 3.7 DATOS SLOW FREEZING BAÑO 37°C	38
TABLA 3.8 DATOS RECALENTAMIENTO BAÑO 37°C	39
TABLA 3.9 DATOS VIABILIDAD CELULAR BAÑO 37°C	39
TABLA 4.1 RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 SUPERVIVENCIA CELULAR EN “U INVERTIDA” [21]	2
FIGURA 1.2 FRACCION NO CONGELADA SEGÚN CONCENTRACIÓN DE SOLUTOS [16]	3
FIGURA 1.3 FASE LÍQUIDO SÓLIDO DEL SISTEMA AGUA-ME2SO [25]	4
FIGURA 1.4 NUCLEACION Y CRECIMIENTO DE CRISTALES DE HIELO [29]	4
FIGURA 1.5 RECALENTAMIENTO RÁPIDO VS RECALENTAMIENTO LENTO	5
FIGURA 1.6 TRANSFERENCIA DE CALOR EN FUNCIÓN DEL GROSOR DE LA MUESTRA	6
FIGURA 1.7 HISTORIA TERMICA DE LA PRESERVACIÓN DE C-ELEGANS	7
FIGURA 2.1 TRANSDUCTOR	10
FIGURA 2.2 SET UP CALENTAMIENTO CON HIFU	11
FIGURA 2.3 DATA LOGGER Y TABLET CON PICOLOG	12
FIGURA 2.4 MONTAJE PARA DETERMINACIÓN DEL FOCO	12
FIGURA 2.5 CURVAS DE CALENTAMIENTO PARA CADA DISTANCIA (10-90MM)	13
FIGURA 2.6 COMPARATIVA DE K Y τ DE LAS CURVAS DE CALENTAMIENTO	14
FIGURA 2.7 SOPORTE 3D PARA REALIZAR LOS DISPAROS	15
FIGURA 2.8 CURVAS DE CALENTAMIENTO A 20V, 25V Y 30V	16
FIGURA 2.9 CURVAS DE CALENTAMIENTO DE AIRE Y AGUA	17
FIGURA 2.10 PLACAS DE AGAR	18
FIGURA 2.11 MATERIAL QURÚRJICO DE LA EXTRACCIÓN DE AORTA	19
FIGURA 2.12 LIMPIEZA DE AORTA	19
FIGURA 2.13 AORTA LIMPIA Y ANILLOS DE AORTA BAJO LUPA BINOCULAR	20
FIGURA 2.14 AORTA EN EL INTERIOR DEL POCILLO	20
FIGURA 2.15 SOLUCIONES ANTICONGELANTES	21
FIGURA 2.16 DISPARO CON HIFU EN ETILENGLICOL	22
FIGURA 2.17 CALENTAMIENTO EN BAÑO A 37°C	23
FIGURA 2.18 ESTUFA, CITOCENTRIFUGADORA Y MICROSCOPIO CELULAR	24
FIGURA 2.19 TRYPAN BLUE PARA TINCIÓN DE CÉLULAS	25
FIGURA 2.20 FOTO BAJO MICROSCOPIO DEL CONTEO CELULAR CON TRYPAN BLUE (LENTE DE MAGNIFICACIÓN X10)	25
FIGURA 2.21 GEOMETRÍA COMPLETA DEL MODELO	26
FIGURA 2.22 MALLADO	31
FIGURA 3.1 PRESIÓN ACÚSTICA (PA)	40
FIGURA 3.2 NIVEL DE PRESIÓN SONORA (DB)	40
FIGURA 3.3 TEMPERATURA A TIEMPOS T=0 Y T=60 SEGUNDOS	41
FIGURA 3.4 EVOLUCIÓN DE LA TEMPERATURA EN LA SECCIÓN DE LA AORTA	42
FIGURA 3.5 EVOLUCIÓN DE LA TEMPERATURA EN LA SECCIÓN DEL POCILLO	42
FIGURA 3.6 CURVA DE TEMPERATURA EN EL PUNTO CENTRAL DE LA AORTA	43
FIGURA 4.1 COMPARACIÓN SUPERVIVENCIA HIFU Y BAÑO A 37°C	46

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La criopreservación

La capacidad de algunos organismos de sobrevivir a muy bajas temperaturas a fascinado a físicos y biólogos a la par desde hace más de un siglo. El estudio de este fenómeno abarcó buena parte de la vida de Luyet. Esto culmina con su obra *Life and death at low temperatures*, que marca formalmente el inicio de la criopreservación como disciplina [14].

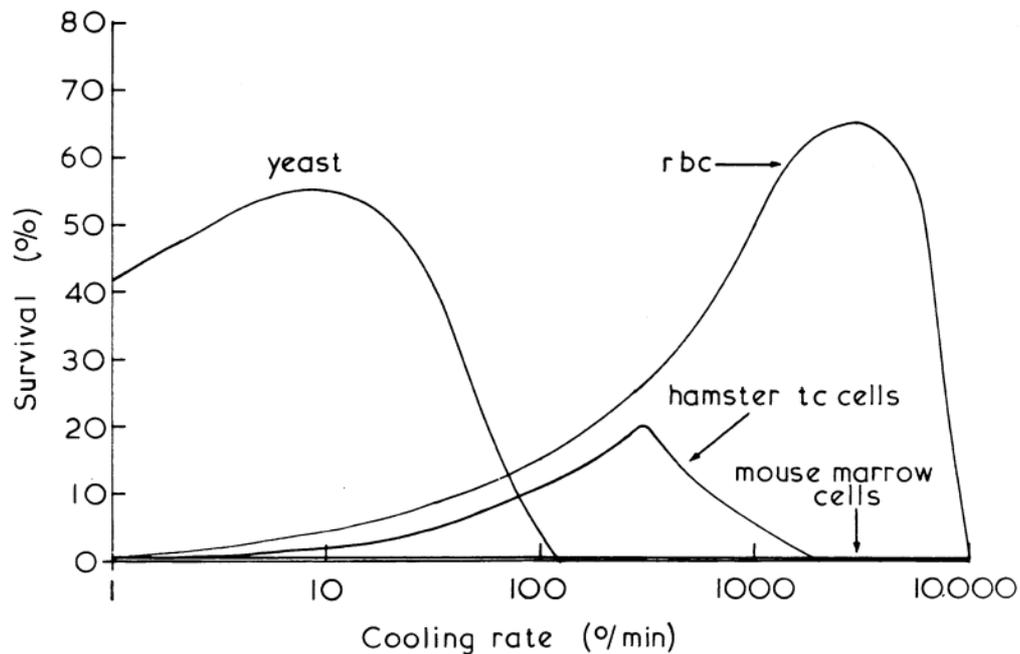
La supervivencia en un entorno helado debía guardar una estrecha relación con la temperatura y como esta afecta perjudicialmente a las células. Sin embargo, pronto se descubrió que no era el frío en sí, sino el hielo el responsable de las muertes a baja temperatura. El estudio de los daños producidos por el hielo fue encarado por Peter Mazur quien propuso una brillante hipótesis que explicaba los mecanismos de daño a las células en presencia de hielo [15]. Esta hipótesis se la conoce como "hipótesis de los dos factores", que viene a decir que el hielo es un agente mecánico y también osmótico. El hielo sería mecánicamente nocivo por la expansión del agua (presente también en el citoplasma) que hace presión sobre organelos y membrana celular, llegando a romperlas o a inducir la muerte celular. Como cabe esperar el hielo se puede formar tanto dentro como fuera de las células, aunque este último no resulte dañino de forma tan importante por vías mecánicas. El primero, sin embargo, conocido como "intracellular ice formation" (IIF) será el protagonista de la mayoría de dolores de cabeza de los científicos de esta materia.

El segundo factor que contribuye al daño celular son los "efectos de solución", que describe el daño por toxicidad y osmótico que produce a la célula la existencia de un medio altamente concentrado en solutos a su alrededor. Estos efectos de solución son tanto más dañinos cuanto mayor es la temperatura y más alta la concentración de solutos. Es importante señalar que la concentración de solutos no es algo negativo por sí mismo siempre que permita mantener lo suficientemente bajo el punto de congelación del medio de interés. Es decir, una solución suficientemente concentrada es más difícil de congelar. Esto se puede ver fácilmente con la variación del punto de fusión del agua al añadirle sal. De hecho, las propias células antes una bajada de temperatura que provoca la concentración de solutos en el exterior (pues quedan atrapados por los cristales de hielo) reducen su tamaño expulsando parte del citoplasma para reducir el gradiente osmótico. En consecuencia, el citoplasma restante queda más concentrado, haciendo más difícil que las moléculas de agua se encuentren entre ellas y, por tanto, complicando la formación de hielo.

La criopreservación funciona a modo de "fotografía", ralentizando el metabolismo hasta pararlo, de forma que la actividad celular queda paralizada hasta que se alcancen de nuevo las temperaturas normales para los tejidos. Por tanto, el daño debería provenir del proceso de enfriamiento y de calentamiento y no del almacenaje a baja temperatura, donde la célula no tiene actividad y todas las moléculas están inmóviles. Diversos estudios han explorado los mecanismos de daño mencionados más arriba durante el enfriamiento y el calentamiento de las muestras. Se descubrió que una velocidad de enfriamiento excesivamente lenta lleva a que las células estén expuestas durante demasiado tiempo a las altas concentraciones de solutos en el exterior, lo que llevaría a muertes en masa por los mencionados efectos de solución. Un enfriamiento demasiado

rápido en cambio impediría a la célula a evacuar líquido intracelular propiciándose la formación de hielo intracelular, también altamente dañino. De aquí se deduce que existe una velocidad de enfriamiento óptima que maximiza la supervivencia, dando lugar a una curva en forma de U invertida que relaciona la velocidad de enfriamiento con la supervivencia.

FIGURA 1.1 SUPERVIVENCIA CELULAR EN “U INVERTIDA” [21]



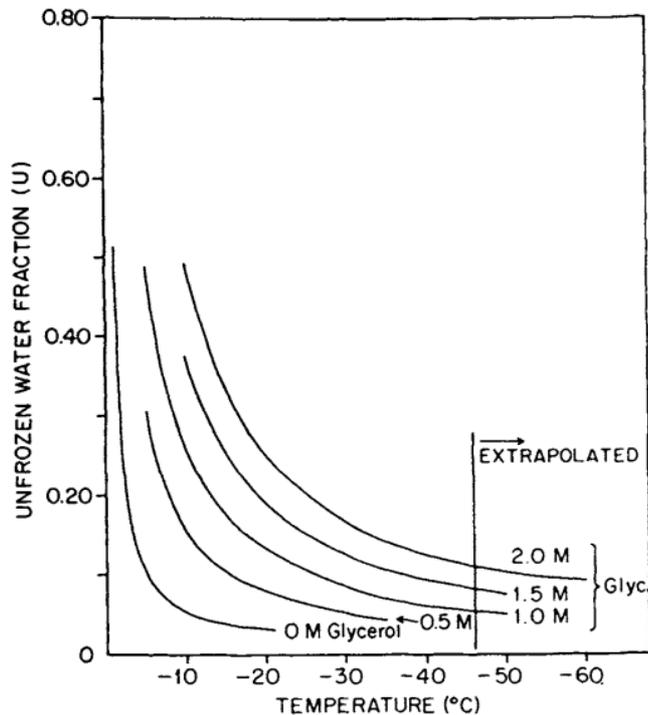
El efecto protector de una mayor concentración de solutos en el medio frente a la formación de hielo es de alto interés. Polge descubrió este efecto casi por error, lo que dio lugar al empleo del glicerol para proteger esperma de los daños del hielo [24]. Nace así el concepto de crioprotector. Estas sustancias entre las que se encuentran sales y azúcares, aunque no exclusivamente, permiten bajar el punto de congelación de un medio acuoso como se ha evidenciado ya con el ejemplo del hielo y la sal. Uno de los mayores descubrimientos al respecto es el carácter protector del dimetilsulfoxido (DMSO), achacado a James Lovelock, que sería una sustancia referencial para la criopreservación hasta nuestros días. El estudio de anticongelantes intrigó a científicos como Pierre Boutron, Peter Mazur y David Pegg. Hoy en día el uso de diferentes sustancias anticongelantes a la vez, que se conoce como cócteles anticongelantes, marca el estado del arte a este respecto. Algunos de estos cócteles llegan a emplear proteínas anticongelantes provenientes de anfibios o peces.

La formación de hielo intracelular se puede atacar desde dos vertientes diferentes mediante el uso de sustancias que limiten la solución de hielo y mediante de la superación de su formación con altas velocidades de enfriamiento o calentamiento. Estudios ofrecidos por Pierre Boutron identificaron las velocidades de enfriamiento y calentamiento críticas para maximizar la supervivencia evitando la formación de hielo intracelular [2] [5].

Los organismos en la naturaleza sobreviven a la congelación por la segregación de sustancias anticongelantes y la reubicación de esos solutos conforme las temperaturas van disminuyendo. Este método que ocurre de forma natural se conoce como slow freezing, y consiste en las supervivencias a muy bajas temperaturas gracias a la concentración de los solutos presentes en el medio en bolsas lo suficientemente diluidas para no ser tóxicas, pero bastante concentradas para evitar la formación de hielo en ellas. Las células en contacto con estas bolsas consiguen así una preservación efectiva. Sin embargo, el slow freezing implica la congelación de parte de la muestra, un sacrificio necesario para la supervivencia de la otra parte. La fracción de hielo formada es dependiente del tipo de anticongelante, la temperatura y la velocidad de

enfriamiento. Estudios de Peter Mazur lo recogen de forma elegante en la siguiente figura [16]:

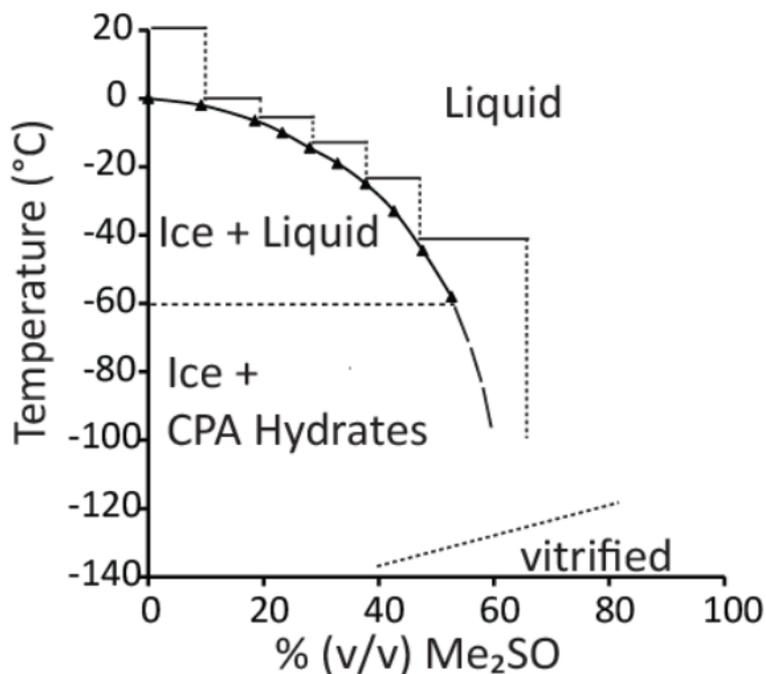
FIGURA 1.2 FRACCIÓN NO CONGELADA SEGÚN CONCENTRACIÓN DE SOLUTOS [16]



El objetivo de la criopreservación, sin embargo, es salvar el tejido completo para ello se desea conseguir una muestra completamente paralizada (sin metabolismo) en ausencia de hielo, es decir, se busca formar un sólido amorfo o vidrio y a esto se lo conoce como vitrificación. Las muestras preservadas por slow freezing presentan cierto porcentaje de vitrificación en las "bolsas de solutos" mencionadas.

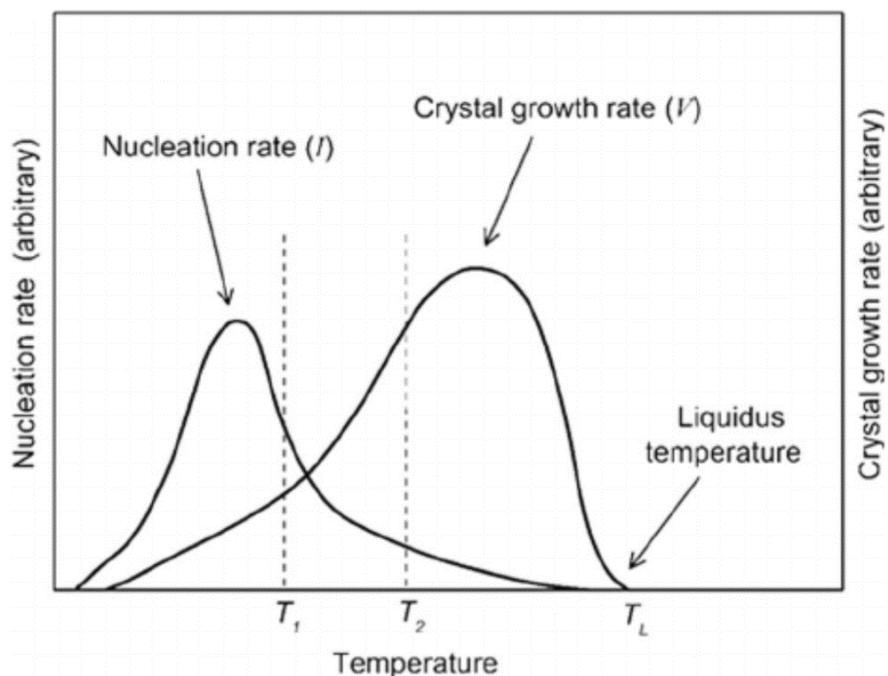
La vitrificación se puede conseguir por métodos artificiales, en un principio bastaría con añadir solutos y enfriar la muestra hasta alcanzar su temperatura de transición al estado vítreo. En la práctica esto requiere concentraciones de anticongelantes (los solutos) excesivas que no pueden ser toleradas por las células. A este efecto, surgen dos apreciaciones a la vitrificación. La vitrificación de no equilibrio emplea estas desorbitadas concentraciones de anticongelantes a la vez que unas velocidades de enfriamiento igualmente grandes, tomando de las enseñanzas de Boutron a este respecto. El cambio de temperatura que se consigue comúnmente sumergiendo la muestra en nitrógeno líquido es tan rápido que no da tiempo a los anticongelantes a hacerle daño a las muestras. De esto resulta una muestra vitrificada que bien podría ser un fotograma del sistema en cuestión. La otra aproximación a la vitrificación es mucho más elegante y fue llevada a cabo por varios autores como Farrant [9], Pegg [22], Elford y Walter [6]. Su procedimiento para la vitrificación imita la que se produce en la naturaleza, y consiste en añadir la cantidad idónea de anticongelante según la temperatura de la muestra, que se va disminuyendo de forma gradual; se sigue así la curva sólido-líquido de la solución, dando nombre así a esta técnica: *liquidus tracking*.

