

Proyecto Fin de Carrera
Grado en Ingeniería Aeroespacial

Desarrollo y puesta a punto de sistema de control y monitorización de caudal, presión y temperatura de soluciones anticongelantes en conductos hidráulicos, y su aplicación a un caso práctico.

Autor: José Manuel Ortiz Serrano

Tutor: Ramón Risco Delgado

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

Sevilla, 2019



Proyecto Fin de Carrera
Ingeniería Aeroespacial

**Desarrollo y puesta a punto de sistema de control
y monitorización de caudal, presión y temperatura de
soluciones anticongelantes en conductos hidráulicos,
y su aplicación a un caso práctico**

Autor:

José Manuel Ortiz Serrano

Tutor:

Ramón Risco Delgado

Dpto. Física Aplicada III
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla
Sevilla, 2019

Proyecto Fin de Carrera: Desarrollo y puesta a punto de sistema de control y monitorización de caudal, presión y temperatura de soluciones anticongelantes en conductos hidráulicos, y su aplicación a un caso práctico

Autor: José Manuel Ortiz Serrano

Tutor: Ramón Risco Delgado

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

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

Sevilla, 2019

El Secretario del Tribunal

Agradecimientos

Mi mayor agradecimiento a mis compañeros de equipo: Enrique Alcalá, Beatriz Albiol y Víctor Villalar. No sólo por todo lo que hemos aprendido juntos, sino lo que hemos disfrutado realizándolo y resolviendo las dificultades que nos iban surgiendo.

Mi agradecimiento a todos los profesionales que nos han ayudado, dedicándonos su tiempo, en especial a Itziar Castro, responsable del animalario del Hospital Macarena.

Agradecimiento también a mi familia por su apoyo, en especial a mi hermana, Carmen Ortiz, por recomendarme este proyecto y tutor, ya que el suyo fue un proyecto anterior a este.

Por último me gustaría agradecer a Ramón Risco, por abrirnos a un mundo de conocimiento tan interesante como es la criopreservación, y por motivarnos y facilitarnos todo el material y ayuda que ha estado en su mano.

José Manuel Ortiz Serrano

Sevilla, 2019

Resumen

Mediante el presente proyecto se desarrolla y optimiza unos sistemas para criopreservar órganos y se realiza un estudio experimental con corazones de ratón común, *Mus Musculus*.

Estos sistemas son los siguientes:

- Langendorff, mediante el cual se estudia la viabilidad y supervivencia del órgano una vez aislado.
- BioCool, utilizado para disminuir la temperatura en función de unas curvas de enfriamiento.
- Sistema de perfusión, encargado de introducir progresivamente el anticongelante a través de unas bombas controladas por el software.

Las curvas de enfriamiento y concentración están basadas en el experimento de George M. Fahy para riñón de conejo,^[1] siendo modificadas para corazón y evaluándose los resultados.

Para alcanzar el objetivo del proyecto, se empleará el software desarrollado por Álvaro Aguilar (TFM tutorado por Ramón Risco),^[2] adecuándondolo a las necesidades específicas de este trabajo.

Tras el desarrollo de los sistemas se han extraído conclusiones a partir de la experimentación con 19 ratones de distintas cepas.

Abstract

Through the present project, systems for cryopreservation of organs are developed and optimized and an experimental study is carried out with common mouse hearts, *Mus Musculus*.

These systems are the following:

- Langendorff, through which the viability and survival of the organ is studied once the organ is insolated.
- BioCool, used to lower the temperature depending on cooling curves.
- Perfusion system, responsible for progressively introducing antifreeze through pumps controlled by software.

The cooling and concentration curves are based on the George M. Fahy experiment for rabbit kidney,^[1] being modified for heart and evaluating the results.

To achieve the objective of the project, the software developed by Álvaro Aguilar (TFM tutored by Ramón Risco) will be used.^[2], adapting it to the specific needs of this work

After the development of the systems, conclusions have been drawn from the experimentation with 19 mice of different strains.

Agradecimientos.....	viii
Resumen.....	x
Abstract.....	xii
Índice.....	xiv
Índice de Tablas.....	xvii
Índice de Figuras.....	xviii
1 Introducción.....	1
1.1. Criopreservación	1
1.1.1. Crioprotectores.....	2
1.1.2. Avances en criopreservación.....	2
1.2. Fisiología cardíaca	3
1.1.1. Músculo cardíaco.....	4
1.3. Características cardiovasculares de <i>Mus Musculus</i>	5
2 Objetivo.....	7
3 Descripción sistemas.....	9
3.1. Langendorff.....	9
3.1.1. Bomba de jeringa de precisión.....	10
3.1.2. Solución Tyrode.....	12
3.1.3. Carbógeno	13
3.1.4. Ajuste pH	14
3.1.5. Incidencias y mejoras	14
3.2. BioCool	15
3.2.1. Modificación tiempo congelación.....	16
3.2.2. Extractor.....	17
3.2.3. Agitador.....	17
3.3. Sistema de perfusión.....	19
3.3.1. Bombas peristálticas.....	20
3.3.2. Cebador tubos.....	21
3.3.3. Tarjeta de adquisición de datos.....	22
3.3.4. Software.....	23
3.3.5. Comprobación experimental de concentración.....	28
3.3.6. Incidencias y mejoras.....	32

4 Procedimiento experimental.....	33
4.1. <i>Cirujía y Langendorff</i>	33
4.2. <i>Criopreservación</i>	38
5 Resultados experimentales.....	43
5 Conclusiones y trabajo futuro.....	49
Anexo A: Instalación software y configuración tarjeta de adquisición.....	51
Anexo B.....	59
Anexo C: Cálculo dosis heparina.....	68
Anexo D: Material y equipos.....	70
Referencias.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características relevantes para experimentación de Mus Musculus.....	5
Tabla 2. Presiones a la entrada y salida de la aguja en función del caudal.....	11
Tabla 3. Caudal de bomba medido experimentalmente.....	20
Tabla 4. Concentración de DMSO para distintas soluciones.....	29
Tabla 5. Brix y molaridad de DMSO para cada instante.....	30
Tabla 6. Programa de curvas de enfriamientos para BioCool.....	41
Tabla 7. Datos experimentales.....	43
Tabla 8. Comparación fisiología cardíaca entre ratón y humano.....	65
Tabla 9. Listado de material y equipos utilizados.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del circuito circulatorio en mamíferos	4
Figura 2. Representación del músculo cardíaco	4
Figura 3. Concentración, presión y temperatura para experimento con riñón de conejo	8
Figura 4. Configuración sistema Langendorff.....	9
Figura 5. Bomba de jeringa de precisión HARVARD PHP 4400.....	10
Figura 6. Gráfica presiones a la entrada y salida de la aguja en función del caudal.....	12
Figura 7. Gráfica ampliada de presiones a la entrada y salida en función del caudal.....	12
Figura 8. Tyrode concentrado en sobre.....	13
Figura 9. Carbógeno. Válvula completamente cerrada.....	13
Figura 10. Medición de pH a solución Tyrode oxigenada.....	14
Figura 11. Configuración inicial BioCool. El extractor lateral fue removido.....	16
Figura 12. Gráfica temperatura frente al tiempo para perfusión de riñón de conejo.....	16
Figura 13. Curvas de enfriamiento para BioCool.....	17
Figura 14. Configuración de extractor.....	17
Figura 15. Agitador.....	18
Figura 16. Software y Hardware PicoLog.....	18
Figura 17. Configuración sistema de perfusión	19
Figura 18. Unión de conductos DMSO y PBS en forma de “T”	19
Figura 19. Esquema de funcionamiento bombas peristálticas	20
Figura 20. Gráfica Caudal de la bomba en función del voltaje de entrada	21
Figura 21. Purgamiento de tubos por voltímetro	21
Figura 22. Tarjeta de adquisición de datos conectada a PC por USB	22
Figura 23. Configuración pines para tarjeta de adquisición de datos	23
Figura 24. Interfaz de usuario “principal.vi”	23
Figura 25. Parámetros introducidos antes de ejecutar programa	24
Figura 26. Representación de molaridad DMSO y PBS en función del tiempo de ejecución del programa.....	25
Figura 27. Gráfica Molaridad anticongelante frente al tiempo para perfusión de riñón de conejo.....	25
Figura 28. Gráfica concentración DMSO frente al tiempo para perfusión corazón de ratón.....	26
Figura 29. Soluciones de DMSO y PBS con distintas concentraciones.....	29
Figura 30. Gráfica Concentración DMSO (mol) en función del Brix (%).....	30
Figura 31. Gráfica Concentración teórica y experimental (mol) frente al tiempo de experimento.....	31
Figura 32. Tubos de plásticos dañados por DMSO. Sustitución por tubos de polietileno.....	32
Figura 33. Materiales necesarios para cirugía.....	34
Figura 34. Eliminación de tejido adiposo con pinzas examinando con microscopio.....	35
Figura 35. Corazón a vista de microscopio para identificación de arteria aorta.....	36
Figura 36. Corazón conectado a sistema Langendorff y ampliado mientras es perfundido.....	37
Figura 37. Configuración sistema de perfusión y sistema BioCool para trabajar simultáneamente.....	38
Figura 38. Gráficas temperatura (arriba) y concentración (abajo) frente al tiempo de programa	39
Figura 39. Corazón dentro de criotubo. Cable de PicoLog también dentro del recipiente.....	40
Figura 40. El criotubo con el corazón debe estar completamente sumergido.....	41
Figura 41. Corazón dentro de criotubo tras completar protocolo de congelación.....	42

Figura 42. Corazón suspendido mientras se perfunde.....	44
Figura 43. Perfusión de corazón sumergido en solución Tyrodes.....	45
Figura 44. Gráfica de muestras de temperaturas tomadas por Picolog experimento 15.....	46
Figura 45. Corazón congelado tras protocolo de criopreservación experimento 13.....	47
Figura 46. Gráfica de muestras de temperaturas tomadas por Picolog experimento 16.....	47
Figura 47. De derecha a izquierda el resultado de la criopreservación de los Experimentos 13,15,16,17.....	48

1 INTRODUCCIÓN

El avance de la medicina y la fusión con técnicas de ingeniería han posibilitado el progreso en el ámbito de trasplantes de órganos. Sin embargo, es necesario seguir investigando en procesos de criopreservación para aumentar el tiempo de conservación, actualmente muy limitado.

El objetivo principal del proyecto desarrollado en el presente documento es realizar un estudio sobre la criopreservación, para ahondar en la investigación de congelación de órganos, a fin futuro de mejorar los trasplantes y mantener la muestra biológica por largo tiempo, preservando al mismo tiempo su viabilidad.

El trabajo abarca desde una primera fase de desarrollo y caracterización de los distintos sistemas utilizados para criopreservar hasta la experimentación con corazón de ratón *Mus Musculus* en distintas cepas, para lo cual se llevará a cabo un protocolo de criopreservación sobre corazones aislados.

Este documento comenzará con unas nociones básicas sobre la criopreservación, continuará con la explicación detallada del objetivo del proyecto, seguida de una descripción del funcionamiento y caracterización de de todos los sistemas empleados. Por último se presentaran y evaluarán los resultados experimentales.

1.1 Criopreservación

La preservación de órganos es uno de los temas de mayor interés en la investigación clínica de laboratorio debido a la gran importancia médica, especialmente para trasplantes humanos.

Además de la gran diferencia entre la oferta de donantes y la demanda para su trasplante y salvar vidas, hay que sumarle que a veces se desperdician los órganos que están disponibles porque no tienen mucha vida útil una vez extraídos del donante. Es por esto último que es tan importante investigar y mejorar las técnicas de criopreservación de órganos.

Actualmente, para corazones la técnica empleada es el almacenamiento en estado de hipotermia, bajando la temperatura del corazón a 4°C y consiguiendo un tiempo de conservación de cuatro horas. Es crítico aumentar este tiempo, especialmente si el donante está geográficamente muy distante, además de que por este procedimiento se reduce la calidad del órgano y tiene un alto coste económico.

La **criopreservación** es el proceso por el cual se consigue disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y mantenerlo en condiciones de vida suspendida durante un período prolongado de tiempo, mediante la congelación a muy bajas temperaturas, generalmente entre -80°C y -196°C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido). A esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan efectivamente detenidas.

La criopreservación presenta algunos **desafíos**. Mantener un órgano a temperaturas inferiores a cero grados produce lesiones debido a la formación de hielo inherente al proceso, Esto se produce por dos motivos:

- Durante la congelación, el agua cristaliza aleatoriamente por la parte extracelular. Por consiguiente coexisten dos estados diferentes: la parte líquida por la zona intracelular y el hielo que se forma en la extracelular. La disminución de agua líquida aumenta la concentración de sales disueltas en ella y produce un desequilibrio osmótico en la célula. Esto provoca la deshidratación de la célula, comprometiendo su viabilidad futura.
- El agua al congelarse, ocupa más volumen, lo que produce una sobrepresión sobre las células, generando en ellas un daño mecánico que causa planos de fractura en la estructura interna, lo

que las hace inservible para su uso posterior.

El problema se agrava con los tejidos más grandes porque se requiere más tiempo para cargar los compuestos, lo que significa tiempos de enfriamiento más lentos y más oportunidades de que se produzca la exposición tóxica. Además, si el enfriamiento es demasiado rápido o alcanza temperaturas demasiado bajas, pueden aparecer grietas.

Para evitar la formación de hielo durante el enfriamiento se usan los llamados crioprotectores. Estos agentes sustituyen al agua de la célula y consiguen mantener el equilibrio osmótico en ella.

1.1.1 Crioprotectores

Los crioprotectores son soluciones anticongelantes que evitan o reducen la formación de hielo durante el proceso de congelación y descongelación de las células. Se requieren altas concentraciones de estas soluciones, por lo menos cinco veces mayores que un enfriamiento lento convencional.

El uso de crioprotectores tiene un inconveniente y es que a temperatura ambiente son tóxicos, por lo que se deben respetar unas tasas mínimas de enfriamiento y cantidad de esta sustancia, de forma que a menor temperatura se puede utilizar mayor cantidad del producto.

Uno de los principales problemas a la hora de encontrar un buen protocolo de aplicación del procedimiento de crioprotección es el desconocimiento de saber qué cantidad utilizar, cómo entra y cómo se extiende el crioprotector cuando se introduce en el órgano.

Para este estudio se usará como agente crioprotector el dimetilsulfóxido (DMSO), mezclado con PBS.

- El **DMSO** se caracteriza por ser muy tóxico a temperatura ambiente, pero consigue muy buenos resultados a temperaturas muy bajas. Es por eso que es necesario mezclarlo con el PBS. El DMSO pertenece al grupo de los llamados “crioprotectores penetrantes”, que funcionan desplazando el agua del interior de la célula y evitando así la formación de cristales de hielo.

El dimetilsulfóxido crioprotege debido principalmente a su alta capacidad para la prevención de acumulación excesiva de electrolitos y de otras sustancias durante el enfriamiento, así como su capacidad para evitar la formación de cristales.

Su eficacia se ve aumentada por su bajo peso molecular que permite la entrada rápida a través de la membrana celular.

- El **PBS** es suero fisiológico, por lo que un animal puede sobrevivir varias horas con PBS.

Por tanto, en los protocolos de criopreservación la perfusión se inicia con PBS. A medida que va disminuyendo la temperatura y el DMSO es menos tóxico, se va aumentando la cantidad de DMSO y disminuyendo la de PBS, hasta llegar a la cantidad deseada de DMSO.

1.1.2 Avances en criopreservación

Aunque queda mucho camino por explorar, en los últimos años se ha mejorado mucho en la criopreservación.

Se han estado criopreservando o congelando con éxito pequeños grupos de células humanas durante 40 años.

Los investigadores han utilizado soluciones que contienen las AFP (proteínas anticongelantes) del pez-hielo antártico para conservar corazones de ratas durante un período de hasta 24 horas a unos cuantos grados bajo cero. Los peces-hielo de la Antártica sobreviven en aguas muy frías a -2°C gracias a las proteínas que reducen el punto de congelación de sus fluidos corporales y se unen a los cristales de hielo para detener su propagación.

Sin embargo, a una temperatura más baja se producen efectos contraproducentes en las AFP de este animal: obligan a que los cristales de hielo en formación produzcan puntas afiladas que perforan las membranas celulares.

En el año 2000, Mike Taylor y su equipo de Cell and Tissue Systems en Charleston, Carolina del Sur, vitrificaron segmentos de 5 cm de longitud de la vena de un conejo, que se ubica entre las células y los órganos en términos de complejidad y demostraron que conservan la mayor parte de su función después de calentarse.

Gregory M. Fahy y sus compañeros de 21st-Century Medicine, una empresa de investigación de la criopreservación con sede en California, realizaron un avance importante: vitrificaron el riñón de un conejo, manteniéndolo por debajo de la temperatura de transición vítrea de -122°C durante 10 minutos, antes de descongelarlo y trasplantarlo a un conejo que vivió durante 48 días antes de que fuera sacrificado para examinarlo.

Pero el riñón no funcionó tan bien como una versión sana, principalmente debido a que una parte en particular, la médula, tardaba más en absorber la solución crioprotectora, lo que significaba que se formara un poco de hielo en ella durante la descongelación. En el [Anexo B](#) se adjunta esta investigación.

El progreso ha sido lento, en parte, dice Fahy, porque dejó de producirse una sustancia química que era parte clave de su método. No obstante, su grupo ha recuperado terreno y dio un paso adelante: en la reunión anual de la Sociedad de Criobiología en 2013, Fahy presentó un método que permite que la médula se cargue más rápidamente con crioprotectores.

1.2 Fisiología cardíaca

El sistema cardiovascular es el gran sistema de comunicación de los animales. Es el encargado de encauzar y propulsar la sangre para que irrigue todo el cuerpo. La sangre es esencial como transportador de alimentos, productos de desecho, oxígeno, dióxido de carbono, hormonas, células del sistema inmune, etcétera. Pero también tiene otras funciones como por ejemplo regular la temperatura corporal.

El sistema cardiovascular tiene un doble circuito, uno que irriga los pulmones y otro que irriga el resto del cuerpo. Ambos tienen su origen y fin en el corazón, el órgano que se encarga de mantener a la sangre en constante movimiento. Los vasos sanguíneos por los que circula la sangre presentan el mismo patrón en ambos circuitos: corazón, arterias, arteriolas, red de capilares, vénulas, venas y corazón. En algunas ocasiones, una arteriola o una vénula pueden estar entre dos redes capilares, formando lo que se denominan sistemas porta, como los del digestivo e hígado.