FIGURA 1.3 FASE LÍQUIDO SÓLIDO DEL SISTEMA AGUA-ME2SO [25]



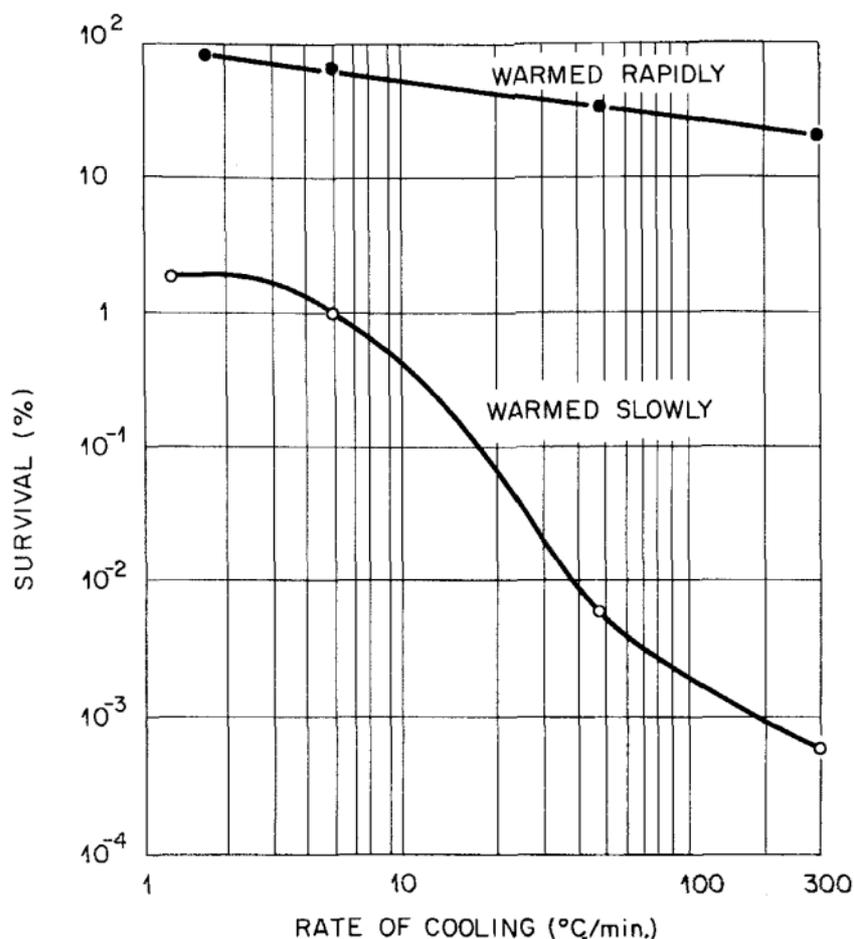
En lo que respecta al calentamiento, al contrario de lo que pudiera uno pensar, este proceso es aún más crítico que el enfriamiento para la formación de hielo. Esto se debe a que el hielo no crece sino en aquellos lugares en los que existen núcleos previamente formados y una baja viscosidad. Los núcleos se forman a temperaturas muy bajas que solo se alcanzan tras el enfriamiento. Una vez formados estos pueden crecer cuando al recalentarse el medio se alcanzan viscosidades menores.

FIGURA 1.4 NUCLEACION Y CRECIMIENTO DE CRISTALES DE HIELO [29]



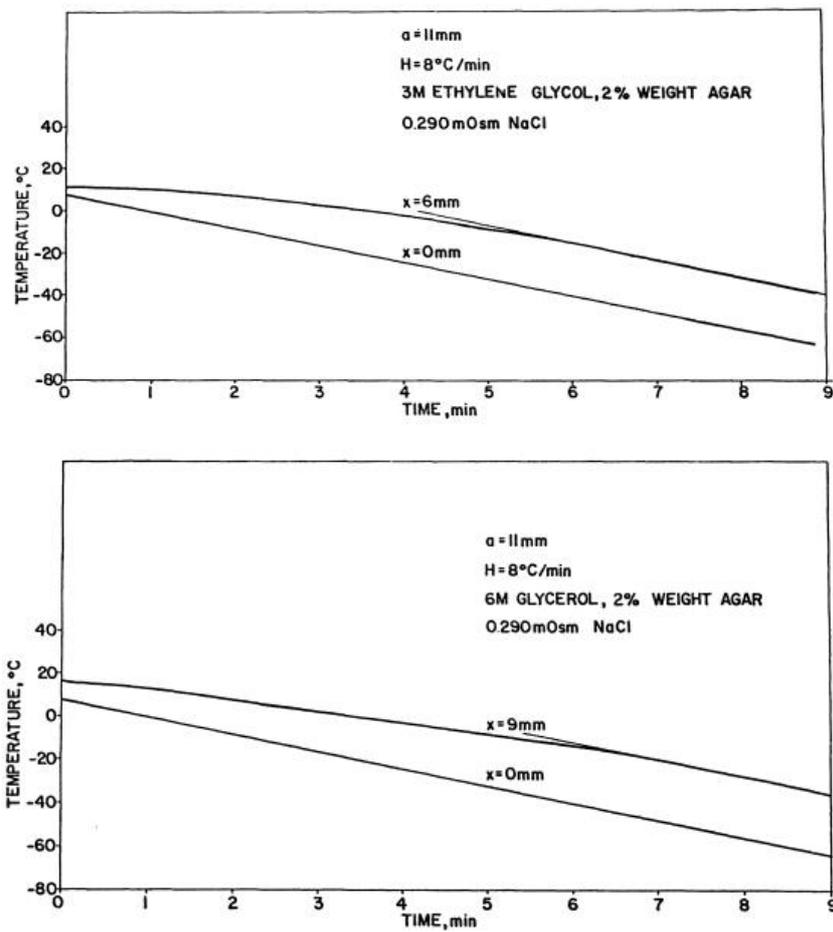
Por lo tanto, calentar una muestra criopreservada es una carrera a contrarreloj. Pierre Boutron indica que durante el calentamiento hay órdenes de magnitud de diferencia en el número de núcleos en el hielo, todos con potencial de crecimiento [4]. Es una regla general que el calentamiento se haga a mayor velocidad que el enfriamiento.

FIGURA 1.5 RECALENTAMIENTO RÁPIDO VS RECALENTAMIENTO LENTO



Todo lo comentado hasta ahora tiene validez si tratamos con células en suspensión. Al trabajar con tejidos y por extensión con órganos debemos tener en cuenta que el sistema es más heterogéneo y contiene numerosas hileras de células en contacto estrecho unas con otras. Este efecto de “empaquetamiento”, como describió Pegg [21] añade nuevos retos en la labor de criopreservación. No solo es más difícil y requiere más tiempo que los anticongelantes hagan su trabajo de protección al haber células que escudan a otras, sino que por este “acolchamiento” la transferencia de calor es más dificultosa. Cuanto mayor es la sección de la muestra que se pretende conservar es el aporte de calor a la misma. Esto es así para el enfriamiento y especialmente para el calentamiento, que como hemos mencionado es más rápido que el enfriamiento. Rubinsky nos permite visualizarlo en la siguiente figura [27]:

FIGURA 1.6 TRANSFERENCIA DE CALOR EN FUNCIÓN DEL GROSOR DE LA MUESTRA

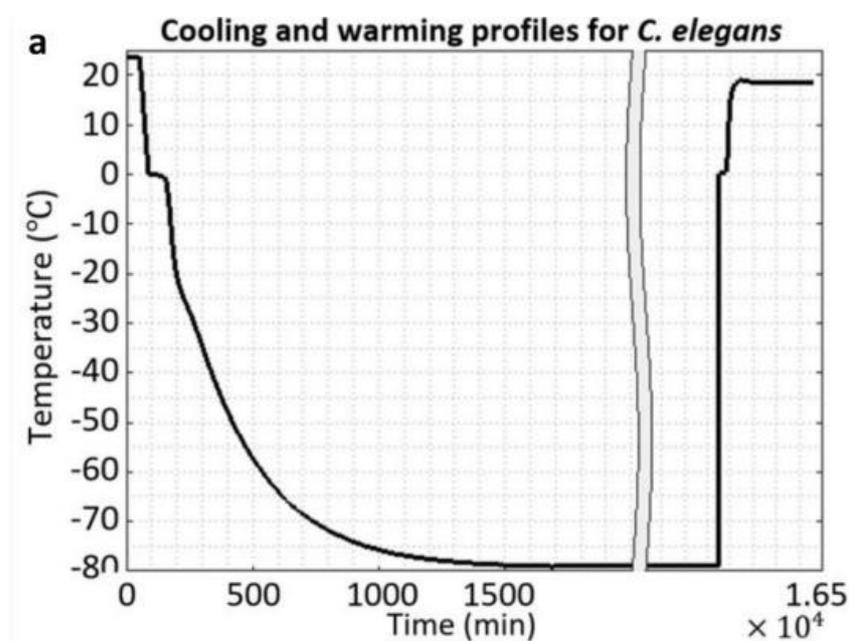


Todas estas dificultades no han sido obstáculo para que en 2009 Gregory M. Fahy recuperara satisfactoriamente riñones de conejo [8]. Recientemente, el equipo de John C. Bischof consiguió lo mismo en riñón de rata, aunque con una técnica de recalentamiento diferente [10].

1.2 El recalentamiento

Desde los años 40 se han propuesto diferentes técnicas de recalentamiento para recuperar las muestras con el menor daño posible. Pese a que se haya impuesto el recalentamiento en baño de agua o baño salino, existen diversas alternativas que tratan de alcanzar las velocidades de recalentamiento que los nuevos tejidos investigados requieren. Estas incluyen el recalentamiento por microondas, el recalentamiento de inducción con partículas ferromagnéticas, el calentamiento por perfusión caliente y más recientemente el calentamiento por ultrasonidos focalizado de alta intensidad (HIFU). Este último, desarrollado por el grupo CRYOBIOTECH en la Universidad de Sevilla a conseguido la criopreservación de nematodos adultos en grandes grupos [1], mostrando las bonanzas que el sonido puede traer a este campo. Esta técnica da cuerpo al presente trabajo.

FIGURA 1.7 HISTORIA TERMICA DE LA PRESERVACIÓN DE C-ELEGANS



La técnica HIFU es especialmente prometedora porque permite un calentamiento penetrante de alta velocidad y homogéneo en la región cercana al foco acústico. Además, es una técnica escalable en tanto que permite modificar la posición, geometría y tamaño del foco empleando varios transductores a la vez y controlando la fase, la amplitud y la frecuencia de las ondas acústicas empleadas [18]. Esta técnica es compatible con la imagen médica a través de resonancia magnética, lo que permite la monitorización del calentamiento en tres dimensiones y en tiempo real [26]. Los detalles de esta técnica se explican en el capítulo de *Materiales y métodos*.

1.3 Criopreservación de aorta

Los buenos resultados obtenidos con nemátodos llevan a aplicar la técnica de recalentamiento HIFU a tejidos. El tejido vascular es un tejido de interés médico, además de disponer de varios tipos de células diferentes. Las arterias principalmente son objeto de recolección para trasplantes, especialmente para operaciones de bypass coronario. El banco europeo de injertos recoge 30 años de extensa e intensa actividad de criopreservación de estos tejidos [EHB 30]. Generalmente los injertos se preservan sin células por lo que el procedimiento de criopreservación no ha prestado especial interés a la supervivencia más allá del “andamiaje” que tras el trasplante se repoblará con células del paciente receptor. La estructura de este tejido es fundamental para retener la función contráctil. Estudios de Pegg y Bujan [20] [3] han prestado atención a la formación de estructuras en los anillos de aorta, aunque también esta última se ha interesado por la supervivencia de las células endoteliales. El protocolo de criopreservación de aorta está bastante estandarizado e implica en términos generales una velocidad de enfriamiento de 1°C/min, una velocidad de calentamiento de 100°C/min (en baño a 37°C en 5 minutos) y un anticongelante con base en DMSO diluido hasta un 10-15% de concentración. Todos estos factores dan lugar a una supervivencia celular de entre 60-90% según autores [3] [30].

1.4 Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es validar la técnica de HIFU por primera vez sobre tejido, para lo cual se ha elegido la aorta de ratón. Para conseguir este objetivo se han determinado tres objetivos secundarios:

1. Modelar de forma precisa el comportamiento de los ultrasonidos en las condiciones de contorno del experimento.
2. Ensayar el recalentamiento de aortas con el transductor explorando una horquilla de parámetros previamente propuestos con las simulaciones.
3. Disponer de un protocolo de criopreservación de aorta que permita unas tasas de supervivencia similares o superiores a las obtenidas a las técnicas de calentamiento actuales.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Como se ha explicado anteriormente, el objetivo de este trabajo consiste en validar la técnica de Ultrasonidos Focalizados de Alta Intensidad (HIFU) en el recalentamiento de tejidos criopreservados. El tejido elegido es la arteria aorta en su porción torácica de *Mus musculus*. La preservación de las aortas se realiza mediante los protocolos estándar, que a efectos de aportar claridad se detallan a continuación, pero que se encuentran recogidos en los trabajos de David Pegg [20][12] y Julia Buján [3] [19].

El protocolo estándar de criopreservación de aorta emplea un enfriamiento a $-0.6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ apoyándose en el DMSO como agente crioprotector. La concentración en volumen de esta sustancia varía entre el 10% y el 15% según el autor [20] [3], con ambos valores arrojando resultados similares. Para ello, nuestras aortas serán enfriadas siguiendo el *Protocolo de slow freezing de aorta* (ver apartado) y serán almacenadas en el supercongelador NUAIRE presente en nuestro laboratorio. El recalentamiento estándar de las muestras emplea el aporte convectivo y conductivo de calor proporcionado por un baño salino o de agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta modalidad permite velocidades de calentamiento de entre $100\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y $130\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ [20][13]. Nuestra técnica emplea ultrasonidos HIFU para conseguir velocidades de calentamiento superiores con los equipos y procesos que se describirán más adelante, además de proporcionar un calentamiento dirigido, volumétrico y homogéneo. Tras completar el *Protocolo de recalentamiento con HIFU* inmediatamente después se procede a realizar el *Protocolo de viabilidad de aorta* que nos permite cuantificar la bondad de esta técnica y su comparativa con las empleadas a día de hoy en hospitales y centros de investigación.

A continuación, se explican en detalle los materiales utilizados durante la investigación y las etapas y protocolos mencionados anteriormente.

2.1 Transductor HIFU

El HIFU (del inglés "High-Intensity Focused Ultrasound") es una técnica médica no invasiva que utiliza ondas de ultrasonido de alta frecuencia para tratar diversas afecciones, incluyendo cáncer, trastornos neurológicos y estéticos [31]. El principio de funcionamiento consiste en el uso de ondas mecánicas generadas por un transductor piezoeléctrico que, al orientarse hacia un punto en el espacio, genera un patrón de interferencias que produce alta y baja presión sonora. Estas vibraciones se traducen en el calentamiento del medio a través del cual se transporta la energía, dando lugar a un calentamiento mayor allá donde las ondas se "concentran" o "focalizan". La geometría del transductor permite "focalizar" las ondas en un punto determinado. Nuestro trabajo emplea equipamiento HIFU especialmente preparado para aplicaciones de criopreservación. El dispositivo de HIFU consta de tres partes principales:

- **Transductor:** Es la parte del dispositivo que emite las ondas de ultrasonido de alta frecuencia mediante efecto piezoeléctrico. Se trata de un casquete esférico de 50.8 mm de radio, del material PTZ-8 (Lead-Titanate-Zirconate). Los polos del casquete son la

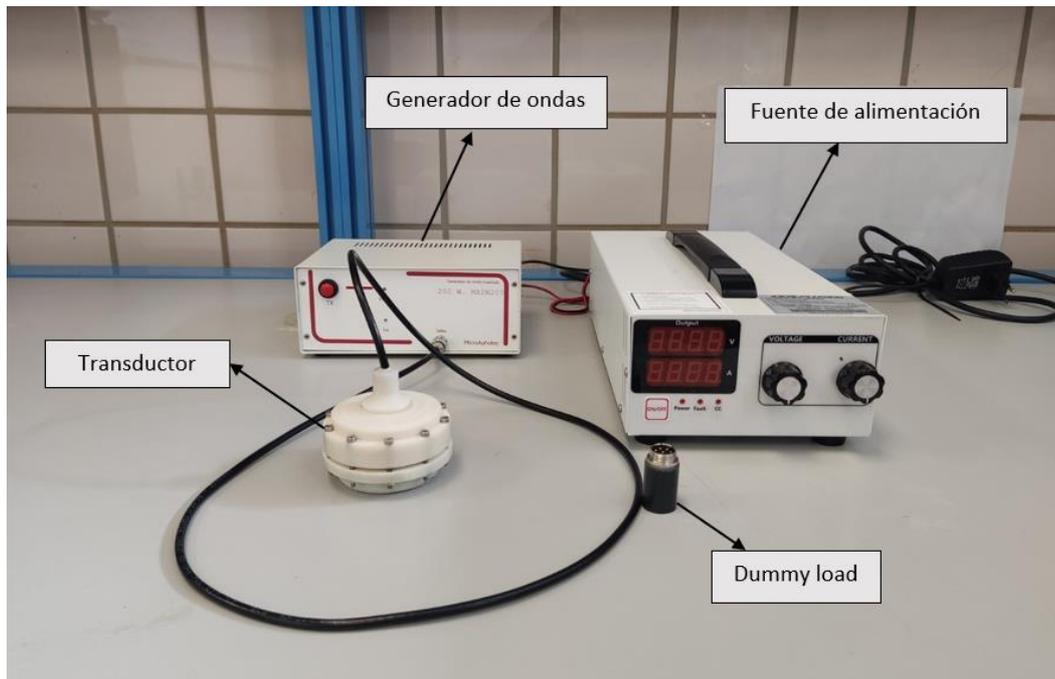
superficie exterior (cóncava, en contacto con el medio) e interior (convexa, aislada). Éste se encuentra inserto en un cilindro sellado con junta tórica con una apertura para el casquete de 44 mm. Tras el casquete-transductor se halla una cámara de aire de alta impedancia acústica que provoca el reflejo de las ondas y aumenta la eficiencia del equipo [7], permitiendo que los ultrasonidos sólo se propaguen hacia el centro del casquete esférico, de forma normal a su superficie. Las conexiones eléctricas de los polos se ubican en la cámara de aire, protegidas del entorno, y se rutan hacia el generador de ondas por medio de un robusto cable coaxial y conector BNC. El casquete tiene una frecuencia de resonancia de 1.5 MHz.

FIGURA 2.1 TRANSDUCTOR



- **Generador de ondas:** El generador de ondas crea la oscilación de alta frecuencia para excitar el casquete piezoeléctrico. Es capaz de generar ondas de hasta 1.224 MHz y 60V de amplitud. La electrónica del circuito es la propia de un convertidor DC-AC, si bien los transistores MOSFET de potencia empleados y sus controladores operan a una frecuencia muy elevada, proporcionada por un oscilador de cuarzo, y todo el sistema es controlado por un microprocesador. La conmutación entre los valores alto y bajo en la señal de salida se ha visto ralentizada para evitar el efecto crossover en los transistores, que al operar a tan elevada corriente y voltaje destruiría el circuito si este se produjera. La operación del generador es sencilla: basta con pulsar el botón de encendido/apagado. El estado del transductor se visualiza mediante indicadores LED. La eficiencia del sistema empleado es del 80%.
- **Fuente de alimentación:** La entrada del generador de onda es proporcionada por una fuente de alimentación de 200W con reguladores para corriente y tensión. Los diales rotativos permiten una sensibilidad de 0.01 A y 0.01 Vdc. La fuente se calibra antes de cada ronda de experimentos y con revisiones periódicas para garantizar que la potencia entregada es la adecuada. Para este fin, una “dummy load” es empleada para elegir el límite de corriente. A efectos prácticos, no se emplean potencias de más de 60W, lo que se traduce en un voltaje de 30 voltios y una corriente de 1.8 amperios.