Las arterias son conductos que conducen la sangre desde el corazón hasta otros órganos y sus paredes son generalmente gruesas para contrarrestar la presión sanguínea provocada por los latidos del corazón.

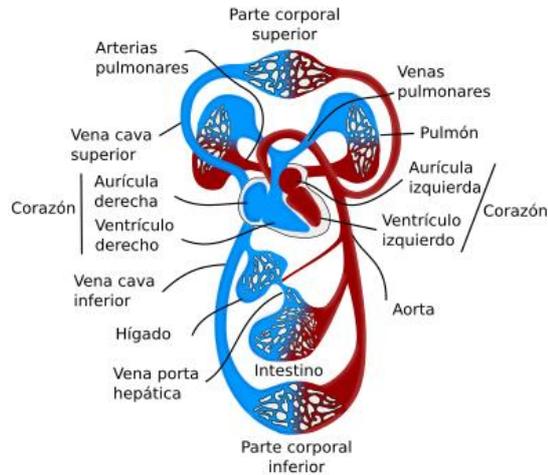


Figura 1. Esquema del circuito circulatorio en mamíferos.^[6]

1.2.1 Músculo cardíaco

El corazón es el órgano encargado de propulsar la sangre por el sistema circulatorio, aunque es ayudado por los movimientos corporales. Está formado principalmente por células musculares estriadas cardíacas, las cuales sólo se encuentran en este órgano.

En mamíferos consta de 4 cavidades, dos ventrículos que propulsan la sangre, y dos aurículas, una que recoge la sangre de los pulmones y la otra del resto del cuerpo. Las aurículas están separadas por un tabique interauricular y los ventrículos por un tabique interventricular (ver figura 2). El reflujo de la sangre se evita con las válvulas que se encuentran en las salidas de las diferentes cavidades.

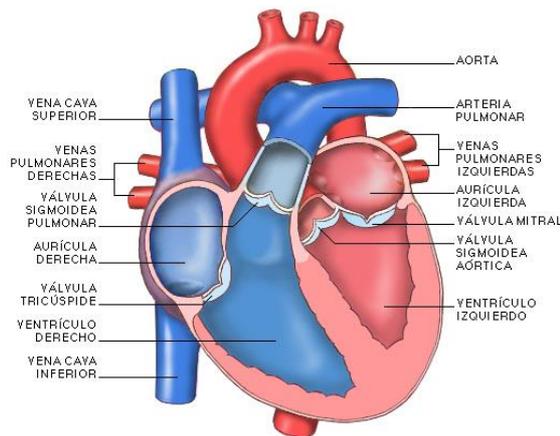


Figura 2. Representación del músculo cardíaco.^[6]

Langendorff observó inicialmente que en el momento en que se restablecía el flujo coronario en un corazón completamente escindido del animal (supuestamente muerto o moribundo), se reiniciaba la actividad contráctil espontánea perdida, y que este fenómeno era independiente del llenado ventricular, pues el corazón latía en vacío. De ahí concluyó que una de las propiedades intrínsecas del corazón era su excitabilidad.

1.3 Características cardiovasculares de *Mus Musculus*

Los animales de pequeña talla, concretamente los roedores, gozan de unas determinadas características que los convierten en sujetos muy adecuados para la experimentación biológica puesto que por su coste relativamente reducido, facilidad de manipulación, mantenimiento en cautividad, ubicación en instalaciones poco voluminosas así como por tratarse de seres muy prolíficos que se reproducen con gran facilidad y alcanzan el estado adulto en poco tiempo, se convierten en un material muy adecuado para ensayos biológicos y biomédicos.

Además, el ratón común, o *Mus Musculus*, tras descifrar su genoma en 2002, tiene el 99% de coincidencia con el ADN de *Homo Sapiens* (unos 30.000 genes), hasta tal punto que se ha descubierto que el organismo humano posee el gen que regula el crecimiento de la cola de ratones. Esta extraordinaria similitud confirma la enorme utilidad del ratón como modelo animal para estudiar causas genéticas y experimentaciones. El 90% de los genes asociados a enfermedades son idénticos en roedores y hombres. Por esto es tan importante la elección de ratones para este proyecto.

Entre las siguientes características extraídas del doctorado *La utilización de animales en experimentación biomédica* por Joan Roca, es relevante la presión arterial máxima de **120 mmHg** para ratones de cepas entre 20-30 g. En el presente estudio se experimenta con cepas de distinto tamaño, desde la más pequeña FVB (26-31 g) hasta la más grande CD1 (hasta 42 g). Por lo tanto, al trabajar con corazones de ratones mayores, usaremos este dato como limitante para calcular posteriormente la presión que se introducirá de forma retrógrada por la aorta.

Vida media	1,5-2,5 años
Vida media animal estabulado	1-1,5 años
Frecuencia cardiaca	600 (400-800) lat/min
Frecuencia respiratoria	160 (80-240) resp/min
Hematócrito	41 (39-43) (%)
Glóbulos rojos	6-11 (n/μl × 10 ⁶)
Glóbulos blancos	5-10 (n/μl × 10 ³)
Presión arterial	120/75 (mmHg)
Volumen sanguíneo	6-8 (porcentaje peso corporal)
Temperatura rectal	37,6 (37,2-38) °C
Número de cromosomas	2n = 40
Edad mínima de cruce	50 (45-55) días
Período de gestación	19 (18-21) días
Número de animales por camada	8-12
Peso al nacer	1-1,5 (g)
Apertura de los ojos	10-12 días
Edad de destete	19-21 días
Peso al destete	10-12 (g)
Peso del animal adulto	20-30 (g)
Consumo diario de comida	16-20 (g/100 g peso animal)
Consumo diario de bebida	15-18 (ml/100 g peso animal)
Temperatura ambiente	20-23 °C
Humedad relativa ambiente	50-60 (%)
Régimen de actividad	Nocturno
Superficie de la jaula	0,015 m ²

Tabla 1. Características relevantes para experimentación de *Mus Musculus*.

2 OBJETIVO

El objetivo principal del proyecto es desarrollar y optimizar un sistema de criopreservación de órganos y realizar un estudio experimental, a fin de progresar en el campo de la criopreservación y proporcionar avances para posteriores descongelamientos.

Esto es crucial para apuntar en la dirección de mejorar métodos de trasplante, pues actualmente un corazón humano sólo puede mantenerse vivo cuatro horas. Para ello se va a estudiar el corazón de ratón común.

En primer lugar, se va a proceder a la puesta a punto, caracterización y diseño de los sistemas de perfusión y congelación implicados. Son principalmente los tres siguientes:

- Langendorff. Se va a describir el funcionamiento general y el de todos los subsistemas involucrados, como la bomba de jeringa, el carbógeno y el ajustador de pH. Se va a determinar el caudal máximo sin dañar el órgano y a caracterizar la solución utilizada (Tyrode).
- BioCool. Se va a describir el funcionamiento y el de todos los subsistemas involucrados, como el PicoLog, extractor y agitador. Se va explicar la curva de congelación a seguir.
- Sistema de perfusión. Se va a describir el funcionamiento general y el de las bombas peristálticas, caracterizándolas. Se va a explicar procedimiento para cebar tubos y a describir el funcionamiento del software que controla el programa y cómo modificar las curvas de concentraciones. Se va a medir experimentalmente las concentraciones durante el programa completo.

Tras el desarrollo de los sistemas, se procede a experimentar con corazones aislados de *Mus Musculus*.

- Siguiendo un protocolo de cirugía, se extrae y aísla el corazón. Inmediatamente después se procede a la canulación retrógrada de la aorta.
- Se estudia la viabilidad del órgano aislado y su supervivencia. Mediante sistema Langendorff se evalúan sus latidos en vacío.
- Por último comienza la la criopreservación del órgano, a través de la sincronización del sistema de perfusión (que introduce gradualmente el crioprotector) y el BioCool (que disminuye la temperatura para evitar la toxicidad del crioprotector).

Cabe destacar que es un proceso iterativo, esto es, algunos resultados experimentales han supuesto modificar los sistemas iniciales, a fin de optimizar el conjunto.

Para complementar el proyecto, como archivos adjuntos a esta memoria se presenta un Drive con la siguiente dirección:

<https://drive.google.com/drive/folders/1b0VdH5nyybVZ7U6cK2sI8mcyFEbdWcsl?usp=sharing>

En él se incluyen todos los archivos necesarios para la instalación del software y configuración de tarjeta de adquisición, además de algunos videos para ilustrar los resultados experimentales y un video del protocolo de

cirujía que será explicado en detalle en la sección 4.

Las curvas de enfriamiento y concentraciones (Figura 3), han sido basadas en el experimento de Gregory M. Fahy, *Physical and biological aspects of renal vitrification*, 2009 recogido en Anexo B. En el presente proyecto, se han hecho algunas modificaciones, como reducir el tiempo a una hora, que serán explicadas más adelante.

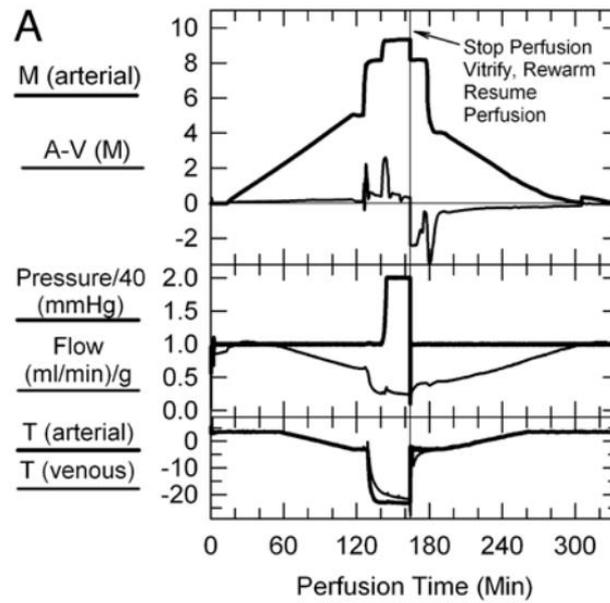


Figura 3. Concentración, presión y temperatura para experimento con riñón de conejo.

3 DESCRIPCIÓN DE SISTEMAS

A Continuación se describen los tres sistemas principales desarrollados en el proyecto, su funcionamiento, incidencias, mejoras y caracterizaciones.

Es importante destacar que el sistema Langendorff permite por sí mismo evaluar la viabilidad del órgano, examinándose sus latidos en vacío. No obstante, es necesario una sincronización en el proceso de criopreservación con el BioCool y el sistema de perfusión.

3.1 Langendorff

La preparación de Langendorff es una técnica experimental de órgano aislado. Su principio básico consiste en perfundir las arterias coronarias a través de una cánula de perfusión insertada en la aorta, con una solución oxigenada rica en nutrientes (solución Tyrode). La presión hacia atrás hace que la válvula aórtica se cierre, obligando a la solución a los vasos coronarios, que normalmente suministran sangre al tejido del corazón. Esto alimenta nutrientes y oxígeno al músculo cardíaco, lo que permite continuar latiendo durante varias horas en vacío, después de la extracción del animal.

Mediante el calefactor se consigue mantener el baño de agua a temperatura de 39°C. La bomba de jeringa de precisión introduce a caudal constante solución Tyrode, que ha sido oxigenada a través del Carbógeno. Justo debajo del vaso de precipitado con Tyrode hay un agitador, cuya función es mover corrientes de solución para homogeneizar el oxígeno dentro de dicha solución.

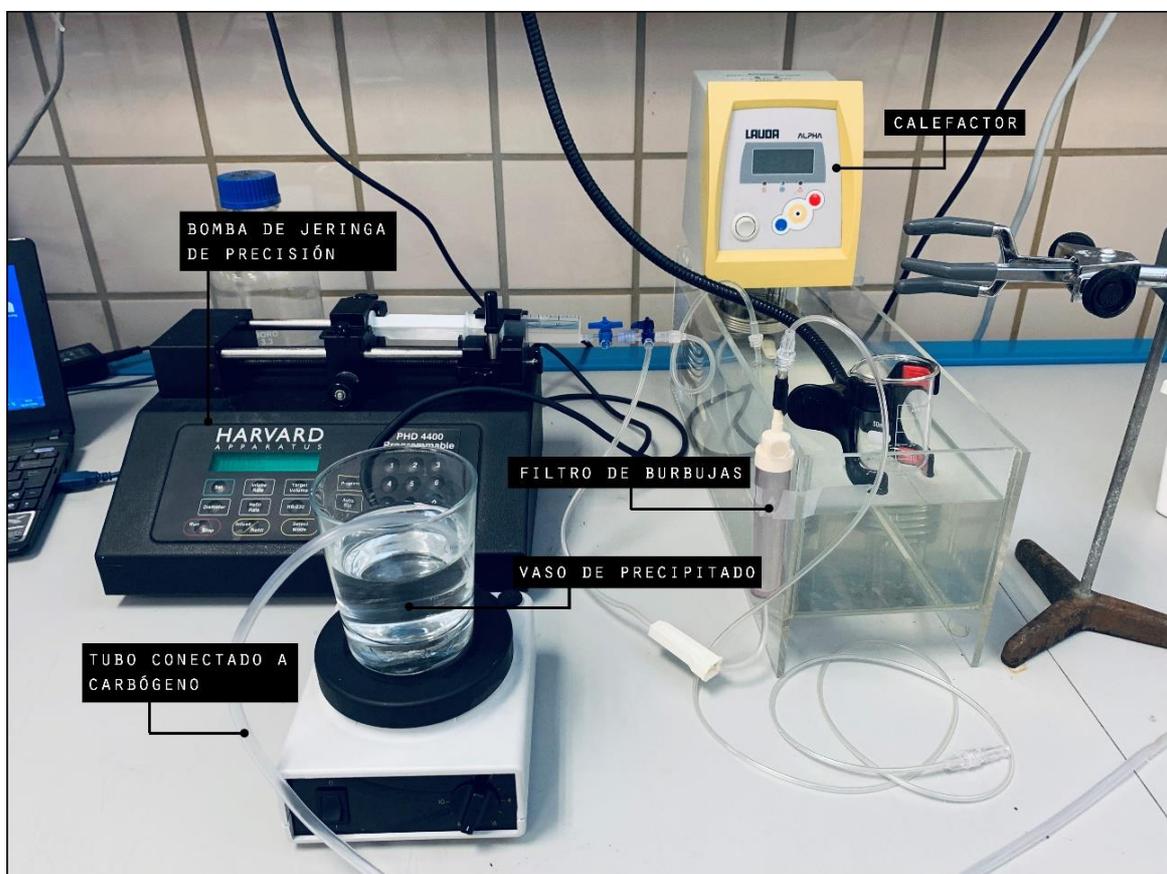


Figura 4. Configuración sistema Langendorff.

3.1.1 Bomba de jeringa de precisión

Se ha utilizado el modelo HARVARD PHP 4400 Programmable. Esta bomba proporciona hasta 890N de bombeo lineal para aplicaciones de alta presión. Puede contener jeringas desde 0,5 microlitros hasta 140 mililitros, lo que permite un amplio rango de caudales desde 0,0001 μl / hora hasta 220,82 ml / minuto.



Figura 5. Bomba de jeringa de precisión HARVARD PHP 4400.

Su **funcionamiento** es muy intuitivo:

1. Colocar la jeringuilla anclada con el pistón.
2. Presionar botón *Set* y a continuación *Infuse rate*.
3. Seleccionar el caudal. En este caso 2.1 ml/min. En el siguiente apartado se explica el caudal máximo calculado. Presionar *Enter*
4. Presionar *Run/Stop*. En la pantalla se visualizará los ml acumulados desde que ha comenzado el programa

Determinación caudal

La presión en la entrada de la aorta es un factor limitante para calcular el caudal máximo. Partiendo de que la presión máxima que admite sin daños una perfusión de corazón de *Mus Musculus* es la antes mencionada 120mmHg (Roca i Acín, Joan. *La utilización de animales en experimentación biomédica (I)*. 2001).

Para determinar el caudal se van a estudiar dos estados. Estado 1 corresponde al estado a la entrada de la aguja (por donde entra la solución Tyrode) y estado 2 a la salida de la aguja por donde se perfunde el corazón.

Mediante un manómetro, se ha medido la presión de entrada en la aguja P_1 para distintos caudales. (ver tabla 2).

Para calcular la presión de salida a través de la aguja P_2 se ha empleado la ecuación de Bernoulli. Teniendo en cuenta que se trabaja a bajas velocidades (número de Mach pequeño), por lo tanto la densidad del fluido puede considerarse constante, independientemente de las variaciones de presión en el flujo. Debido a esto podemos suponer un fluido incompresible y utilizar la fórmula de Bernoulli:

$$\frac{V^2 \rho}{2} + P + \rho g z = \text{constante}$$

Dado que la aguja se encuentra a la misma altura, en posición horizontal, consideramos el término $\rho g z$ nulo.

$$\frac{V_1^2 \rho}{2} + P_1 = \frac{V_2^2 \rho}{2} + P_2$$

Teniendo en cuenta caudal es igual a velocidad por área y las áreas a la entrada y a la salida son A_1 y A_2 respectivamente, se tiene:

$$Q = VA$$

$$A_1 = 1.59 \cdot 10^{-5} \text{ m}$$

$$A_2 = 1.59 \cdot 10^{-7} \text{ m}$$

Por consiguiente queda P_2 en función de P_1 y Q .

$$P_2 = P_1 + \frac{Q \rho}{2} \left(\left(\frac{1}{A_1} \right)^2 - \left(\frac{1}{A_2} \right)^2 \right)$$

En la tabla 2 se recogen los valores obtenidos por medición con manómetro (P_1) y calculados (P_2).

Caudal (ml/min)	Presión P_1 (Pa)	Presión P_2 (Pa)
0.35	2700	2699
0.7	4300	4297
1	5800	5794
1.5	8100	8087
2.1	11100	11076
2.8	14500	14457
3.5	19800	19733

Tabla 2. Presiones a la entrada y salida de la aguja en función del caudal.