FIGURA 2.2 SET UP CALENTAMIENTO CON HIFU

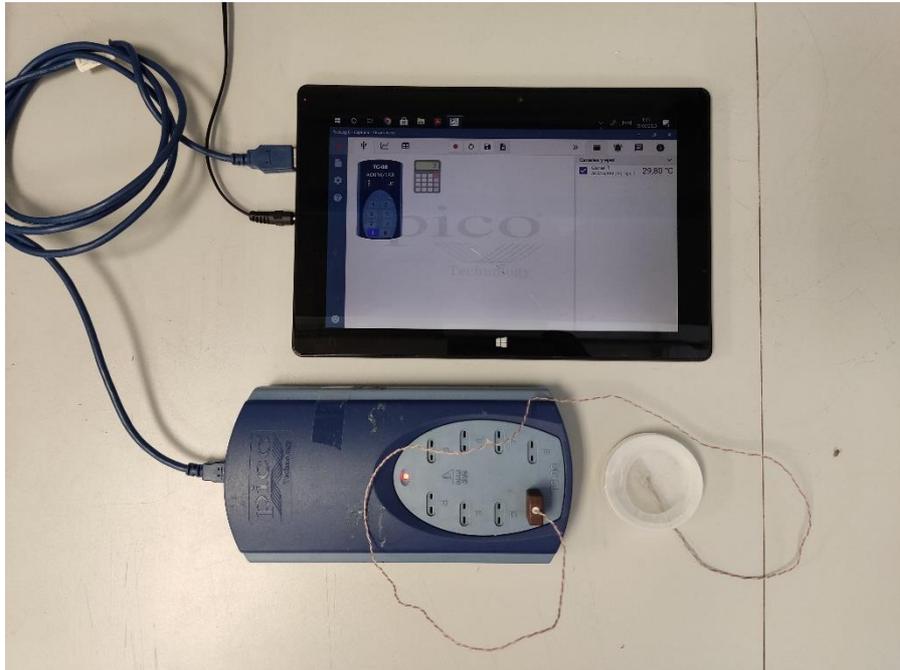


2.1.1 Cálculo del foco del HIFU

Antes de empezar con los experimentos de calentamiento, es necesario calcular la distancia a la que se encuentra el foco del transductor del HIFU. El foco es el punto geométrico en el que las ondas se concentran y producen el calentamiento deseado en el tejido objetivo. Esta distancia se puede obtener de forma teórica porque viene ya especificada por el propio diseño del transductor y es el centro geométrico de la esfera cuyo casquete ha sido seccionado. Su valor teórico es de 50.8 mm. No obstante, Debido a posibles imperfecciones en el mecanizado del casquete cerámico o en su ensamblaje dentro del cilindro, es competente realizar un cálculo experimental de la posición del foco.

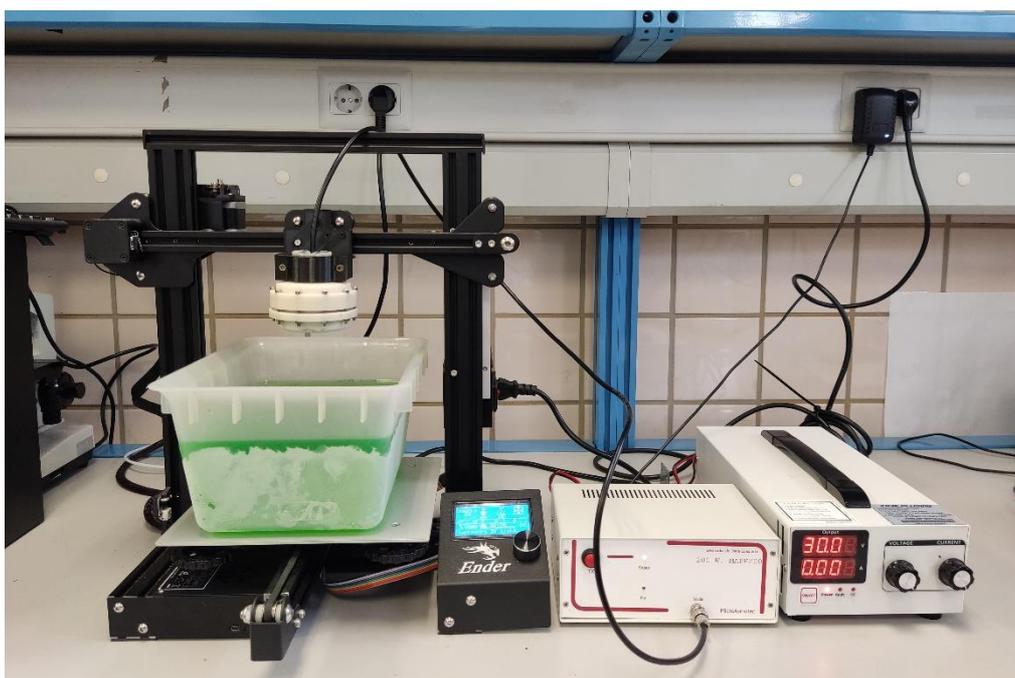
Se decidió realizar la determinación del foco mediante el uso de termopares. Con éstos se puede medir, en el punto del espacio bajo estudio, la velocidad de calentamiento y el aumento de temperatura en un tiempo determinado. El método a seguir fue realizar 9 “disparos” de ultrasonidos de varios minutos de duración con una diferencia de 10 milímetros de distancia entre cada disparo (de 10 a 90 mm) desde el transductor a una cota cero, para obtener de esta forma la curva de calentamiento en cada punto de la vertical (eje Z). La toma de datos se realizó con un TC-08 Data Logger de Pico Technologies, muestreando cada 100 ms con termopares tipo T. El software empleado para la visualización y guardado de los datos es PicoLog 6, de Pico Technologies.

FIGURA 2.3 DATA LOGGER Y TABLET CON PICOLOG



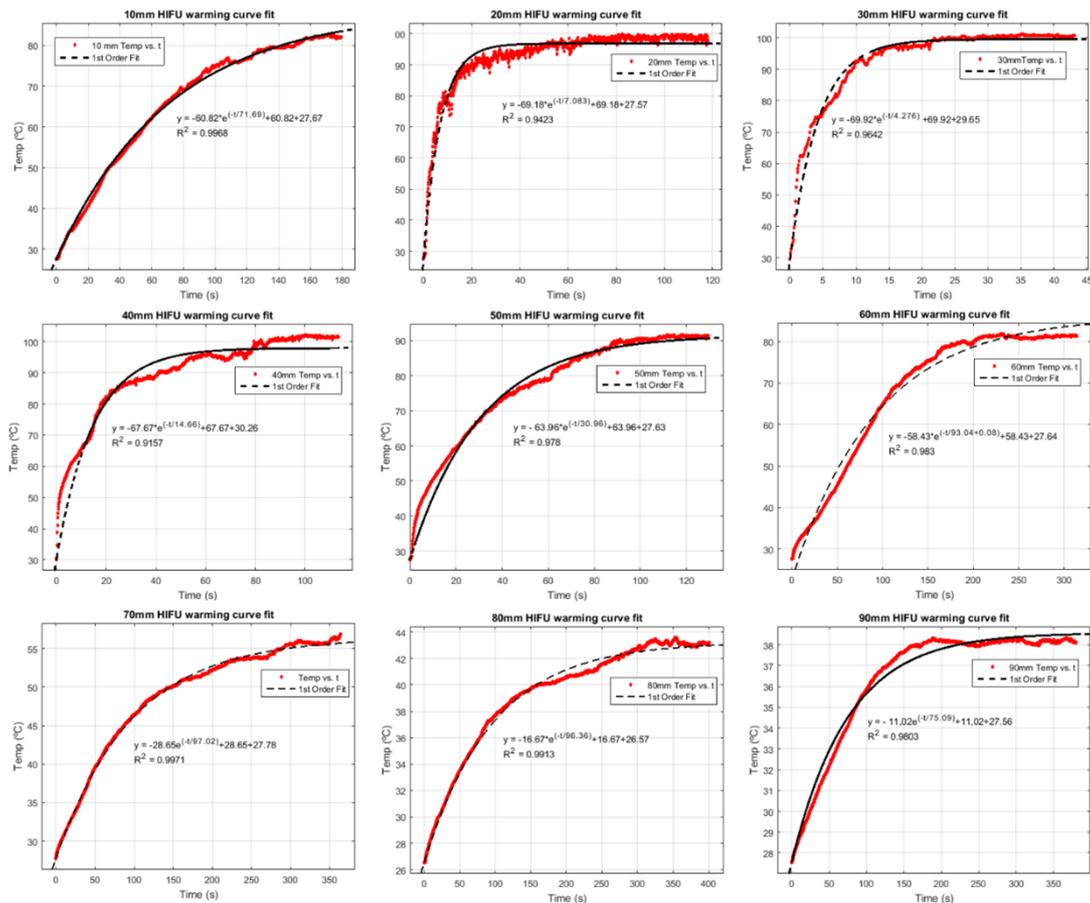
Para desplazar el transductor se empleó una impresora 3D Ender 3 Pro, de CREALITY. La impresora 3D proporcionaba una estructura móvil con la suficiente robustez y precisión como para desplazar el cabezal del transductor a la posición deseada y así ir cambiando las distancias en el eje Z. Se enganchó el transductor a la barra horizontal (eje X) de la impresora con una abrazadera previamente diseñada para otros trabajos de este laboratorio y construida con técnicas de manufactura aditiva.

FIGURA 2.4 MONTAJE PARA DETERMINACIÓN DEL FOCO



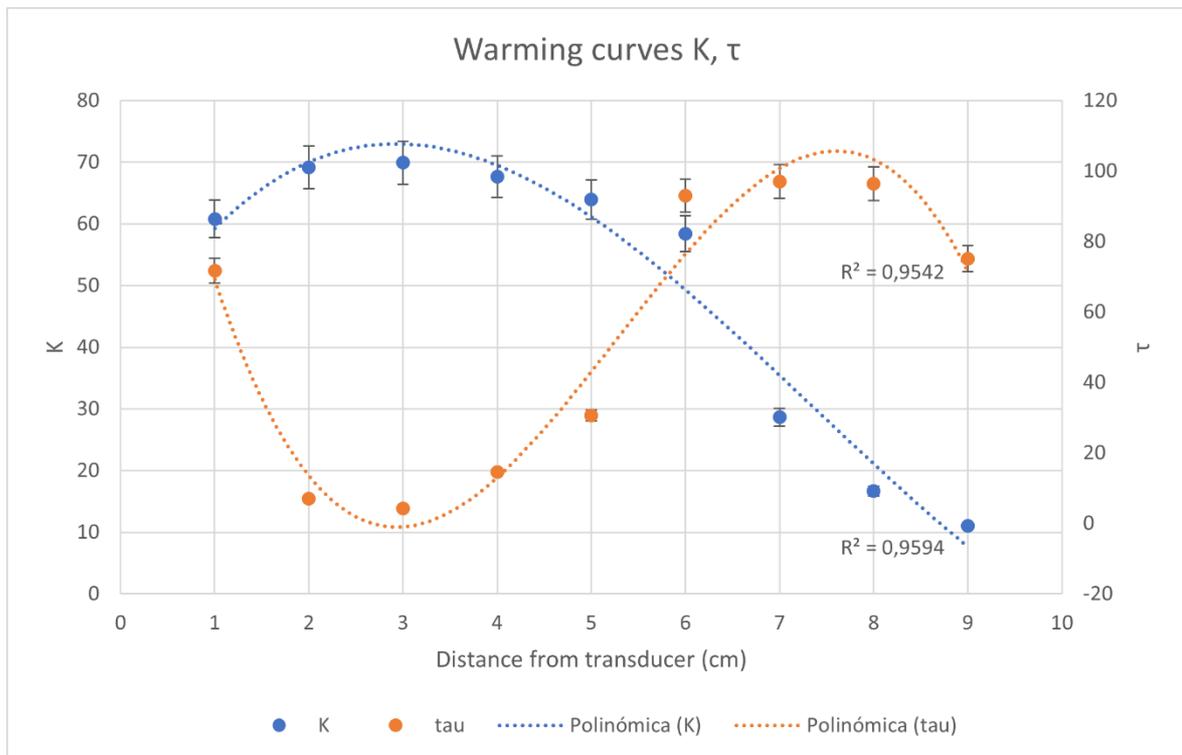
Los “disparos” se realizaron a 30Vdc y 1.8A, que tras computar la eficiencia del generador da una potencia eléctrica de 43W. La evolución de la temperatura con respecto al tiempo se ajustó en Matlab empleando un modelo de sistema de primer orden como se recoge en [28]. Para cada curva, se extrajeron la ganancia, K (que indica el aumento total de temperatura) y el tiempo característico (τ) para la subida, medido como el tiempo hasta que la temperatura alcanza el 63% de su valor final. A continuación, se muestran las curvas de calentamiento para cada distancia y sus correspondientes ajustes.

FIGURA 2.5 CURVAS DE CALENTAMIENTO PARA CADA DISTANCIA (10-90mm)



En las gráficas anteriores se aprecia una subida más pronunciada entre los 20 y los 50 mm. El aumento total de temperatura es también mayor en este rango de distancias focales. Al inspeccionar los datos presentados en la siguiente figura, se observa que el tiempo característico τ del sistema presenta un mínimo local en 30 mm, que coincide con el máximo local de K, también en 30 mm. Es interesante considerar este máximo local para K, que, de tratarse del foco, sería el máximo absoluto para todo su dominio. Este punto ubicado a 30 mm de la base del transductor sería el lugar geométrico del foco, donde el calentamiento es mayor y más rápido, coherente con los valores máximo de K y mínimo de τ , respectivamente. Los valores de K y τ se presentan en la siguiente figura.

FIGURA 2.6 COMPARATIVA DE K Y τ DE LAS CURVAS DE CALENTAMIENTO



Es importante remarcar que el foco no se encuentra a 30 mm. Estos 30 mm representan la separación desde la base del transductor. A éste se le ha de sumar la distancia al punto más alejado del casquete, que para el presente caso es de 10 mm. También se ha de añadir el offset propio de la impresora 3D. de 10 mm. Esto da una distancia final del foco de 50 mm, coherente con el valor teórico. En este punto se consigue un aumento de temperatura de 80 °C en tiempos inferiores al minuto. Este aumento de temperatura permite que, para una muestra almacenada a -80 °C, el uso de HIFU durante un minuto permita alcanzar temperaturas superiores a los 0 °C.

2.1.2 Soporte 3D

Una vez obtenido el foco, se diseñó un soporte en 3D para recalentar las muestras. Se pretendía colocar la placa de la muestra de modo que la distancia de ésta al transductor sea siempre coincidente con la posición del foco. Este soporte se imprimió con una impresora 3D Ender 3 Pro de CREALITY y se utilizó durante todo el proceso para la realización de las pruebas y experimentos. El soporte permite sostener el transductor en la posición preferida y aloja la placa de Petri. Se ha diseñado para placas de 50 mm de diámetro, que se pueden colocar y retirar de forma sencilla por las aberturas y agarres de presión diseñados específicamente para ello.

A continuación, se muestra una figura del soporte y una tabla con las principales características de impresión:

FIGURA 2.7 SOPORTE 3D PARA REALIZAR LOS DISPAROS

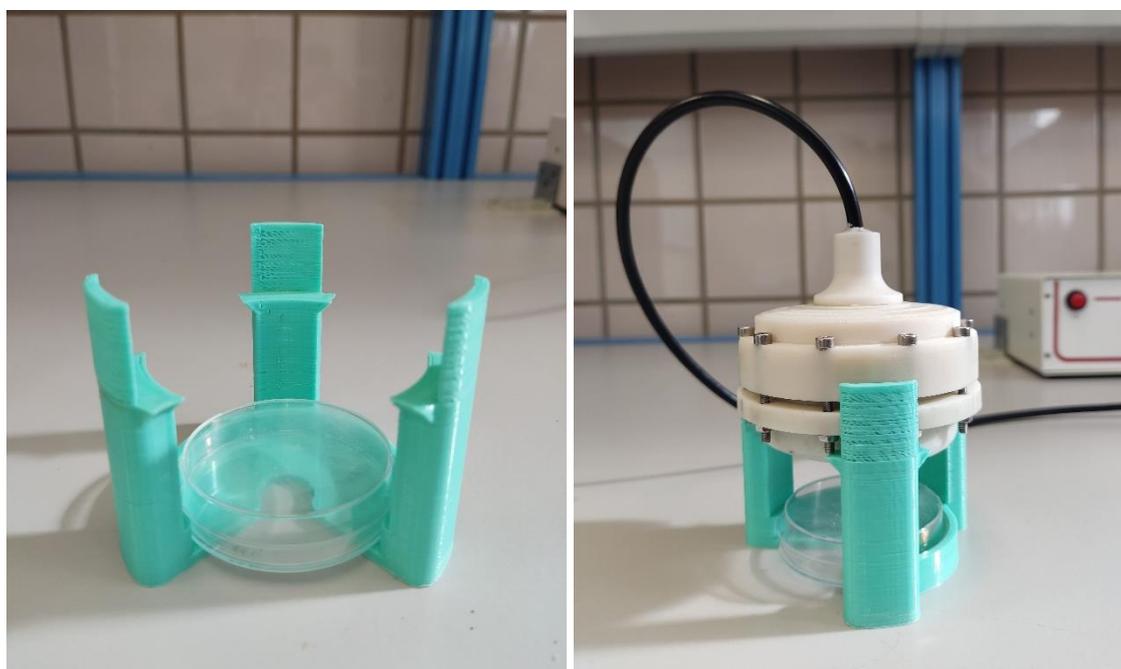


TABLA 2.1 CARACTERÍSTICAS DE IMPRESIÓN DEL SOPORTE

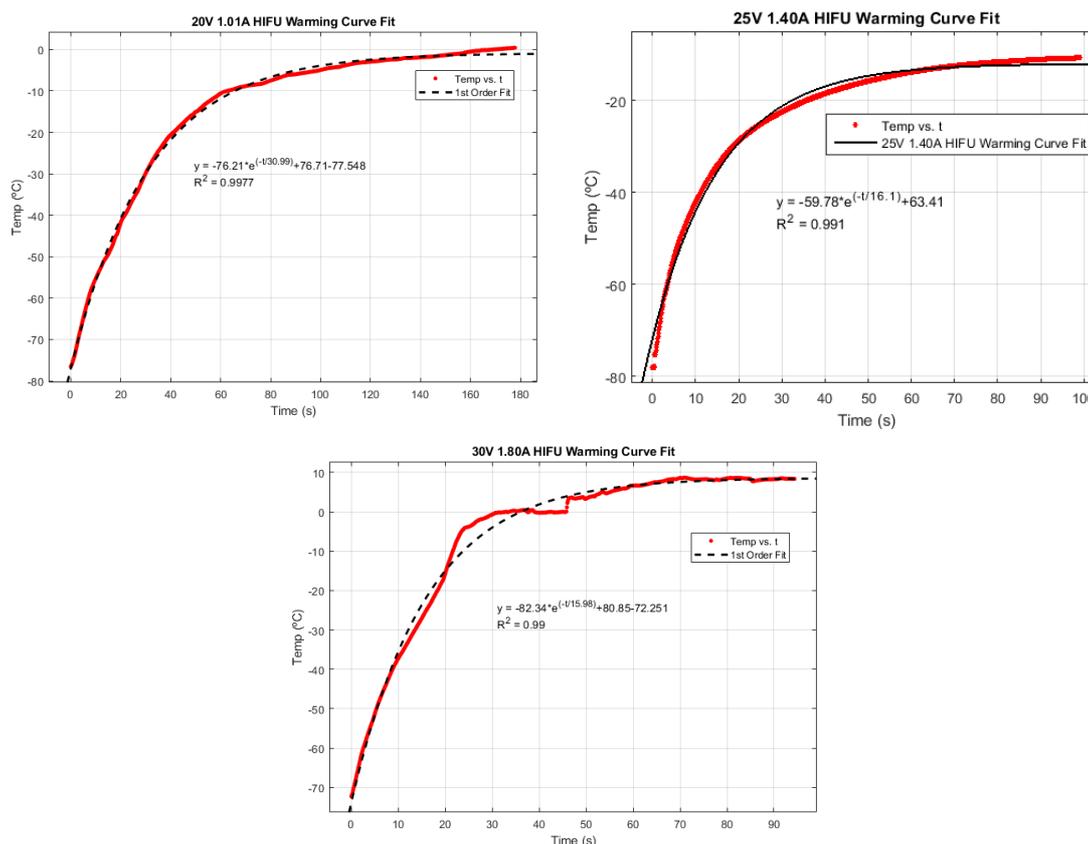
Material	Ácido poliláctico (PLA)
Método de fabricación	FDM (F)
Temperatura de fusión	200°C
Infill	20%
Altura de capa	0,2 mm
Velocidad de cabezal	80 mm/s
Temperatura de cama caliente	60°C
Soporte	No

2.1.3 Curvas de temperatura del HIFU

Tras calcular experimentalmente la distancia óptima que tiene que haber desde el transductor a la muestra (foco), se realizan una serie de pruebas con el HIFU para ver qué tiempo de exposición es el óptimo para alcanzar la temperatura final que se desea, según la potencia empleada en la fuente.