A continuación se representan ambas presiones en función del caudal.

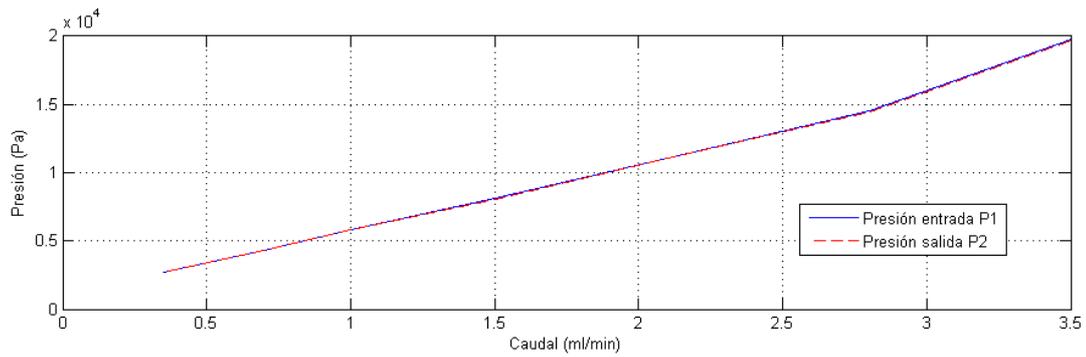


Figura 6. Gráfica presiones a la entrada y salida de la aguja en función del caudal.

Se puede observar que son muy similares las presiones de entrada y salida. Haciendo un aumento se comprueba que la de salida es ligeramente inferior.

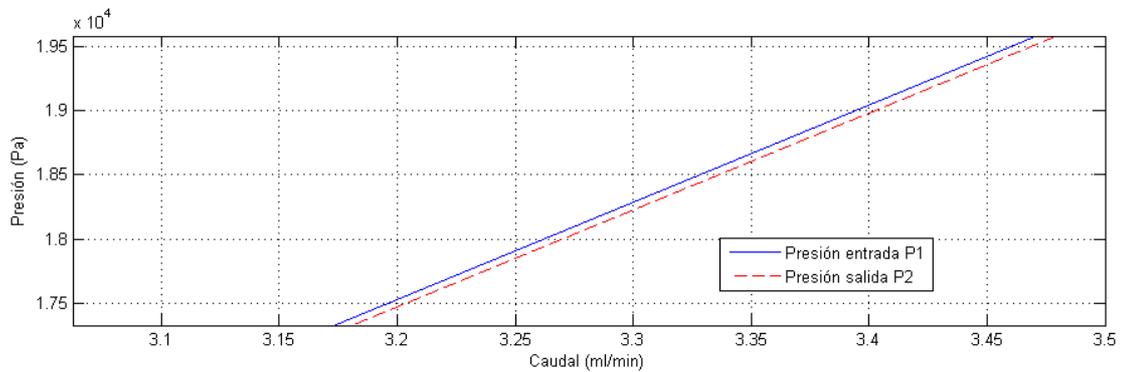


Figura 7. Gráfica ampliada de presiones a la entrada y salida en función del caudal.

La presión máxima que admite el corazón de ratón, 120mmHg = 15996 Pa. Por lo tanto es admisible un caudal de entrada de hasta 2.8 ml/min. En los experimentos se decide usar un caudal de 2.1 ml/min para tener cierto margen.

3.1.2 Solución Tyrode

La solución de Tyrode es una solución que es más o menos isotónica con el fluido intersticial y se utiliza en experimentos fisiológicos y cultivo de tejidos. Contiene magnesio, un azúcar (generalmente glucosa) como fuente de energía y utiliza bicarbonato y fosfato como tampón. Debe ser gaseado con 95% oxígeno y 5% de dióxido de carbono cuando se usa para aplicaciones de cultivo celular y experimentos de fisiología para lograr un pH apropiado. Para realizar el experimento, se ha obtenido la solución Tyrode disolviendo un sobre concentrado T2145 (figura 8) de 9.6 gramos para obtener 1L de solución. El Tyrode utilizado tiene la siguiente concentración:

CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.265 g/L
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.214 g/L
KCl	0.2 g/L
NaCl	8 g/L

NaH_2PO_4	0.05 g/L
D-glucose	1 g/L
NaHCO_3	1g/L

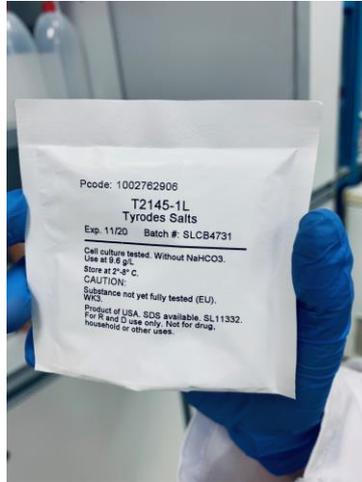


Figura 8. Tyrode concentrado en sobre.

3.1.3 Carbógeno

Se utiliza para proporcionar un 95% oxígeno y 5% dióxido de carbono a la solución Tyrode, necesario para la supervivencia del corazón. Para ello se conecta la bombona de carbógeno al vaso de precipitado mediante unos tubos. Entre los tubos y la bombona hay un reductor, que indica la presión en el momento que se abre la llave. Para accionarlo basta con girar la manecilla en el sentido de las agujas del reloj, de forma que ésta baja y permite el paso del gas. Muy importante tener precaución al manejar el carbógeno, y accionarlo siempre con movimientos muy suaves. Una vez oxigenada, comprobar que se ha cerrado completamente.



Figura 9. Carbógeno. Válvula completamente cerrada.

3.1.4 Ajuste pH

Antes de ajustar el pH de la solución Tyrode oxigenada, es conveniente calibrar el medidor con dos soluciones de pH conocido, una más básica y otra más ácida. Tras introducir el medidor en la primera solución, se ajusta con un destornillador en la parte superior al pH correspondiente hasta que alcance la medida conocida. Se repite y comprueba con la segunda solución de pH conocido.

Una vez realizado el calibrado, se procede a ajustar la solución Tyrodes hasta conseguir pH 7. Se consigue mediante el siguiente proceso:

- Se abre muy suavemente la válvula del carbógeno para oxigenar la solución. Esto produce acidez en la solución, cuyo pH baja.
- Se añaden unas gotas de 0.01 ml de Hidróxido de Sodio. El pH de la solución sube.

Se repite el proceso hasta alcanzar aproximadamente pH 7.



Figura 10. Medición de pH a solución Tyrodes oxigenada.

3.1.5 Incidencias y mejoras

- La configuración inicial fue con bomba peristáltica en vez de compresión con jeringuilla, por lo tanto había que añadir el eliminador de burbujas a continuación del tubo de la bomba. Esto provocaba más pérdidas de cargas y posibles fugas. Se evidenció en el experimento 9 descrito en el capítulo 5. Además de que el caudal máximo de la bomba peristáltica es 1.27 ml/min (calculado más adelante) y con esta bomba se consigue mayor flujo (usamos 2.1ml/min). La nueva bomba permite también visualizar en la pantalla los ml totales perfundidos. A partir del experimento 13, con este nuevo sistema, más cómodo y fácil de usar, no se tuvo ningún problema.
- La solución en un principio se oxigenaba con oxigenador de acuario común. Esto se cambió por carbógeno para asegurar que la solución estuviera bien oxigenada, de acuerdo a la configuración más usada en este tipo de experimentos. El oxigenador de acuario no consigue proporcionar el 95%

de oxígeno disuelto necesario. Se tuvo en cuenta cuando latió el primer corazón en el guante tras desprenderse de la aguja, era evidencia de que no le entraba el oxígeno correctamente.

3.2 BioCool

Su función principal es variar la temperatura del líquido en su interior, de acuerdo a unas temperaturas iniciales y finales. El BioCool permite introducir la velocidad de enfriamiento, en °C/min, por lo tanto pueden crearse rectas con la pendiente deseada en función del tiempo.

El objetivo del experimento es ir disminuyendo la temperatura progresivamente desde 4°C a -22°C, de acuerdo a unas curvas de enfriamiento, basadas en el experimento de Fahy (figura 12). Estas curvas están directamente relacionadas con el sistema de perfusión, de manera que mientras se va enfriando, se va introduciendo progresivamente más DMSO, que como se ha mencionado anteriormente, es tóxico a temperatura ambiente.

Es fundamental que el programa de concentraciones en el sistema de perfusión y el de temperaturas estén coordinados. Un desajuste de pocos minutos puede significar un gran error de perfusión, por lo tanto se ha trabajado simultáneamente con ambos sistemas.

Para enfriar se ha utilizado una solución de 700ml formada por 30% agua destilada y 70% etanol para evitar su congelación. Adicionalmente se ha añadido un agitador para evitar que la solución congele en los bordes y un poliespán (poliestireno expandido) en la superficie para favorecer su aislamiento térmico (Ver Figura 11).

El **funcionamiento y programación** de rampas es simple:

1. Mantener pulsado *Power*.
2. Mantener pulsado *Set*. Aparece en verde "Start Temp". Seleccionar con las teclas Up y Down la temperatura inicial.
3. Presionar *Set*. Aparece en verde "Ramp °C/min". Seleccionar con las teclas Up y Down la pendiente de la recta en °C/min. No hay que introducir signo, con temperatura inicial y final el programa ya entiende la inclinación.
4. Presionar *Set*. Aparece en verde "End Temp". Seleccionar con las teclas Up y Down la temperatura final.
5. Presionar *Set*. Aparece en verde "Hold Time". Seleccionar con las teclas Up y Down el tiempo que se mantiene a la temperatura final a partir de que se ha alcanzado.
6. Presionar *Set*. Aparecerá en rojo "Alarm". Seleccionar 1 para que reproduzca un sonido cuando termine el Hold time. Seleccionar *Set*.
7. Presionar *Run* y comienza el programa. En la pantalla se muestra la temperatura actual.

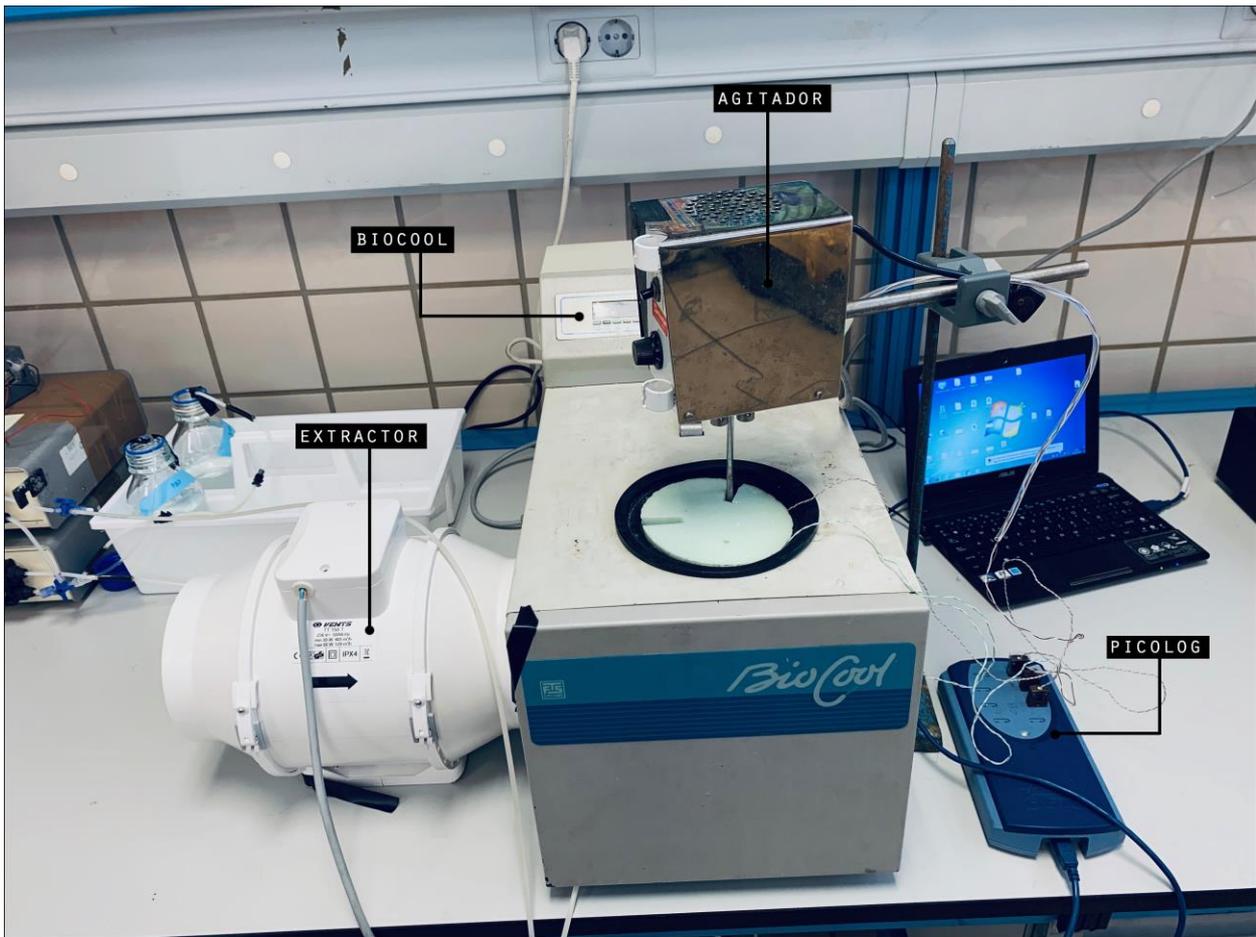


Figura 11. Configuración inicial sistema BioCool. El extractor lateral fue removido.

3.2.1 Modificación tiempo de congelación

Las curvas de enfriamiento están basadas en el experimento de Fahy para riñón de conejo (figura 12).

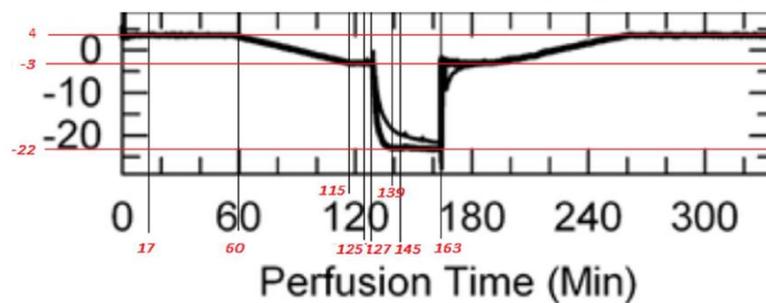


Figura 12. Gráfica temperatura frente al tiempo para perfusión de riñón de conejo.

No obstante, en este estudio se ha reducido el tiempo de congelación y perfusión debido al siguiente motivo. El corazón de ratón se trata un órgano más pequeño y no hay evidencias del tiempo adecuado, por lo tanto se acorta el tiempo para permitir poder realizar más experimentos, pasando de 163 minutos a 60 minutos.

El programa comienza a la temperatura de 4°C, por lo que previamente hay que reducir la temperatura desde la temperatura ambiente. A continuación se programan dos rampas precedidas de un Hold de 38 minutos (Figura 13).

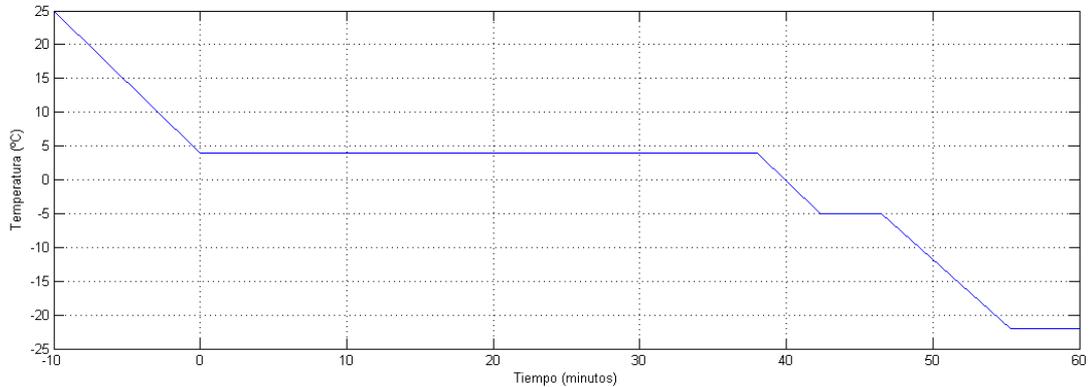


Figura 13. Curva de enfriamiento para BioCool.

3.2.2 Extractor

Debido a que el Biocool se calentaba demasiado por un fallo interno, se decidió acoplar dos extractores/sopladores. Cada uno de ellos puede ser usado como extractor o para enfriar el sistema de calentamiento interno, dependiendo del sentido en el que se coloque. Finalmente, se decidió usar sólo el extractor en la parte trasera ya que el soplador lateral disminuía demasiado la temperatura. Se comprobó que de esta forma el BioCool reproduce prácticamente con exactitud las curvas requeridas,



Figura 14. Configuración de extractor.

3.2.3 Agitador

Con el agitador se consigue evitar que haya congelación por acumulación de agua en ciertas zonas. Por lo tanto redistribuye de forma homogénea la mezcla de etanol y agua.

Es muy sencillo de utilizar, basta con encenderlo y seleccionar la velocidad con la ruedecilla, en este caso con la mínima es suficiente ya que se ha comprobado que evita la formación de hielo. No obstante, es recomendable comprobar cada cierto tiempo su correcto funcionamiento durante el experimento y evitar que

contacte con los bordes del recipiente dentro del BioCool y evitar también el contacto con el recipiente de criopreservación donde está contenido el corazón.



Figura 15. Agitador.

3.2.4 PicoLog

PicoLog es un sistema de adquisición de datos que ha sido usado para medir temperaturas. Este software tiene una interfaz muy intuitiva y fácil de usar, y permite tanto visualizar en tiempo real la temperatura como almacenar datos para posteriormente mostrarlos en tablas o gráficas.

En este proyecto se medirá la temperatura en el interior de BioCool, para comprobar que sigue la curva de enfriamiento deseada y la temperatura en el interior del recipiente donde irá el corazón.