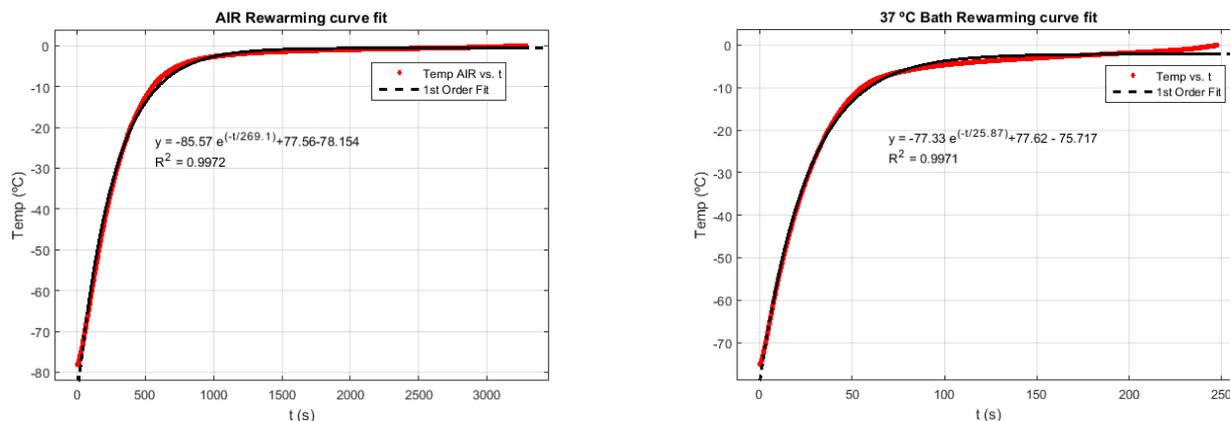
A continuación, se muestran las curvas de calentamiento de 20V (1 A), 25V (1.4 A) y 30V (1.8 A), lo que se traduce en potencias de 20 W, 35 W y 54 W, antes de computar la eficiencia.

FIGURA 2.8 CURVAS DE CALENTAMIENTO A 20V, 25V Y 30V



A modo comparativo se ofrecen las curvas de calentamiento para el caso de recalentamiento en aire a temperatura ambiente y para el caso de recalentamiento en baño de agua a 37°C, calculadas como se ha indicado anteriormente.

FIGURA 2.9 CURVAS DE CALENTAMIENTO DE AIRE Y AGUA



A continuación, se muestra una tabla comparativa con las velocidades de calentamiento para los cinco casos expuestos en este apartado.

TABLA 2.2 VELOCIDADES DE CALENTAMIENTO

Método		τ	K	Velocidad de calentamiento entre -60°C y -40°C
HIFU	20 V	30,99	76,21	80 °C/min
	25 V	16,1	59,78	150 °C/min
	30 V	15,98	82,34	200 °C/min
Aire		269,1	85,57	10 °C/min
Agua 37°C		25,87	77,33	100 °C/min

Se puede observar que el calentamiento HIFU es más rápido si usamos 30V, siendo el doble de rápido que el calentamiento de agua a 37°C, y 20 veces más rápido que el calentamiento en aire.

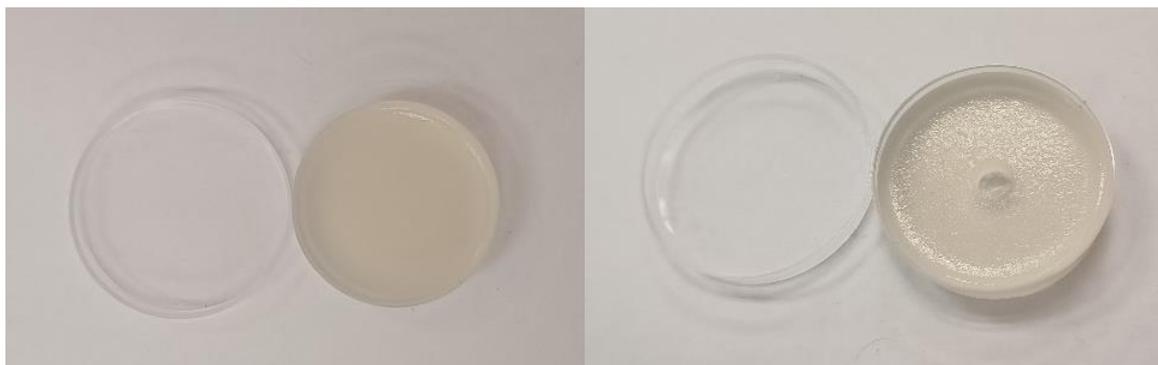
2.2 Preparación de muestras

Dado los buenos resultados que se obtuvieron previamente en esta línea de investigación con el recalentamiento con HIFU de *C-Elegans* [1] se decidió dar continuidad y pasar a un siguiente nivel, probando esta vez el calentamiento de tejido de aorta de ratón, un tejido con varios tipos de células, vascular y de gran interés médico para su trasplante.

La cepa de ratón elegida para obtener las muestras a recalentar fue la CD1. Estos tenían 9 meses de edad y eran recogidos del Centro de Experimentación Animal del Hospital Universitario Virgen Macarena. El sexo de los ratones no fue considerado en esta investigación. Todas las prácticas llevadas a cabo con este modelo animal se encuentran en consonancia con la legislación nacional y europea al respecto del uso adecuado y ético de seres vivos para investigación.

Previamente a la extracción de las muestras se prepara el contenedor donde serán guardadas las muestras de aorta individualmente para su posterior trato. Como contenedor para cada muestra se han usado placas de Petri, las cuales se rellenan de una disolución de 24 g/L agar en agua destilada. En el centro de la placa se fabrica un pocillo de 9 milímetros de diámetro y 6 milímetros de profundidad, sirviéndose de una punta de pipeta de 1 mL de volumen para este fin. Por último, se sellaron las placas con laca de alcohol isopropílico para la impermeabilización del pocillo. Las bondades de esta técnica se hallan recogidas en el trabajo de Alcalá et al. [1].

FIGURA 2.10 PLACAS DE AGAR



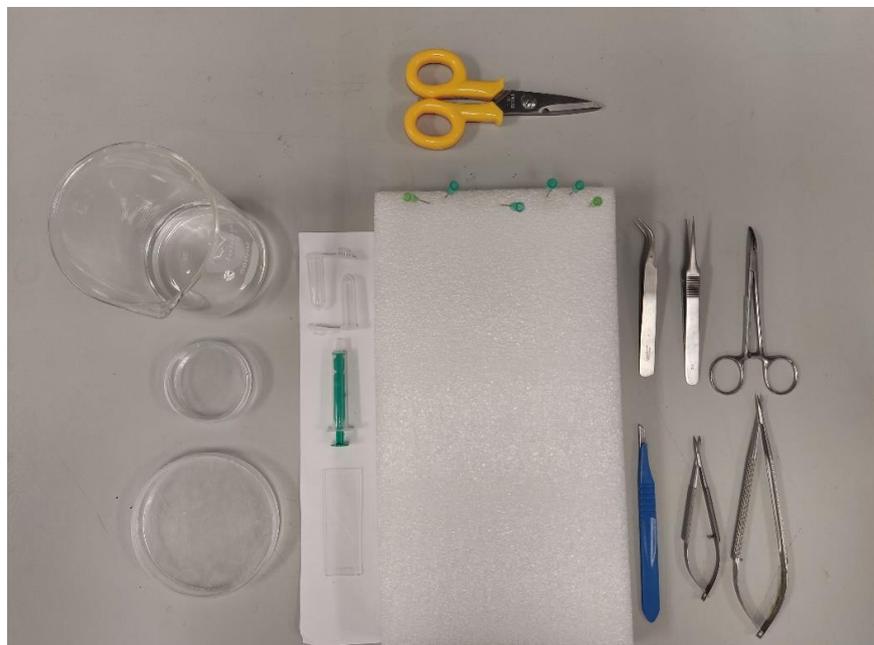
Una vez tenemos las placas listas, es necesario proceder a la preparación de las muestras de material biológico a calentar. El objetivo de este proceso es conseguir anillos de aorta torácica de 1 mm de longitud.

Unos 30 minutos antes de empezar la cirugía, se le inyecta heparina (en nuestro caso Enoxaparina Rovi) al ratón en el vientre inferior, ajustando la dosis a su peso. Con ello se evita que, después del sacrificio, la sangre coagule y se pueda exanguinar la aorta con mayor facilidad.

El sacrificio del ratón se realiza mediante dislocación cervical, una forma de sacrificio que provoca la separación de las vértebras cervicales y que no hace sufrir al ratón. Para comenzar la cirugía, se inmoviliza al ratón sobre el porexpan como se muestra en la figura siguiente. Primero se realiza un corte con la tijera sobre la piel del esternón y luego un corte en la piel hacia cada lado de la parrilla costal. Con ayuda de las pinzas y las tijeras Wescott se va cortando y abriendo acceso a la caja torácica para llegar a la aorta. Primero se extrae el corazón dejando intacto el segmento que va desde la válvula aórtica al cayado, para poder aprovecharlo en otros experimentos (para el presente trabajo no tiene relevancia, se recomienda ver el apartado de conclusiones y líneas futuras). Una vez extraído el corazón, se eliminan los tejidos que no son de interés, y con la tijera en posición casi horizontal desde el timo se inicia el corte de extracción de la aorta a ras con la columna vertebral hasta llegar a la pelvis. De esta forma, se aprovecha la mayor longitud de aorta

posible. Esta extracción implica la obtención de la sección torácica y abdominal de la aorta. Si bien el estudio se centra sobre la porción torácica, es conveniente disponer de segmentos adicionales para paliar posibles incidentes futuros.

FIGURA 2.11 MATERIAL QUIRÚRGICO DE LA EXTRACCIÓN DE AORTA



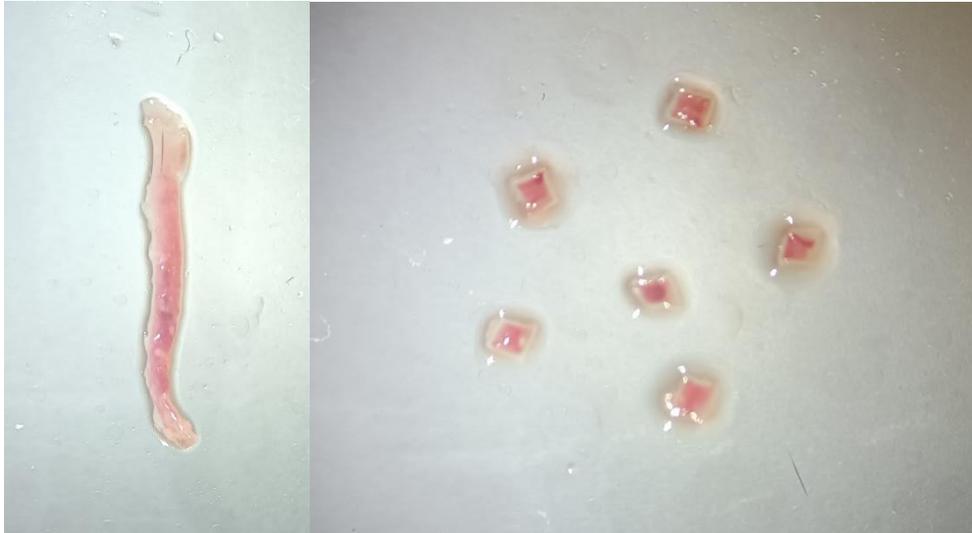
A nivel general lo que se extrae en primera instancia de la caja torácica es parte del tracto digestivo (esófago), tracto respiratorio (final de la tráquea, bronquios, pulmones) y aorta descendente. Este conjunto se coloca en una placa con Blu Tack previamente enfriada y se le añade solución de Krebs. Con ayuda de las agujas se sujeta el conjunto al Blu tack (con cuidado de no atravesar la aorta) y bajo una lupa estereoscópica binocular se va eliminando el tejido que no es de interés con ayuda de las tijeras Wescott. Este proceso continúa hasta tener la aorta totalmente limpia, sin recubrimiento adiposo, tal como muestra la siguiente imagen.

FIGURA 2.12 LIMPIEZA DE AORTA



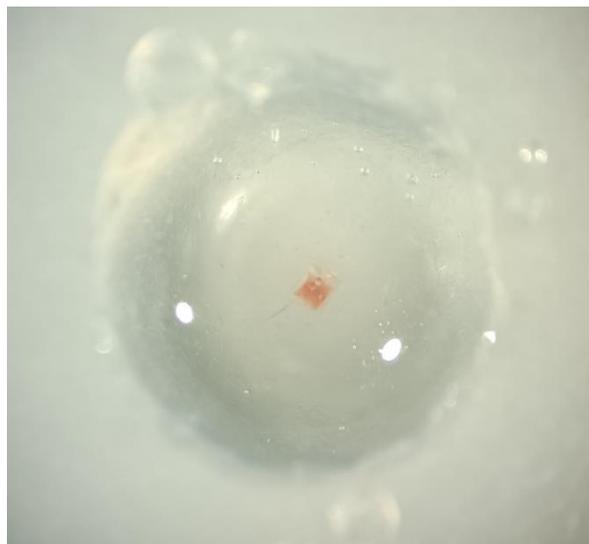
En una placa de Petri preenfriada (4°C) se depositan unas gotas de solución Krebs junto con la aorta. Esta temperatura es necesaria para reducir la isquemia caliente, ralentizando el metabolismo del tejido y su deterioro. Bajo un esteroscopio binocular (Optika SZM-2) y con ayuda de un bisturí se corta la aorta en anillos de 1-2 mm aproximadamente. De una aorta pueden salir entre 10 – 14 anillos.

FIGURA 2.13 AORTA LIMPIA Y ANILLOS DE AORTA BAJO LUPA BINOCULAR



Cada anillo de aorta se coloca dentro un pocillo de una placa de Petri (cuya preparación ya se ha explicado al inicio de este apartado) que contiene la solución crioprotectora. Finalmente, estas se cierran con Parafilm para que queden estancas y son enumeradas y fechadas para su posterior control.

FIGURA 2.14 AORTA EN EL INTERIOR DEL POCILLO



2.3 Protocolo de Slow freezing de aorta

Actualmente en la criopreservación hay dos aproximaciones al enfriamiento: el slow freezing y la vitrificación. Este último a su vez se puede dividir en vitrificación de equilibrio (liquidus tracking) o de no equilibrio. En el presente trabajo se ha decidido optar por el método de enfriamiento conocido como slow freezing, ya que actualmente es el protocolo estándar y muestra unos buenos resultados en diferentes tipos de muestras [20][3]. La técnica de enfriamiento por slow freezing permite emplear concentraciones de anticongelante más bajas, por lo que, para nuestro interés, un 15% de DMSO en Krebs será suficiente.

FIGURA 2.15 SOLUCIONES ANTICONGELANTES



Las reacciones con DMSO son generalmente exotérmicas. La temperatura de la solución se eleva varios grados al añadir este soluto, por lo que no se debe añadir el segmento de aorta a la solución crioprotectora recién elaborada [17]. Por ello, así como para que las aortas disfruten de un entorno hipotérmico que mitigue la isquemia caliente, las placas se dejan enfriar durante una hora en una nevera convencional a 4°C. Posteriormente se añaden las muestras y se devuelven las placas a la nevera para facilitar la difusión de la solución crioprotectora al volumen completo de la aorta. Finalmente, son transportadas a una habitación anexa donde se encuentra el ultracongelador biológico (Nuair NU-6511E) que alcanza los -80°C. Este traslado se realiza en una caja isotérmica de porexpan modificada para evitar cambios bruscos de temperatura y para garantizar que la velocidad de enfriamiento alcance los -0.6 °C/min

Se realizaron experimentos con un total de 33 aortas de ratón, de estas un grupo (N=24) se criopreservaron en un 15% en DMSO mediante slow freezing a una velocidad de -0,6°C/min hasta -80°C, y fueron recalentados con ultrasonidos a diferentes voltajes y con diferentes tiempos de exposición. Otro grupo (N=9) fue criopreservado siguiendo el mismo protocolo que el grupo anterior con la salvedad de que fue recalentado en baño a 37°C siguiendo el protocolo estándar para este tipo de muestra.

2.4 Protocolo de recalentamiento con HIFU

Como sucede con el enfriamiento, para el recalentamiento hay varios métodos en estudio dentro de la criopreservación. El protocolo estándar de recalentamiento es en baño salino o de agua a 37°C, aunque también puede realizarse en aire a temperatura ambiente, etc.

Antes de empezar el protocolo de recalentamiento con HIFU, se comprueba que se tenga todo el material necesario: las muestras congeladas, el equipamiento HIFU, cronómetro y el etilenglicol en la nevera a -25°C.