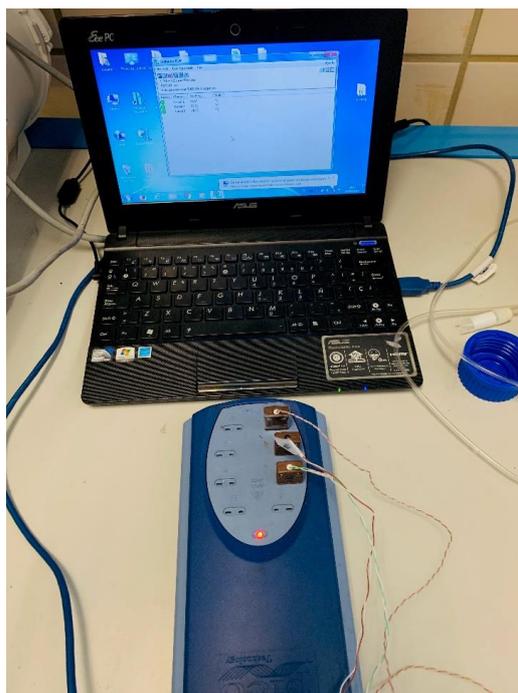


Figura 16. Software y Hardware PicoLog.

3.3 Sistema de perfusión

Su función principal es introducir progresivamente el anticongelante y el PBS mediante un software que varía la concentración en función del tiempo.

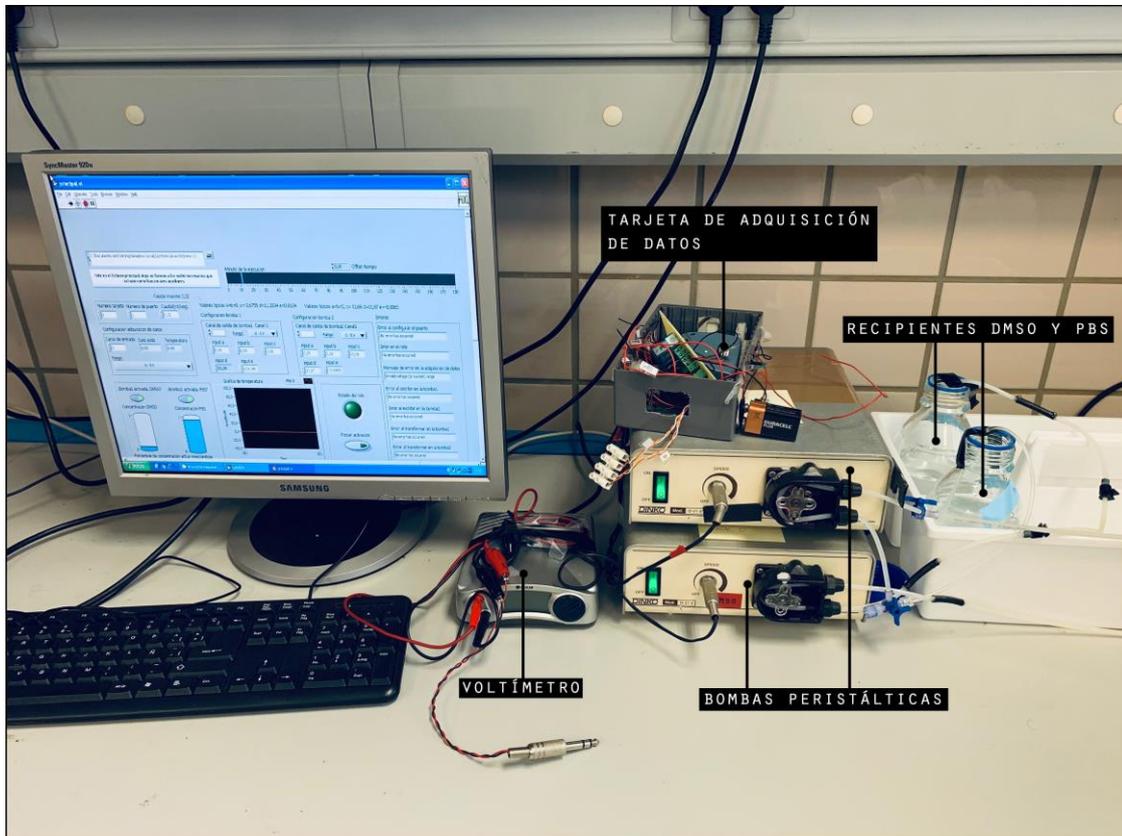


Figura 17. Configuración sistema de perfusión.

El sistema está compuesto por dos bombas peristálticas, una para DMSO y otra para PBS. Cada una de las cuales toma líquido de su recipiente correspondiente y se unen en un solo conducto con firma de T (ver figura 18), donde irá conectada la aguja con el corazón.



Figura 18. Unión de conductos DMSO y PBS en forma de "T".

Las bombas, cuyo caudal depende directamente del voltaje, están controladas por un software a través de una tarjeta de adquisición.

3.3.1 Bombas peristálticas

Una bomba peristáltica es un tipo de bomba hidráulica, cuyo principio de funcionamiento se basa en comprimir y descomprimir el tubo flexible por el que circula el fluido de forma progresiva. Esto se lleva a cabo por un rotor, al que van conectados unos rodillos que se encargan de comprimir el tubo.

Los rodillos aplastan el tubo taponándolo por la zona por la que pasan (figura 19); al girar se desplaza la zona taponada por el primer rodillo y se libera el espacio que éste va dejando, creando así un vacío que fuerza al fluido a moverse por ese espacio; cuando continúe el giro, el segundo rodillo ocupará la posición que dejó el primero y se repetirá el proceso. El fluido avanzará a medida que la compresión vaya avanzando por el conducto.

En todo momento hay al menos un rodillo comprimiendo el tubo, lo cual evita que el líquido circule hacia atrás.

El funcionamiento de estas bombas se ilustra en la siguiente figura:

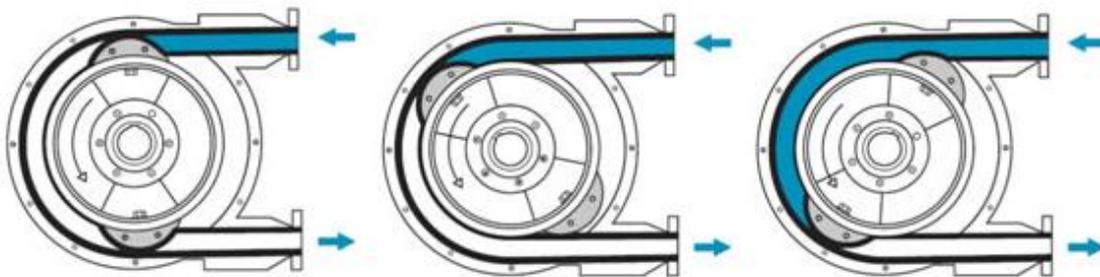


Figura 19. Esquema de funcionamiento bombas peristálticas.

Caracterización bombas peristálticas

Se ha caracterizado el caudal de la bomba en función del voltaje de entrada. Para ello se ha usado una fuente de alimentación de 0 a 10V y se ha medido en 5 puntos distintos el tiempo que tarda en llenar un cierto volumen, para obtener el caudal. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Voltaje (V)	Volumen (ml)	Tiempo	Caudal (ml/s)	Caudal (ml/min)
1.1	2	30'	0.001111	0.06666
2.5	2	7'27"	0.004474	0.26844
5	1	1'36"	0.010417	0.62502
7.5	2	2'15"	0.014815	0.8889
10	2	1'34"	0.021277	1.27662

Tabla 3. Caudal de bomba medido experimentalmente.

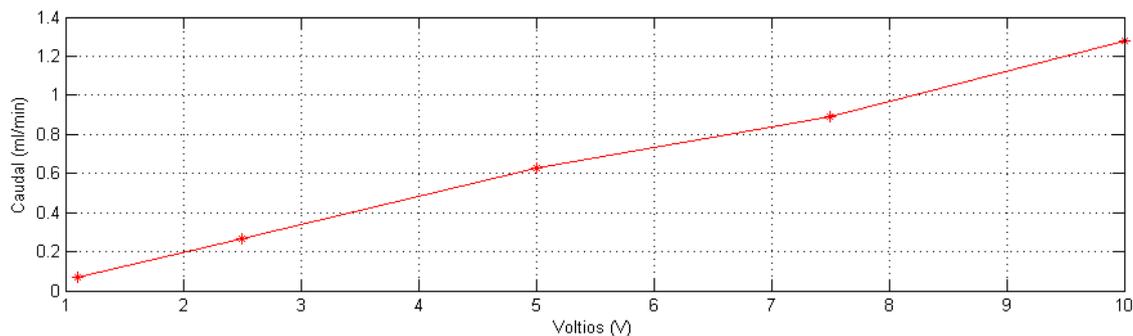


Figura 20. Gráfica Caudal de la bomba en función del voltaje de entrada.

Como puede observarse, el caudal de las bombas tiene un comportamiento lineal con el voltaje. La tarjeta de adquisición permite dar un máximo de 5 V, por lo tanto tenemos caudal máximo de entrada 0.625 ml/min.

Por debajo de 1 V se ha comprobado que hay una zona muerta en la que la bomba no se activa. Esto será comentado más adelante.