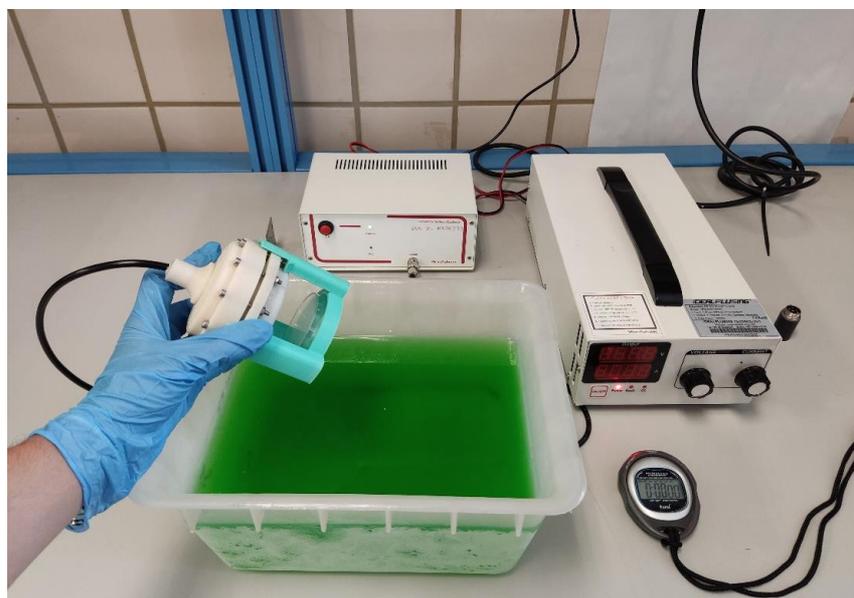
Se enciende la fuente de alimentación y el generador de ondas del HIFU y se realiza un disparo de prueba a voltaje e intensidad deseada, que en este caso es 30Vdc y 1.8 A al tener la mayor velocidad de recalentamiento como se ha mostrado anteriormente. Se saca el baño de etilenglicol, el soporte de disparo para la placa, guantes y servilletas.

Con los materiales preparados, se recoge una placa con la muestra en su interior con una caja de transporte aislante de porexpan. Esto evita que la muestra se caliente en el trayecto antes de recibir el disparo. El soporte junto con el transductor se halla sumergidos en el baño de etilenglicol. Al transductor se le debe eliminar la burbuja de aire que se forman en la concavidad del casquete; esto es sencillo simplemente volteándolo dentro de la cubeta. Rápidamente, la placa se coloca en el soporte con el HIFU tras sacarla de la caja aislante. El proceso de extracción de la placa de su caja aislante, colocación en el soporte e inmersión en el baño, hasta su disparo no debe superar los 3 segundos.

Se procede al disparo, se cronometra el tiempo del mismo, y al acabar se extrae la muestra de la placa inmediatamente para evitar que esta se vuelva a enfriar. Los disparos se realizarán con una duración variable: el tiempo de exposición a HIFU es uno de los valores de interés que modula la supervivencia de las células de este tejido. Por ello, se probaron disparos de 50, 60, 70 y 80 segundos de duración.

Siempre hay que vigilar voltaje e intensidad de la fuente de alimentación durante los disparos, así como la temperatura del generador de ondas, ruidos y olores fuera de lo normal. Si parece que haya cualquier problema se debe desenchufar todo el equipamiento inmediatamente por precaución.

FIGURA 2.16 DISPARO CON HIFU EN ETILENGLICOL



A continuación, se muestra el set up del recalentamiento en agua a 37°C, que como se comentó anteriormente se usó para calentar 9 muestras con objeto de tener un grupo de control con el que comparar los resultados.

FIGURA 2.17 CALENTAMIENTO EN BAÑO A 37°C



2.5 Protocolo de viabilidad de aorta

Al inicio se propusieron dos métodos de viabilidad de las aortas: ensayo de miógrafo y conteo celular. La técnica del miógrafo mide la capacidad contractiva del anillo de aorta al que se somete a un entorno químicamente excitante que provoca su contracción. Dada la ausencia de un equipo miográfico específico y el estado embrionario del miógrafo que estaba siendo desarrollado por nuestro equipo en aquel momento se optó como método para el conteo celular, que es una técnica destructiva para la estructura del tejido pero que preserva la integridad de las células individuales.

Para obtener los resultados de supervivencia celular hemos usado un protocolo de viabilidad celular que consiste en la digestión mecánica y enzimática del tejido.

Este protocolo viene inmediatamente después del disparo, por tanto, antes del recalentamiento con HIFU se deben tener preparados todos los materiales para la viabilidad celular, que en su mayoría son los mismos que se utilizaron para la preparación de muestras.

Se extrae con unas pinzas el anillo de aorta de la placa y se coloca en un portaobjetos junto con un poco de Krebs frío, a 4 °C. Con la ayuda de un bisturí y de la lupa esteroscopio binocular se realiza una digestión mecánica, cortando la muestra de aorta en trozos de muy pequeño tamaño para facilitar el posterior proceso de digestión química.

Para la digestión química, se introduce la muestra en un vial eppendorf de 1.5 ml (Labbox, Ref. PCRP-015-500) con una solución de Tripsina al 0.25% en Krebs (hasta 1 ml). Para que esta digestión se lleve a cabo es necesario introducir el eppendorf en una estufa a 37°C durante 20 minutos. Esto es necesario para facilitar la acción de la tripsina.

Posteriormente se separa el pellet con las células en una citocentrifugadora (Mini centrifuge, Mini-12K) durante un minuto, y con la micropipeta (Labbox, Ref. SBS-PIP100) se extraen 2 muestras de 100 µl del fondo del vial. Se coloca cada muestra en un portaobjetos de vidrio y se le aplica una tinción añadiendo 5 µL de Trypan Blue para poder realizar el conteo celular con un microscopio (Bresser). Se emplearon lentes magnificantes de x4, x10 y x40, si bien el conteo era más sencillo y rápido con la lente de magnificación x10.

FIGURA 2.18 ESTUFA, CITOCENTRIFUGADORA Y MICROSCOPIO CELULAR



El Trypan Blue ($C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$, Sigma, Ref. T81154) tiñe de azul oscuro las células muertas, de esta forma se puede diferenciar a simple vista en microscopio de las células vivas, que se ven redondas con un halo brillante.

A continuación, en la figura 2.17 se puede ver el frasco de Trypan blue al 0,4% usado en el laboratorio y en la figura 2.18 se ve una foto de la muestra bajo microscopio con la tinción realizada.

FIGURA 2.19 TRYPAN BLUE PARA TINCIÓN DE CÉLULAS

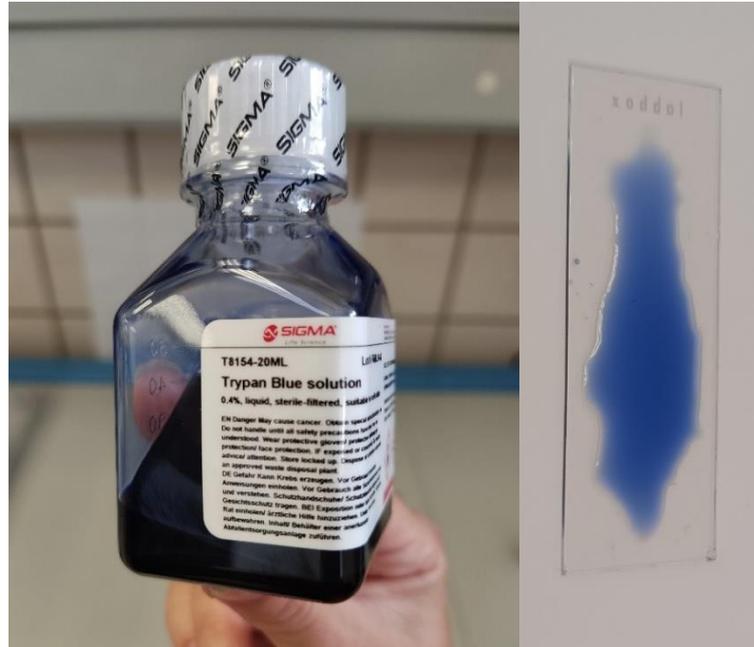


FIGURA 2.20 FOTO BAJO MICROSCOPIO DEL CONTEO CELULAR CON TRYPAN BLUE (LENTE DE MAGNIFICACIÓN X10)



2.6 Simulaciones con Comsol Multiphysics

Además de la comprobación experimental del recalentamiento también se ha realizado una simulación de éste con Comsol Multiphysics.

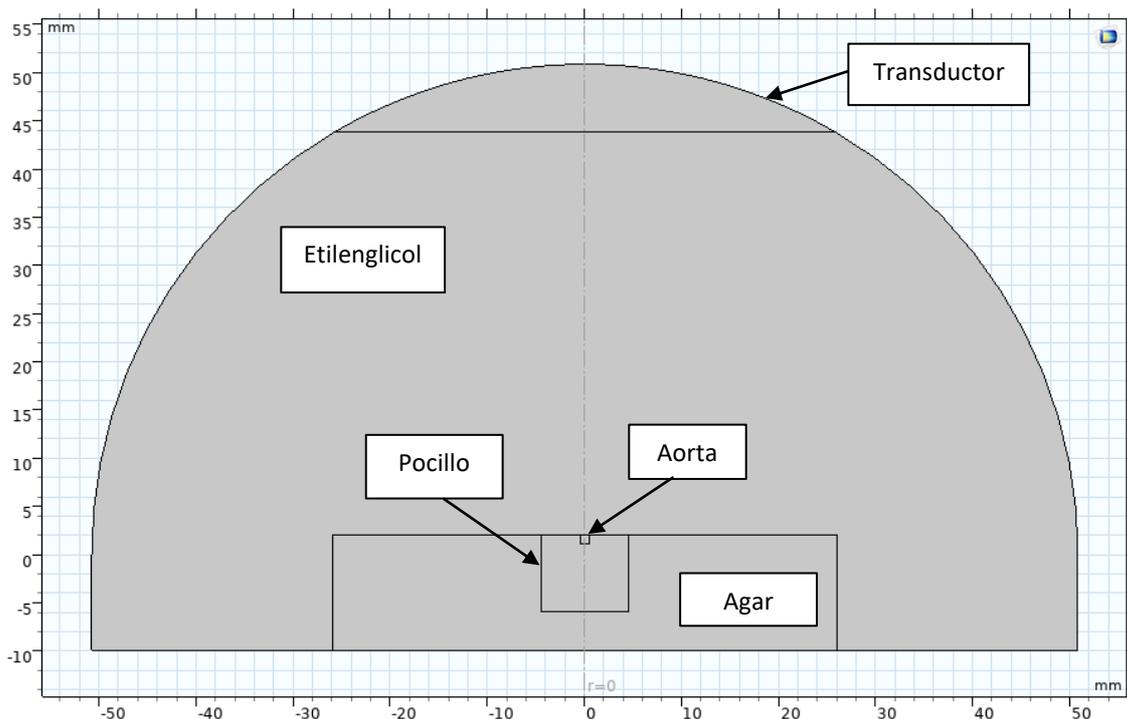
Comsol Multiphysics es un software de simulación de física sobre el cual se importan modelos 2D/3D (que pueden ser creados dentro del software) que definen la geometría sobre la que se va a aplicar el conjunto de ecuaciones y condiciones de contorno a resolver mediante elementos finitos.

A continuación, se realiza una explicación de los principales apartados que se necesitan en Comsol para la resolución del modelo.

2.6.1 Geometría del modelo

Para la geometría se creó un modelo en 2D con simetría axial, ya que esto acorta los tiempos de la simulación. Como se puede ver en la figura, se encuentra la aorta en el interior del pocillo en el centro de la placa de Petri. La cúpula superior es el transductor y todo lo que une la placa de Petri con el transductor es la cubeta de etilenglicol.

FIGURA 2.21 GEOMETRÍA COMPLETA DEL MODELO

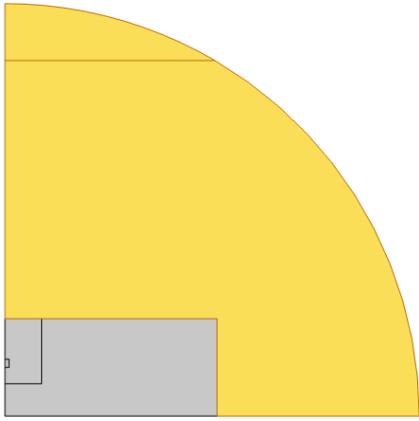


2.6.2 Materiales del modelo

Los parámetros físicos de cada dominio deben estar especificados para poder solucionar las ecuaciones. Comsol cuenta con una inmensa librería de materiales (con sus respectivas propiedades) que podemos seleccionar y asignar a cada dominio. En caso de que Comsol no tenga el material que se necesita, se puede crear un material con las propiedades deseadas. A continuación, se muestran los materiales que se han usado para los distintos dominios del presente modelo:

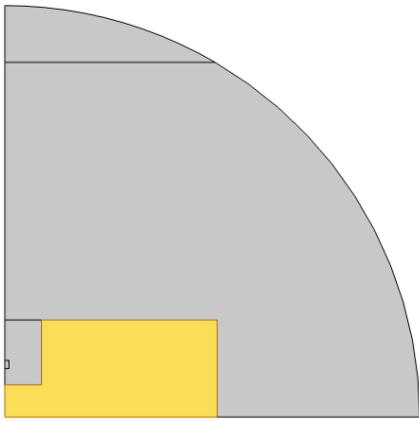
- **Etilenglicol:** Líquido de la cubeta en el que se realiza el disparo y, por tanto, en el que se transmiten las ondas de ultrasonidos.

TABLA 2.3 MATERIAL ETILENGLICOL

Dominio	Propiedades físicas	
	Capacidad calorífica a P constante (J/(kg·K))	1071,467 + 4,474T
	Densidad (kg/m ³)	1322,687 + 0,703T
	Conductividad térmica (W/(m·K))	-0,037 + 0,001T - 2,187 × 10 ⁻⁶ T ²
	Velocidad del sonido (m/s)	1.500
	Coeficiente de atenuación (Np/m)	0,5

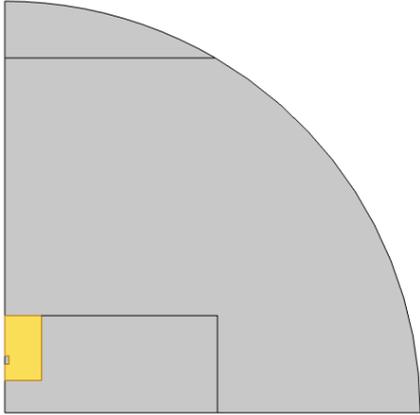
- **Agar:** Material del que está relleno la placa de Petri. Se ha creado el material en Comsol con las propiedades que se muestran en la siguiente tabla.

TABLA 2.4 MATERIAL AGAR

Dominio	Propiedades físicas	
	Capacidad calorífica a P constante (J/(kg·K))	2
	Densidad (kg/m ³)	1.033
	Conductividad térmica (W/(m·K))	0,55
	Velocidad del sonido (m/s)	1.550
	Coeficiente de atenuación (Np/m)	1,6

- **Hielo:** Por simplicidad se ha elegido el hielo como material del pocillo en vez de la solución isotónica de Krebs al 15% de DMSO, considerando que tienen unas propiedades similares.

TABLA 2.5 MATERIAL HIELO

Dominio	Propiedades físicas	
	Capacidad calorífica a P constante (J/(kg·K))	$-88,842 + 11,149T - 0,019T^2 + 2,682 \times 10^{-5}T^3$
	Densidad (kg/m ³)	$933,695 + 0,036T - 3,868 \times 10^{-4}T^2 + 8,837 \times 10^{-8}T^3$
	Conductividad térmica (W/(m·K))	$9,820 - 0,049T + 7,597 \times 10^{-5}T^2$
	Velocidad del sonido (m/s)	5.130
	Coeficiente de atenuación (Np/m)	4,6

- **Material biológico (músculo):** Para el material de la aorta se han cogido las siguientes propiedades que son realmente propiedades de músculo al no tener unos datos específicos del tejido de aorta.

TABLA 2.6 MATERIAL BIOLÓGICO

Dominio	Propiedades físicas	
	Capacidad calorífica a P constante (J/(kg·K))	3.421
	Densidad (kg/m ³)	1.090
	Conductividad térmica (W/(m·K))	0,49
	Velocidad del sonido (m/s)	1.585
	Coeficiente de atenuación (Np/m)	10,3

2.6.3 Módulo de Presión acústica

- **Presión acústica:** Hay que asignar una condición de presión acústica a cada grupo de dominios con el mismo material. Se indica el material y el coeficiente de atenuación de este (indicado en el apartado anterior).

$$\nabla \cdot \left(-\frac{1}{\rho_c} (\nabla p_t - \mathbf{q}_d) \right) - \frac{k_{eq}^2 p_t}{\rho_c} = Q_m$$

$$p_t = p_2 + p_b$$

$$k_{eq}^2 = \left(\frac{\omega}{c_c} \right)^2 - k_m^2$$

$$c_c = \frac{\omega}{k}, \quad k = \frac{\omega}{c} - i\alpha, \quad \rho_c = \frac{\rho c^2}{c_c^2}$$

Dónde:

Q_m : Fuente acústica monopolar

q_d : Fuente acústica dipolar

ρ_c : Densidad del medio

p_t : Presión total ejercida por ondas acústicas

p : Presión (variable dependiente)

p_b : Campo de presión de fondo

c : Velocidad del sonido en el medio

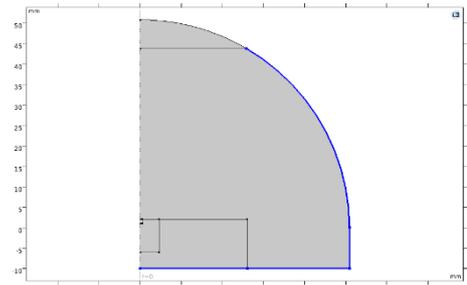
ω : Frecuencia angular

α : Coeficiente de atenuación

- **Simetría axial:** Se aplica a la línea de simetría.
- **Valores iniciales:** Se debe definir la presión inicial de los dominios, en este modelo la presión en todos los dominios $p=0$ Pa.
- **Contorno rígido al sonido:** Esta condición es para indicar las paredes de nuestro modelo y se le aplica la ecuación siguiente.

$$-\mathbf{n} \cdot \left(-\frac{1}{\rho_c} (\nabla p_t - \mathbf{q}_d) \right) = 0$$

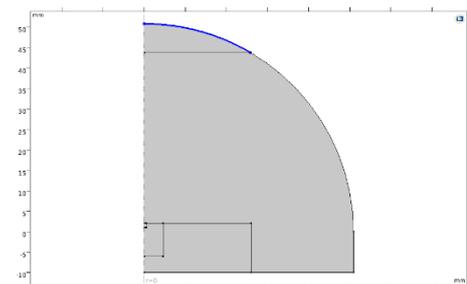
Donde \mathbf{n} es el vector normal a la superficie



- **Desplazamiento normal:** Se le asigna a la superficie del transductor.

$$-\mathbf{n} \cdot \left(-\frac{1}{\rho_c} (\nabla p_t - \mathbf{q}_d) \right) = (i\omega)^2 d_n$$

Donde d_n es el desplazamiento normal



Con esta condición se introduce la potencia del transductor de forma indirecta, ya que la potencia está relacionada con el desplazamiento normal. Se indican a continuación las ecuaciones [18] que relacionan P con d_n .

$$I = \frac{P}{A}$$

$$I = \frac{1}{2} \rho c u_0^2$$

$$u_0 = 2\pi f d_n$$

Siendo,

I : Intensidad acústica sobre la superficie del transductor

P : Potencia del transductor

A: Superficie del transductor
 ρ : Densidad del medio
 u_0 : Velocidad instantánea de la partícula
 f : Frecuencia

2.6.4 Módulo de *Transferencia de Biocalor*

- **Tejido biológico:** Condición para caracterizar el dominio de la aorta.

$$\rho C_p \mathbf{u} \cdot \nabla T_3 + \nabla \cdot \mathbf{q} = Q + Q_{bio}$$

$$\mathbf{q} = -k \nabla T_3$$

Dónde:

u : Vector de velocidad del fluido

cp : capacidad calorífica a presión constante

K : Conductividad térmica

Q : Fuente de calor

q : Flujo de calor conductivo

Q_{bio} : Amortiguación termoelástica

- **Valor inicial 1:** Se indica la temperatura inicial de los dominios relacionados con la placa de Petri, pocillo y aorta. $T=193,15$ K.
- **Valor inicial 2:** Se indica la temperatura inicial de los dominios relacionados con el cubeto de etilenglicol. $T=253,17$.
- **Simetría axial:** Se aplica a la línea de simetría.
- **Aislamiento térmico:** Se define en el contorno del modelo geométrico y se rige por la siguiente ecuación.

$$-\mathbf{n} \cdot \mathbf{q} = 0$$

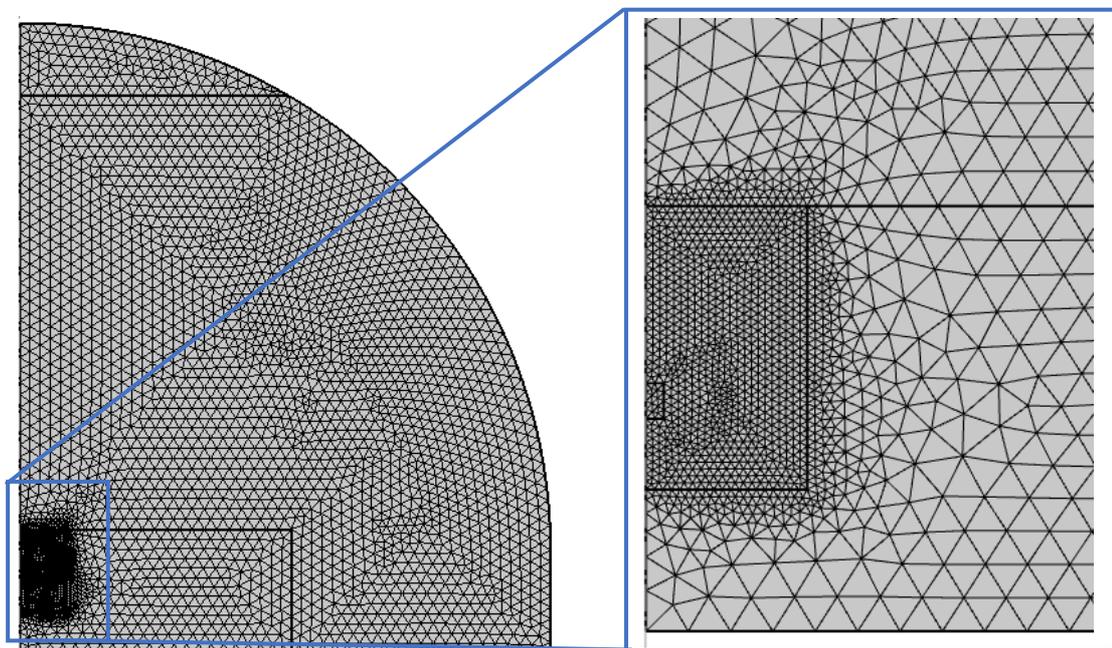
- **Fuente de calor:** Como fuente de calor se utiliza la densidad de potencia del módulo de presión acústica ($acpr.Q_{pw}$). Esta se multiplica por un escalón unitario que comienza en $t = 0$ segundos.

2.6.5 Mallado

Comsol resuelve las ecuaciones diferenciales del modelo por elementos finitos, siendo el mallado la división del dominio donde, para cada nodo, se resuelve el modelo. Por tanto, es imprescindible tener un mallado lo suficientemente fino en la zona de interés (la aorta y sus alrededores) como para tener unos resultados precisos.

La zona del pocillo, al ser nuestra zona de interés y de pequeñas dimensiones, necesita un mallado mucho más fino que el resto del dominio como se puede ver en la siguiente imagen. Del mismo modo, para la resolución de la presión en el dominio, se ha elegido un mallado más fino que para la resolución de transferencia de calor. Esto pretende captar con mayor bondad los patrones de interferencia en el dominio producidos por las ondas de presión.

FIGURA 2.22 MALLADO



3 RESULTADOS

Como se ha comentado anteriormente, se han realizado 24 experimentos haciendo el recalentamiento con HIFU. Dentro de estos experimentos, se han usado varios tiempos de disparo, concretamente 3 disparos a 50 segundos, 9 disparos a 60 segundos, 8 disparos a 70 segundos y 4 disparos a 80 segundos. De esta forma se ha podido caracterizar que tiempo es más idóneo según la viabilidad celular que se haya obtenido para cada caso.

Además, se han realizado un total de 6 experimentos usando el método de recalentamiento de baño a 37°C para tener un método con el que comparar los resultados.

TABLA 3.1 CLASIFICACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS

Método de recalentamiento	Velocidad de recalentamiento (°C/min)	Tiempo de recalentamiento (s)	Número de placas
HIFU	203	50	3
		60	9
		70	8
		80	4
Baño 37°C	109	300	6
Comsol HIFU	185	60	-

(1) Todos los experimentos han sido recalentados con una tensión cercana 30 V

A continuación, se muestran los resultados en forma de 4 tablas de los 24 experimentos realizado. Cada tabla recoge los datos de una etapa distinta del proceso y se muestran en orden cronológico. Lo mismo se hace posteriormente con las tablas de recalentamiento en baño (total 4 tablas).

La primera tabla recoge los datos de la muestra y el sacrificio, la segunda tabla da información sobre el cooling, luego en la tercera tabla se muestran los datos del warming y por último en la cuarta tabla todo lo relacionado con la viabilidad celular.

Posteriormente se recogen los resultados de las simulaciones de Comsol. Se presentan la presión en superficie, temperaturas en superficie, y evolución térmica en la aorta y pocillo.

3.1 Recalentamiento con HIFU

TABLA 3.2 DATOS MUESTRA Y SACRIFICIO HIFU

DATOS MUESTRA Y SACRIFICIO							
nº experimento	nº placa	Sacrificio	Venox (ml)	Edad (mes)	Sexo	Cepa	Peso (g)
1	1.1	DC	0.5	10	H	CD1	NO
2	1.8	DC	0.5	10	H	CD1	NO
3	1.11	DC	0.5	10	H	CD1	NO
4	2.2	DC	0.5	10	H	CD1	NO
5	2.5	DC	0.5	10	H	CD1	NO
6	2.4	DC	0.5	10	H	CD1	NO
7	2.3	DC	0.5	10	H	CD1	NO
8	2.1	DC	0.5	10	H	CD1	NO
9	1.3	DC	0.5	10	H	CD1	NO
10	1.4	DC	0.5	10	H	CD1	NO
11	1.6	DC	0.5	10	H	CD1	NO
12	3.7	DC	0.5	10	H	CD1	NO
13	2.6	DC	0.5	10	H	CD1	NO
14	3.2	DC	0.5	10	H	CD1	NO
15	1.13	DC	0.5	10	H	CD1	NO
16	4.4	DC	0.5	11	M	C57J	NO
17	4.7	DC	0.5	11	M	C57J	NO
18	4.8	DC	0.5	11	M	C57J	NO
19	5.6	DC	0.5	6,5	M	FVB	NO
20	5.5	DC	0.5	6,5	M	FVB	NO
21	5.7	DC	0.5	6,5	M	FVB	NO
22	6.2	DC	0.5	3	F	C57J	NO
23	6.3	DC	0.5	3	F	C57J	NO
24	6.8	DC	0.5	3	F	C57J	NO

TABLA 3.3 DATOS SLOW FREEZING HIFU

COOLING					
nº experimento	nº placa	Fecha cooling	Método cooling	Temp Final (degC)	CPS
1	1.1	04-nov	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
2	1.8	04-nov	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
3	1.11	04-nov	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
4	2.2	24-nov	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
5	2.5	24-nov	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
6	2.4	24-nov	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
7	2.3	24-nov	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
8	2.1	24-nov	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
9	1.3	04-nov	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
10	1.4	04-nov	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
11	1.6	04-nov	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
12	3.7	28-nov	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
13	2.6	24-nov	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
14	3.2	28-nov	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
15	1.13	04-nov	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
16	4.4	07-dec	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
17	4.7	07-dec	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
18	4.8	07-dec	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
19	5.6	13-dec	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
20	5.5	13-dec	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
21	5.7	13-dec	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
22	6.2	28-dec	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
23	6.3	28-dec	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
24	6.8	28-dec	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB

TABLA 3.4 DATOS RECALENTAMIENTO HIFU

WARMING								
nº experimento	nº placa	Fecha rewarming	Método rewarming ⁽¹⁾	Tensión (V)	Corriente (A)	Pot. Aprox (W)	Tiempo (s)	Dosis (kJ)
1	1.1	23-nov	HIFU	30	1,77	53,1	70	2,9736
2	1.8	24-nov	HIFU	30	2,13	63,9	60	3,0672
3	1.11	24-nov	HIFU	30	1,9	57	60	2,736
4	2.2	25-nov	HIFU	30	1,69	50,7	60	2,4336
5	2.5	25-nov	HIFU	30	1,75	52,5	60	2,52
6	2.4	28-nov	HIFU	30	1,64	49,2	60	2,3616
7	2.3	28-nov	HIFU	30	1,9	57	60	2,736
8	2.1	28-nov	HIFU	30	1,74	52,2	70	2,9232
9	1.3	29-nov	HIFU	30	1,85	55,5	60	2,664
10	1.4	29-nov	HIFU	30	1,93	57,9	60	2,7792
11	1.6	30-nov	HIFU	30	1,95	58,5	70	3,276
12	3.7	30-nov	HIFU	28,9	2	57,8	70	3,2368
13	2.6	06-dec	HIFU	30	1,65	49,5	70	2,772
14	3.2	06-dec	HIFU	30	1,75	52,5	70	2,94
15	1.13	07-dec	HIFU	30	1,68	50,4	70	2,8224
16	4.4	12-dec	HIFU	30	1,8	54	70	3,024
17	4.7	12-dec	HIFU	30	1,7	51	60	2,448
18	4.8	12-dec	HIFU	30	1,68	50,4	80	3,2256
19	5.6	19-dec	HIFU	30	1,56	46,8	80	2,9952
20	5.5	19-dec	HIFU	30	1,69	50,7	50	2,028
21	5.7	19-dec	HIFU	30	1,66	49,8	50	1,992
22	6.2	29-dec	HIFU	30	1,62	48,6	50	1,944
23	6.3	29-dec	HIFU	30	1,9	57	80	3,648
24	6.8	29-dec	HIFU	30	1,78	53,4	80	3,4176

(1) La velocidad de recalentamiento del HIFU para nuestros experimentos es de 203 degC/min).

TABLA 3.5 DATOS VIABILIDAD CELULAR HIFU

VIABILIDAD						
nº experimento	nº placa	Solución Lavado	Digestión	Test de viabilidad	Recuento celular	Supervivencia (%)
1	1.1	Krebs	Mecánica + Tripsina	Trypan Blue	1420	70,83
2	1.8	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	1750	87,50
3	1.11	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	1270	63,33
4	2.2	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	1800	90,00
5	2.5	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	1085	54,17
6	2.4	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	1420	70,83
7	2.3	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	1420	70,83
8	2.1	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	1420	70,83
9	1.3	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	1915	95,67
10	1.4	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	800	40,00
11	1.6	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	480	24,00
12	3.7	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	1200	60,00
13	2.6	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	930	46,50
14	3.2	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	1680	84,00
15	1.13	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	1535	76,75
16	4.4	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	280	14,00
17	4.7	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	2000	100,00
18	4.8	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	500	25,00
19	5.6	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	1475	73,75
20	5.5	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	850	42,50
21	5.7	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	50	2,50
22	6.2	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	50	2,50
23	6.3	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	260	13,00
24	6.8	Krebs	Mecánica + Tripsina	TB	150	7,50

3.2 Recalentamiento baño a 37°C

TABLA 3.6 DATOS MUESTRA Y SACRIFICIO BAÑO 37°C

Datos Muestra y Sacrificio							
nºexperimento	nº placa	Sacrificio	Venox (ml)	Edad (mes)	Sexo	Cepa	Peso (g)
1	6.12	DC	0.6	9	M	CD1	NO
2	13.8	DC	0.6	9	M	CD1	NO
3	14.1	DC	0.6	9	M	CD1	NO
4	13.7	DC	0.6	9	M	CD1	NO
5	6.4	DC	0.6	9	M	CD1	NO
6	6.8	DC	0.6	9	M	CD1	NO

TABLA 3.7 DATOS SLOW FREEZING BAÑO 37°C

Cooling					
nºexperimento	nº placa	Fecha Cong.	Método	Temp Final (degC)	CPS
1	6.12	06-jun	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
2	13.8	29-jun	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
3	14.1	07-jul	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
4	13.7	29-jun	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
5	6.4	06-jun	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB
6	6.8	06-jun	SF placa -0.6 degC/min	-80	DMSO 15% KHB

TABLA 3.8 DATOS RECALENTAMIENTO BAÑO 37°C

Warming				
nº experimento	nº placa	Fecha Warm.	Método	Tiempo (s)
1	6.12	15-jun	Baño Agua 37 degC	300
2	13.8	05-jul	Baño Agua 37 degC	300
3	14.1	17-jul	Baño Agua 37 degC	300
4	13.7	19-jul	Baño Agua 37 degC	300
5	6.4	20-jul	Baño Agua 37 degC	300
6	6.8	20-jul	Baño Agua 37 degC	300

TABLA 3.9 DATOS VIABILIDAD CELULAR BAÑO 37°C

Viabilidad							
nº experimento	nº placa	Solución Lavado	Digestión	Test de viabilidad	Recuento celular	Normalización	Supervivencia
1	6.12	KHB	Mecánica + Tripsina	Trypan Blue	1040	2000	0,52
2	13.8	KHB	Mecánica + Tripsina	TB	1220	2000	0,61
3	14.1	KHB	Mecánica + Tripsina	TB	1010	2000	0,505
4	13.7	KHB	Mecánica + Tripsina	TB	1120	2000	0,56
5	6.4	KHB	Mecánica + Tripsina	TB	1100	2000	0,55
6	6.8	KHB	Mecánica + Tripsina	TB	1130	2000	0,565

3.3 Simulaciones COMSOL

FIGURA 3.1 PRESIÓN ACÚSTICA (Pa)

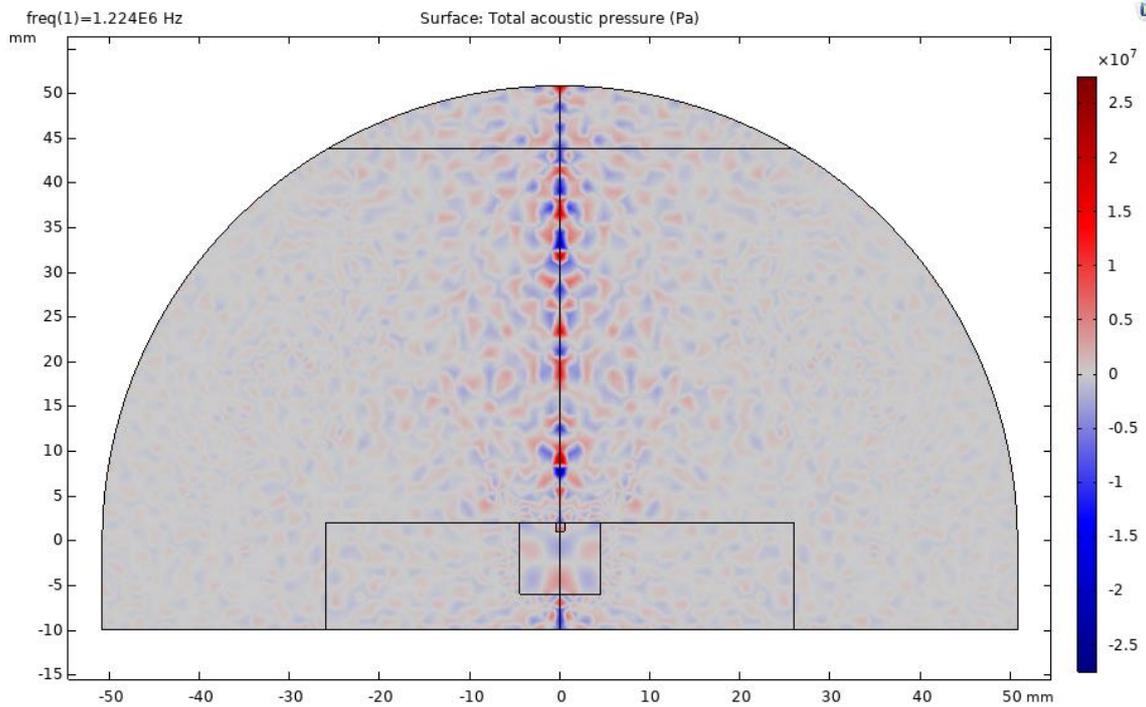


FIGURA 3.2 NIVEL DE PRESIÓN SONORA (dB)

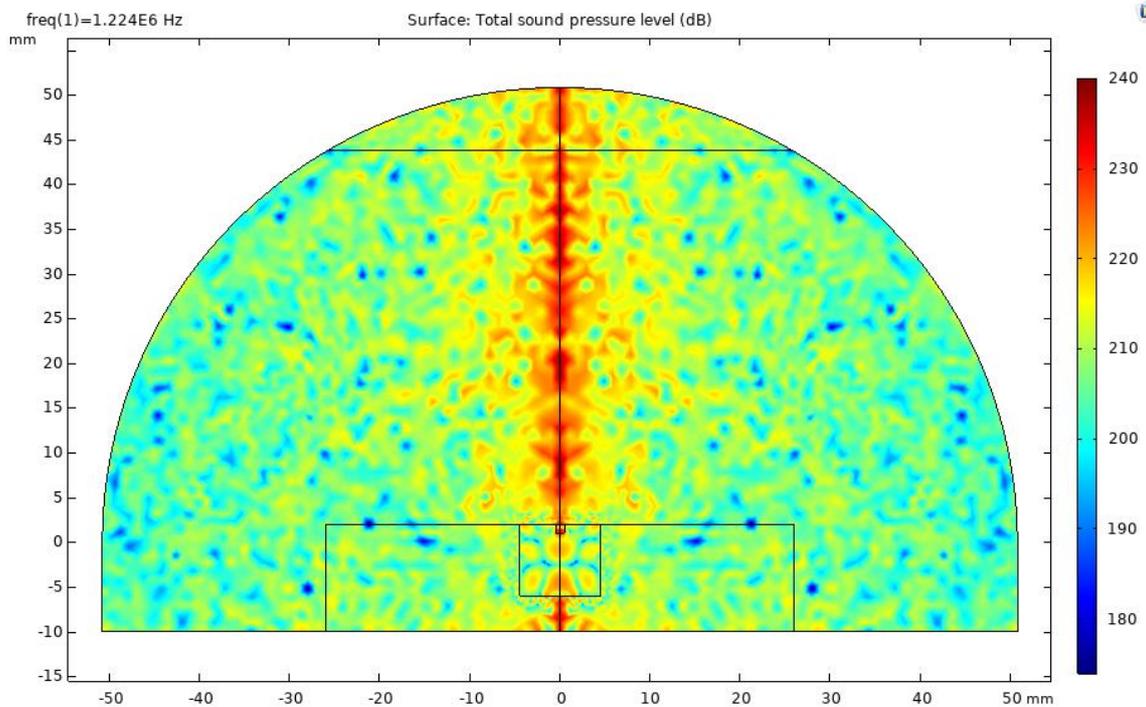


FIGURA 3.3 TEMPERATURA A TIEMPOS $t=0$ Y $t=60$ SEGUNDOS

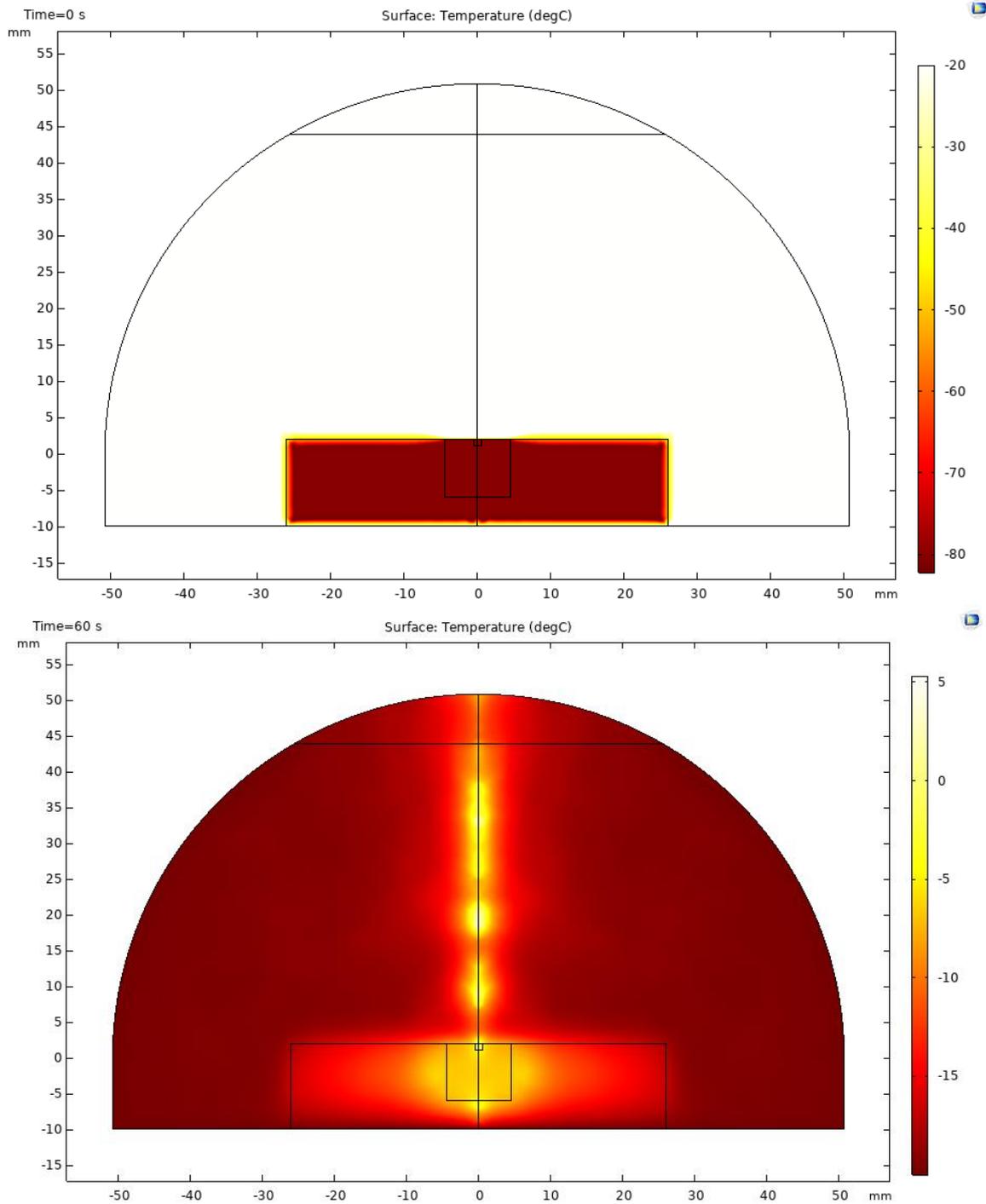


FIGURA 3.4 EVOLUCIÓN DE LA TEMPERATURA EN LA SECCIÓN DE LA AORTA

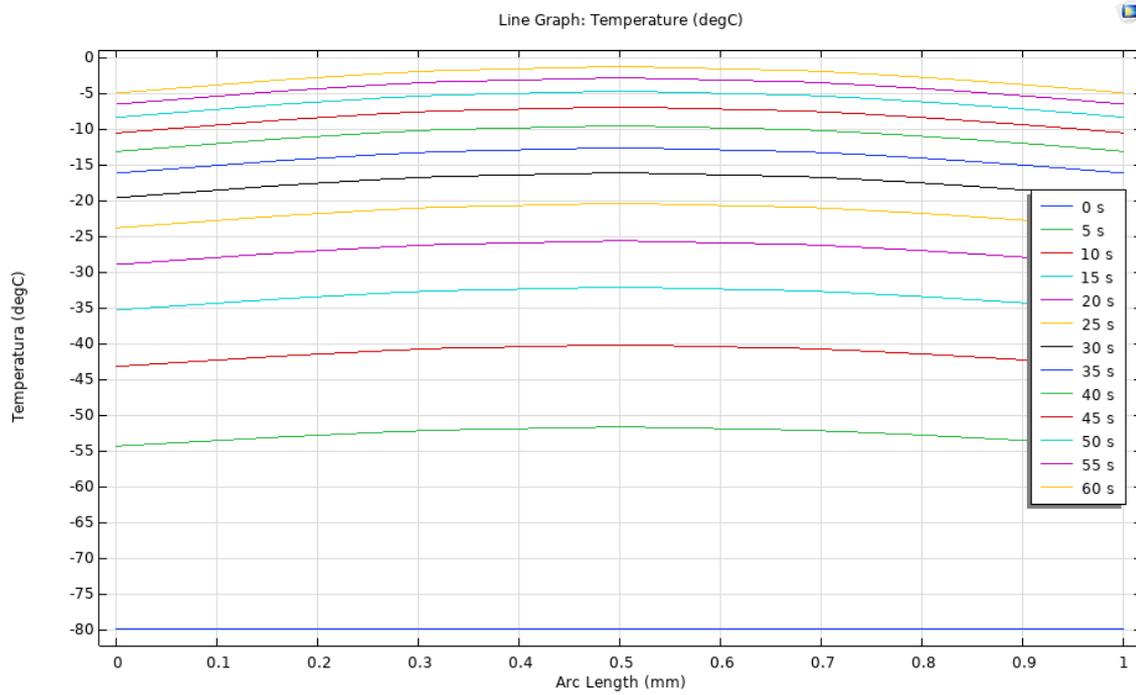


FIGURA 3.5 EVOLUCIÓN DE LA TEMPERATURA EN LA SECCIÓN DEL POCILLO

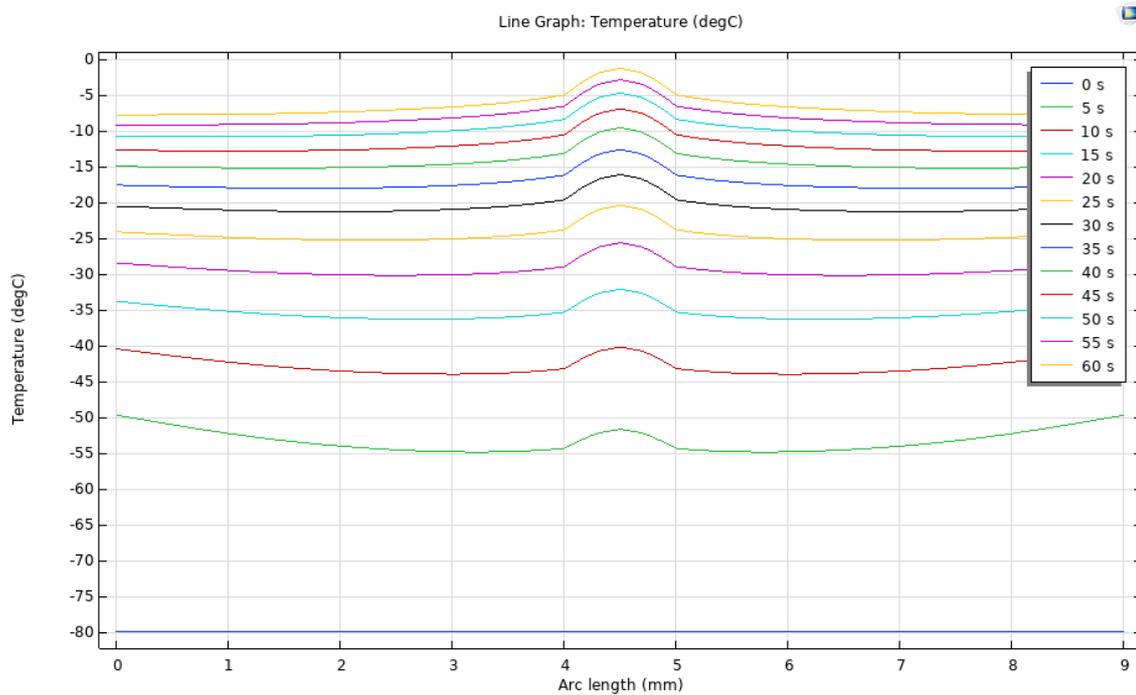
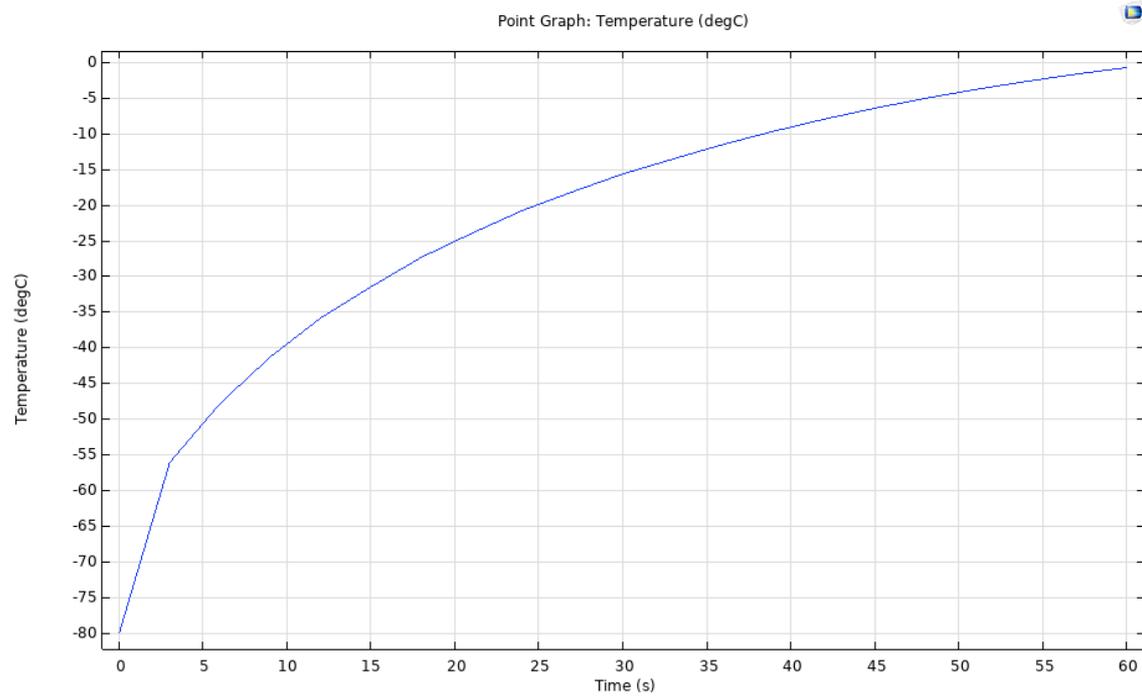


FIGURA 3.6 CURVA DE TEMPERATURA EN EL PUNTO CENTRAL DE LA AORTA



4 DISCUSIÓN

En la tabla 3.1 se recogen todos los experimentos realizados. Es importante destacar que se dispone de más resultados para tiempo de exposición a HIFU de 60 y 70 segundos. En cierto modo, mientras se caracterizaba el transductor (ver figura 2.8) se tenía cierta noción de los tiempos de exposición que resultarían más interesantes. Por un lado, todos aquellos tiempos inferiores al minuto corrían el riesgo de mantener las muestras aún a temperaturas en las que el hielo aún tuviera tiempo de crecer. Con arreglo a esto se han tomado el valor de 50 segundos como único tiempo de interés del conjunto. Por otro lado, tiempos superiores al minuto garantizan que la muestra haya escapado de la recristalización. Existen varios tiempos superiores al minuto para los cuales las células no sufren daño por hipertermia mientras son expuestas a ultrasonidos, pero a pesar de ello, la isquemia caliente es siempre un aspecto a considerar. Por ello, y a fin de que esta técnica de HIFU de lugar a un protocolo de excesiva extensión se ha decidido no sobrepasar la marca de los 80 segundos de exposición a ultrasonidos, que se haya considerablemente por debajo de lo que dura un recalentamiento por el medio estándar (baño caliente), que alcanza los 300 segundos.

Las tablas 3.2 y 3.6 contienen información de interés a la hora de identificar los experimentos, clasificarlos y recoger información sobre los ratones empleados en los experimentos.

Las tablas 3.3 y 3.7 recogen toda la información acerca del protocolo de enfriamiento como se puede observar todos los experimentos alcanzaron los -80°C , temperatura a la que fueron almacenados, tras un enfriamiento lento a $-0,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$. El agente crioprotector empleado era DMSO en todos los casos. Es importante destacar que al emplearse un método de enfriamiento pasivo sirviéndose de un almacenamiento aislante para conseguir las velocidades de enfriamiento deseadas la velocidad obtenida es un promedio de las diferentes tasas de enfriamiento que se dan desde los 20°C hasta los -80°C , siendo ligeramente superiores por encima de los 40°C e inferiores hasta el valor final de los -80°C .

En la tabla 3.4 se muestran los datos de recalentamiento en HIFU. Varios valores de interés han sido recogidos con el fin de proporcionar una visión más completa de esta parte fundamental de la experimentación. En primer lugar, destacamos que la fuente es bastante estable en cuanto a tensión empleada siendo siempre 30V salvo un caso excepcional. Este caso se produjo debido a una mayor demanda de corriente por parte del sistema, que se tradujo en una reducción de la tensión al activarse limitación de corriente (2A). Los motivos de esta sobrecorriente se observaron in situ siendo debido a una mala colocación del transductor que dejaba parte del mismo en la superficie del etilenglicol, afectando a la impedancia acústica. Siguiendo con la corriente se observa cierta volatilidad, si bien son valores que oscilan a los 1,8A que corresponden al punto de operación (30V). Esto significa que la potencia entregada por la fuente de alimentación presenta un valor de $54\text{W}\pm 6\text{W}$. Dado que la eficiencia del generador de ondas es 0,8. Podemos concluir que se entregan 43W al medio. De igual modo, la horquilla de tiempos de exposición desde 50 hasta 80 segundos implican una dosis energética de 2,6 kJ. Con valores máximos de 3,2 y mínimos de 2 kJ según el tiempo de exposición.

Finalmente, en la tabla 3.5 se presentan los resultados del análisis de viabilidad del recalentamiento con HIFU. Se pueden observar tanto los valores de viabilidad por células contadas

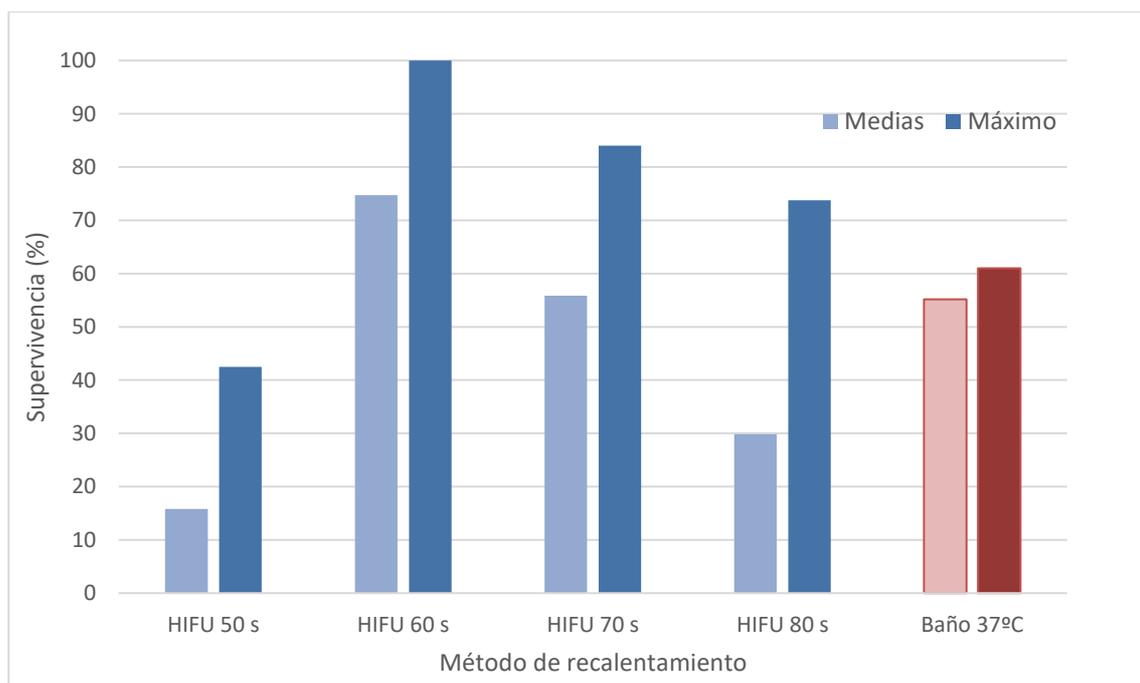
como la supervivencia en porcentaje, teniéndose como referencia las 2.000 células que se esperan obtener en de una sección de aorta en fresco de 1mm x 1mm. Si cruzamos estos datos con los presentados en la tabla anterior se aprecia una fuerte vinculación entre la dosis de energía que recibe una aorta para su recalentamiento (es decir, el tiempo de exposición a HIFU) y la supervivencia. La supervivencia media para cada tiempo de exposición se muestra en la tabla 4.1 y en la figura 4.1.

En las tablas 3.8 y 3.9 se muestran los datos de recalentamiento y viabilidad para baño a 37°C. Se ha realizado el protocolo estándar de recalentamiento en 5 minutos para todos los casos y la viabilidad se encuentra en torno al 55%, teniendo un valor mínimo de 50% y un máximo de 61%. Esta variabilidad es completamente achacable a la reproducción del protocolo estándar llevado a cabo en nuestro laboratorio. De nuevo estos valores se observan en la tabla 4.1 y la figura 4.1.

TABLA 4.1 RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS

Método de recalentamiento	Velocidad de recalentamiento (°C/min)	Tiempo de recalentamiento (s)	Número de placas	Supervivencia (<i>Media ± SD</i>)	Supervivencia máxima
HIFU	203	50	3	15,8 ± 11,54	42,5
		60	9	74,7 ± 10,09	100
		70	8	55,9 ± 12,75	84
		80	4	29,81 ± 15,09	73,8
Baño 37°C	109	300	6	55,2 ± 3,7	61

FIGURA 4.1 COMPARACIÓN SUPERVIVENCIA HIFU Y BAÑO A 37°C



La supervivencia media es más alta para un tiempo de exposición de 60 segundos. En la

curva de calentamiento calculada anteriormente este tiempo coincide con el momento en el que se alcanzan los 0°C. Es aquí también donde se alcanza el valor máximo de supervivencia con un total de 2.000 células, por lo que se puede considerar la práctica recuperación de la aorta completa. La supervivencia es más baja en aquellos tiempos extremos: 50 y 80 segundos. De igual modo, el recalentamiento en baño y el recalentamiento con HIFU durante 70 segundos presentan valores medios de supervivencia similares, si bien con el HIFU la supervivencia máxima es mayor. Es importante destacar la diferencia considerable que existe entre las supervivencias mínima y máxima para tiempo de 50 y 80 segundos. Esta disparidad aún no ha podido ser explicada más que por la necesidad de mejorar el protocolo.

En aquellos experimentos donde el tiempo de exposición a ultrasonidos fuera inferior o igual a los 50 segundos la curva de temperatura del transductor nos indica que, en el foco, aún no se han alcanzado temperaturas que garanticen la disgregación de las moléculas de agua hacia un estado líquido; es decir, no se puede descartar la presencia de hielo. Por este motivo, y dados los efectos nocivos del hielo, que son los que en el presente trabajo se quiere superar podemos concluir que a estos tiempos de recalentamiento corresponden bajas supervivencias. Por otro lado, para tiempos de recalentamiento superiores al minuto la curva de temperatura del transductor revela un valor por encima de los 0°C. Las temperaturas superiores a los 5°C comienzan a presentar problemas por la toxicidad de los anticongelantes. Además, los daños por isquemia deben ser también considerados una vez que el metabolismo se vuelve a retomar siempre que el tejido no esté en un medio idóneo para su mantenimiento. En otras palabras, el propio entorno del pocillo y su temperatura comienzan a ser dañinos para las células cuando estamos demasiado tiempo exponiéndolo a ultrasonidos. El caso extremo de este ejemplo, aunque sin anticongelantes, se encuentra en la técnica de cirugía por hipertermia, que emplea también ultrasonidos. De estos enunciados se puede intuir que la supervivencia presenta un máximo en torno al valor de 60 segundos. La curvatura negativa de esta curva de supervivencia recuerda a la famosa "U invertida" tan presente en la supervivencia de muestras durante el enfriamiento para criopreservación.

Otra cuestión que es interesante resaltar es el hecho de que el recalentamiento por ultrasonidos tiene una velocidad de recalentamiento el doble de rápida que el calentamiento en baño. Esto es importante por dos factores: Primero, que, al disponer de velocidades de recalentamiento más rápidas, se puede superar la formación de hielo durante el recalentamiento. Este es un proceso cinético por naturaleza [11], como se ha mencionado anteriormente. Por tanto, las moléculas de agua se agregan con una cierta velocidad que depende de la temperatura a la que se encuentra el medio por el efecto de esta sobre la viscosidad. Esta velocidad de agregación es precisamente la velocidad de recristalización. Podemos concluir que los ultrasonidos son una herramienta eficaz para enfrentarse a este problema de la recristalización con éxito.

En segundo lugar, y pese a que el recalentamiento en baño es suficiente para proporcionar una viabilidad buena para nuestras muestras la dependencia de esta técnica de transporte de calor con convección hacia las paredes de la muestra, y con conducción desde las paredes hasta su interior implica que para muestras de considerable tamaño la velocidad de calentamiento en estas zonas interiores será considerablemente menor a la velocidad en la superficie, donde hay contacto con el medio caliente. La técnica HIFU no presenta esta desventaja, por lo que se puede concluir que ofrecerá velocidades de calentamiento consistentemente superiores a las propias del baño caliente, además de mejorar la homogeneidad y reducir el gradiente de temperatura en la sección de la muestra.

Las velocidades de recalentamiento se midieron en el tramo de -60°C a -40°C. Este tramo es el más crítico en lo que respecta al problema de la recristalización; es decir, es en este rango de temperatura donde el crecimiento de los núcleos de hielo es más rápido. Esto se puede comprobar con los ilustrativos experimentos de Peter Mazur [11]. En este intervalo se han obtenido las velocidades de calentamiento que se presentan en la tabla 3.1.

Bujan y compañía usan suero bovino para el mantenimiento de los tejidos antes y después de la criopreservación, lo cual tiene un impacto positivo en la viabilidad. Nuestro protocolo de slow

freezing pese a ir sobre el papel en consonancia con el protocolo de enfriamiento de los autores ya mencionados emplea soluciones portadoras (Krebs, que carece de muchas de las propiedades beneficiosas del suero). Por lo tanto, era esperable obtener una tasa de supervivencia inferior a la que presentan otros autores, como se ha podido observar con los resultados de recalentamiento en baño. No obstante, la supervivencia media de las células siguiendo nuestro protocolo para recalentamiento en baño se haya dentro del rango de la desviación típica ofrecida por Bellón y Bujan [3].

En nuestro laboratorio se realizan enfriamientos por vitrificación de equilibrio (*liquidus tracking*) y mediante slow freezing. El primero se ha conseguido dominar hasta temperaturas de -40°C , varios autores recomiendan que el almacenamiento de aortas criopreservadas se realice a temperaturas aún más bajas que en el momento del presente trabajo se hayan fuera del control de nuestro sistema de *liquidus tracking*. Debido a esto y porque la literatura citada opta por un enfriamiento con una velocidad de entre $-0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hemos decidido emplear un enfriamiento lento (*slow freezing*) mediante el enfriamiento pasivo empleando un contenedor aislante que permite alcanzar las velocidades de enfriamiento deseadas, en nuestro caso $-0,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en promedio.

La evaluación de viabilidad, al realizarse por conteo con inspección visual en microscopio, tiene una serie de limitaciones. De la precisión de los resultados depende la habilidad del técnico que realiza el conteo, lo distintivo de la tinción y la posibilidad de estandarizar los pasos del protocolo. Habiendo podido sobreponernos a estos aspectos de forma más o menos generalizada debemos confesar las dificultades encontradas inicialmente para determinar el fondo de escala de viabilidad. Con este término nos referimos al número de células claramente identificables que resultan del conteo de un anillo de aorta de $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ evaluada en fresco. Finalmente se ha concluido que el número de células que consistentemente se pueden contar a simple vista en estas condiciones es de 2000. Sin embargo, con las técnicas actuales de las que disponemos nos es imposible distinguir células de músculo liso y células endoteliales, al menos, cuando estas se hayan en suspensión.

Para continuar, las simulaciones de Comsol se han realizado intentando mantener la mayor fidelidad empleando una geometría y materiales similares a las que se emplean. Estas se han realizado a una frecuencia de $1,224\text{ Hz}$ y una potencia de 43 W , que daría un calentamiento rápido de hasta $200^{\circ}\text{C}/\text{min}$. En la práctica, el uso de etilenglicol como material para las simulaciones requirió de un ajuste de los parámetros, pues no se emplea en estado puro en los experimentos. De igual modo, los parámetros empleados se extrapolaron hasta sus valores esperables a las temperaturas de trabajo.

En la figura 3.1 y 3.2 se pueden ver los principales resultados relacionados con el campo de presión acústica de la simulación, vemos que la diferencia de presión en el campo es de 50 MPa , y que el nivel de presión sonora tiene un máximo de 240 dB y un mínimo de 175 dB .

Por otro lado, en la figura 3.3 se muestra el campo de temperatura en 2D para 0 y 60 segundos, donde se puede observar que a 0 segundos el etilenglicol se encuentra a una temperatura inicial de -20°C ; y la placa de Petri y su interior están a -80°C . Una vez han pasado 60 segundos (tiempo de exposición a HIFU), la zona de la aorta se encuentra a -3°C mientras que el etilenglicol se mantiene en gran parte a -20°C . Como se puede observar la temperatura máxima alcanza los 5°C , esto se debe a que debido a la geometría del pocillo las ondas se ven reflejadas por el cambio de densidad del medio causando puntos calientes.

En las figuras 3.4 y 3.5 se puede ver la evolución de la temperatura en la sección de la aorta y del pocillo respectivamente. En estas figuras se puede observar que el calentamiento produce gradientes de temperatura inferiores a 7°C en la zona del pocillo para el tiempo final de 60 segundos.

Por último, la figura 3.6 muestra la evolución de la temperatura durante el recalentamiento

en el punto central de la aorta. Esta curva permite validar los tiempos y temperaturas seleccionados para los experimentos, si bien en las simulaciones las temperaturas máximas alcanzadas eran ligeramente inferiores a las de los experimentos reales, debido a la corrección de la potencia empleada. La eficiencia del transductor se obtuvo a temperatura ambiente, lo que permite dudar sobre su invariabilidad a menores temperaturas. Una posible explicación para estas temperaturas sutilmente superiores en los experimentos reales frente a las simulaciones sería que la eficiencia del transductor a menor temperatura fuera superior al 80%, si bien no muy superior. Este enunciado es conocido dentro de las máquinas térmicas, donde la eficiencia guarda estrecha relación con los focos frío y caliente. Esta pequeña diferencia de temperatura también es achacable a errores perfectamente comprensibles en la extrapolación de los parámetros termoacústicos a muy bajas temperaturas.

El mallado utilizado para el módulo de *Presión acústica* ha sido más fino que el utilizado para *Transferencia de Biocalor* para que todas las iteraciones que solucionan las ecuaciones diferenciales de este último estuvieran basadas en los valores de un campo de presiones preciso.

Se puede concluir que el modelo se encuentra dentro del margen del 10% de error que consideramos asumible a efectos de este trabajo. Efectivamente la velocidad de recalentamiento obtenida mediante simulación es de 185°C/min mientras que la obtenida experimentalmente es solo un 10% superior (203°C/min).

5 CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

Los objetivos secundarios se han satisfecho con el siguiente nivel de logro: el primer objetivo, ha sido completado en su práctica totalidad al haber creado un modelo que permita realizar simulaciones cuya resolución dura menos de 30 segundos para ensayos preliminares, rápidos y descriptivos. El modelo se puede calificar como bueno, si bien habríamos agradecido parámetros más precisos en nuestro rango de temperatura. El segundo objetivo se ha cumplido totalmente al haber alcanzado tasas de supervivencia equiparables a aquellas obtenidas en laboratorios de todo el mundo por técnicas estándar, consiguiendo además velocidades de recalentamiento más rápidas que acortan el proceso y empleando un dispositivo HIFU mucho más prometedor que los baños salinos o de agua a 37°C. El tercer objetivo se ha conseguido parcialmente pues aún hay margen de mejora en la técnica ensayada por primera vez en este contexto. Aún se necesita un método para analizar la integridad estructural de los tejidos, independientemente de la supervivencia de sus células.

En relación con el primer objetivo, se ha propuesto el cálculo de 6 parámetros de interés para cada tipo de material empleado en el estudio en el rango de temperaturas usadas. Estos seis parámetros son: coeficiente de atenuación, velocidad del sonido, densidad, viscosidad, capacidad calorífica y conductividad térmica. Igualmente se determinará la eficiencia del transductor en estas temperaturas para completar el modelo.

En relación con el último objetivo, actualmente se está ensayando esta técnica con una nueva determinación de viabilidad basada tanto en el conteo celular como en la tinción de Hematoxilina & Eosina (tinción H&E) para observar la estructura. Además, se está perfilando el uso de un miógrafo para medir la contractibilidad de las aortas tras la criopreservación.

La elección del DMSO como agente crioprotector responde a dos razones, en primer lugar, este crioprotector es prácticamente universal y se emplea satisfactoriamente en la criopreservación de diversos tipos de células por su penetrabilidad. En segundo lugar, el átomo de azufre presente en las moléculas de DMSO ofrece un alto contraste en técnicas de imagen médica como la tomografía computarizada (CT). Esto permitiría una visualización en tiempo real de la penetración de la gente en tejidos observados en máquinas CT. La combinación de esta técnica de imagen con un sistema de *liquidus tracking* plenamente operativo es un potente sustituto de la técnica de slow freezing empleada en la actualidad. Este es uno de los puntos de mejora que se está acometiendo en este momento.

Finalmente, consideramos que estos resultados son un paso firme hacia el *organ banking*. Confiamos en que la técnica HIFU resulte beneficiosa para otros tipos de tejidos y su escalabilidad permita la criopreservación de órganos. Es evidente que los entornos de simulación como Comsol Multiphysics resuelven una gran cantidad de situaciones y facilitan cumplir estos objetivos de una forma más rápida y eficaz.

REFERENCIAS

1. Alcalá, E., Encabo, L., Barroso, F. *et al.* Sound waves for solving the problem of recrystallization in cryopreservation. *Scientific Reports* **13**, 7603 (2023)
2. Baudot, A., Boutron, P. Glass-Forming Tendency and Stability of Aqueous Solutions of Diethylformamide and Dimethylformamide. *Cryobiology* **37**(3), Pages 187-199 (1998)
3. Bellón JM, Gimeno MJ, García-Honduvilla N, Domínguez B, and Buján J. Arterial Damage Induced by Cryopreservation is Irreversible Following Organ Culture. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **17**, 136-143 (1999)
4. Boutron, P. Comparison with the theory of the kinetics and extent of ice crystallization and of the glass-forming tendency in aqueous cryoprotective solutions. *Cryobiology* **23**, 88–102 (1986)
5. Boutron, P., Mehl, P., Kaufmann, A., Angibaud, P. Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons: I. Binary systems water-polyalcohol. *Cryobiology* **23**(5), 453-469 (1986)
6. Elford, B. C. & Walter, C. A. Effects of electrolyte composition and pH on the structure and function of smooth muscle cooled to -79 degrees C in unfrozen media. *Cryobiology* **9**, 82–100 (1972)
7. Ensminger, D., Bond, L. J. Basic Design of Ultrasonic Transducers. En *Ultrasonics: Fundamentals, Technologies and Applications*. CRC Press (2012), 171-219
8. Fahy, G. M. Physical and biological aspects of renal vitrification. *Organogenesis* **5**, 167–175 (2009)
9. Farrant, J. Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention. *Nature* **205**, 1284–1287 (1965)
10. Han, Z., Rao, J.S., Gangwar, L., Bischof, J.C., *et al.* Vitrification and nanowarming enable long-term organ cryopreservation and life-sustaining kidney transplantation in a rat model. *Nature Communications* **14**, 3407 (2023)
11. Hey, J. M. & Macfarlane, D. R. Crystallization of ice in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulfoxide 2: Ice crystal growth kinetics. *Cryobiology* **37**, 119–130 (1998). [Macfarlane]
12. Hunt CJ, Song YC, Baetson EAJ, and Pegg E. Fractures in Cryopreserved Arteries. *Cryobiology* **31**, 506-515 (1994)
13. Lovelock JE, and Bishop MWH. Prevention of freezing damage to living cells and dimethyl sulphoxide. *Nature* **183**, 1349-1359 (1959)
14. Luyet, B. J. Life and death at low temperatures. *Biodynamica* (1940)
15. Mazur, P. Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications. *The American journal of physiology* **247**, 125-42 (1984)
16. Mazur, P. Principles of medical cryobiology: The freezing of living cells, tissues, and organs. In: Bittar E., & Bittar N. (eds). *Principles of Medical Biology*. Elsevier 4D, 355-384 (1996)
17. Müller-Schweinitzer E. Cryopreservation of vascular tissues. *Organogenesis* **5**(3), 97-104 (2009)
18. Olmo, A., Barroso, P., Barroso, F. & Risco, R. The use of high-intensity focused ultrasound for the rewarming of cryopreserved biological material. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **68**, 599–607 (2021)
19. Pascual, G., Rodríguez, M., Corrales, C., Turégano, F., García Honduvilla, N., Bellón J.M, and Buján, J. New approach to improving endothelial preservation in cryopreserved arterial substitutes. *Cryobiology* **48**, 62-71 (2004)
20. Pegg DE, Wusteman MC, and Boylan S. Fractures in Cryopreserved Elastic Arteries. *Cryobiology* **34**, 183-192 (1997)

21. Pegg DE. Principles of Cryopreservation, in Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Third Edition. (Wolkers, Willem F. & Oldenhof, Harriette, ed) Springer, London. 2015. pp. 3-21.
22. Pegg, D. E., Wang, L. & Vaughan, D. Cryopreservation of articular cartilage. Part 3: The liquidus-tracking method. *Cryobiology* **52**, 360–368 (2006)
23. Pegg, DE. Principles of Cryopreservation. En *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Methods Mol Biol, vol. 1257(Wolkers, W. & Oldenhof, H.) 3–21 (Springer, 2015)
24. Polge, C., Smith, A. & Parkes, A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* **164**, 666 (1949)
25. Puschmann E, Selden C, Butler S, Fuller B. Liquidus tracking: controlled rate vitrification for the cryopreservation of larger volumes and tissues. *Cryo Letters* **35**(4), 345-55 (2014)
26. Risco R, Barroso P, Chaichio MC, and Olmo A. Focused Ultrasound Guided-By-Mri-Thermography For Fast And Controlled Re-Warming Of Cryopreserved Organs. *Abstracts/Cryobiology* **85**, 120-190 (2018)
27. Rubinsky, B. Heat Transfer during Cryopreservation. In: The Biophysics of Organ Cryopreservation. Pegg, D. E., and Karow, A. M. Jr (eds). Plenum Press, New York (1987) pp. 89-116.
28. Shore D, Woods MO, and Miles CA. Attenuation of ultrasound in post rigor bovine skeletal muscle. *Ultrasonics* **24**, 81 (1986)
29. Shu Q, Li Q, Medeiros S, & Klug J. Development of Non-reactive F-Free Mold Fluxes for High Aluminum Steels: Non-isothermal Crystallization Kinetics for Devitrification. *Metallurgical and Materials Transactions B* **51**, 1169-1180 (2020)
30. Song G, Liu CJ, Qiao T, Sun XM, and Chen JH. Abdominal aorta transplantation after programmed cryopreservation. *World Journal Gastroenterol* **10**(4), 555- 559 (2004) [Song Gu]
31. Wells, P. *Biomedical Ultrasound* (Academic Press, 1977)