3.3.2 Cebiar tubos

Antes de comenzar el programa, es muy importante que los tubos estén cebados debido a que burbujas de aire son muy perjudiciales para el corazón. Para ello se han empleado dos técnicas. La primera fue mediante introducción de líquido directamente desde jeringuilla. Aunque es más rápido, se comprobó el inconveniente de la aparición de zonas con aire, inevitables con tantas conexiones, especialmente en la unión mediante luers. Finalmente se decidió cebiar mediante un Voltímetro, que a partir de 11V da máxima potencia a las bombas, y cada una se ceba en unos 8 minutos.

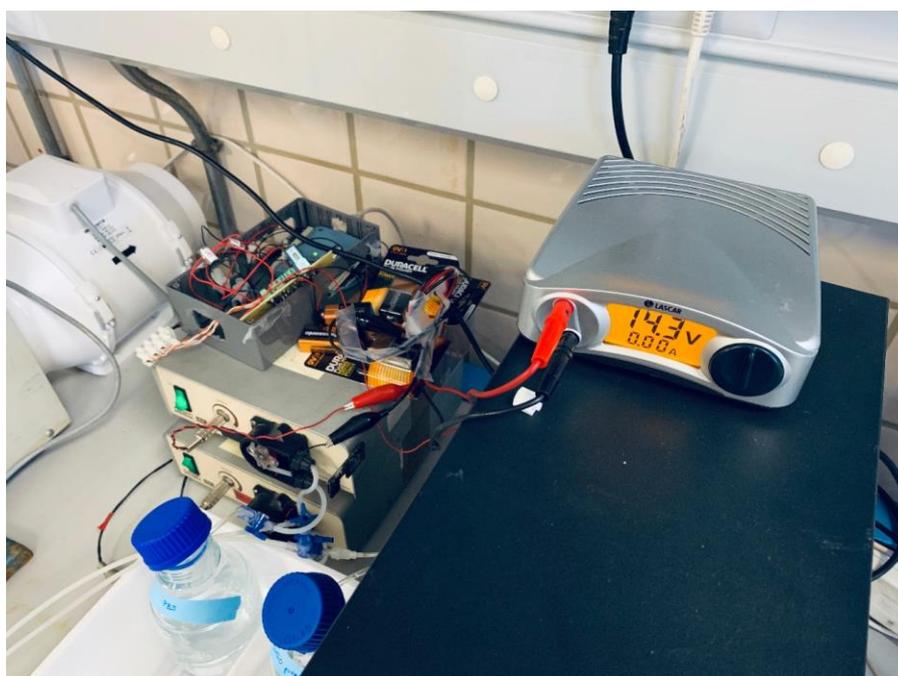


Figura 21. Purgamiento de tubos por voltímetro.

3.3.3 Tarjeta de adquisición de datos

Para que el ordenador pueda controlar las bombas se necesita una tarjeta de adquisición de datos, que transforme las señales física de las bombas (analógicas) en datos que puedan ser procesados por un sistema digital, como el ordenador, y viceversa.

Se usará la tarjeta PMD-1208LS, que se conecta al ordenador a través de un puerto USB.

Esta tarjeta es utilizable con Windows XP. Cuenta con 8 salidas analógicas, 2 de 10-bits, 16 entradas/salidas digitales y un contador de eventos externos de 32 bits. Se alimenta a través de USB con 5 Voltios.



Figura 22. Tarjeta de adquisición de datos conectada a PC por USB

Las entradas analógicas de la PMD-1208LS son configurables a través de software para ocho entradas de 11-bits individuales, o cuatro entradas de 12-bits diferenciales. Un circuito integrado de interface programable 82C55 provee las 16 entradas/salidas digitales discretas. Cada entrada digital puede ser configurada como entrada o salida.

La tarjeta USB PMD-1208LS se muestra en la figura 23. Todas las conexiones de entradas/salidas son realizadas en las borneras localizadas a lo largo de cada lado del dispositivo.

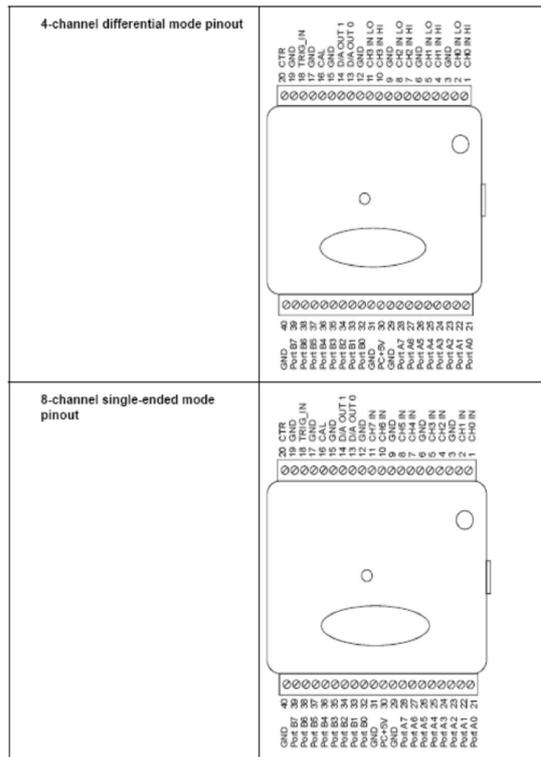


Figura 23. Configuración pines para tarjeta de adquisición de datos.

3.3.4 Software

El Software que se ha utilizado es LABView. Ver [Anexo A](#) para instalación de todo el software y archivos necesarios. En el archivo 'principal.vi' se encuentra la interfaz de usuario desde donde se controla el programa.

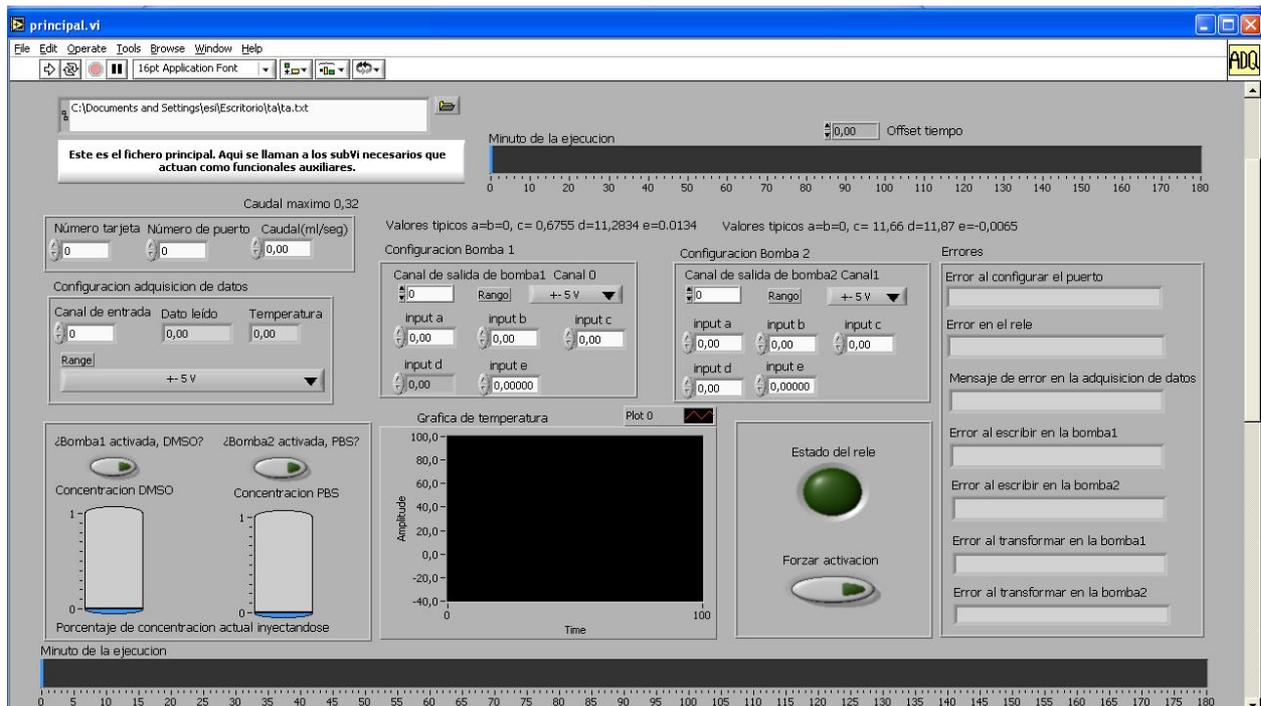


Figura 24. Interfaz de usuario "principal.vi".

Para ejecutarlo, se ha de seguir los siguientes pasos:

1. Seleccionar archivo .txt donde se guardarán los datos
2. Introducir Número de tarjeta:1
Número de puerto: 1
Caudal: 0.32.
Seleccionar rango 0-5V
3. Configuración bombas.
Introducir en bomba 1 canal de salida:0 y en bomba 2 canal de salida: 1.
Introducir parámetros a,b,c,d,e según los valores indicados. Modificar el rango de ambas bombas 0-5V
4. Activar las dos bombas clickeando en el icono verde.
5. Ejecutar programa.

Si se han seguido correctamente los pasos, quedará como la siguiente imagen

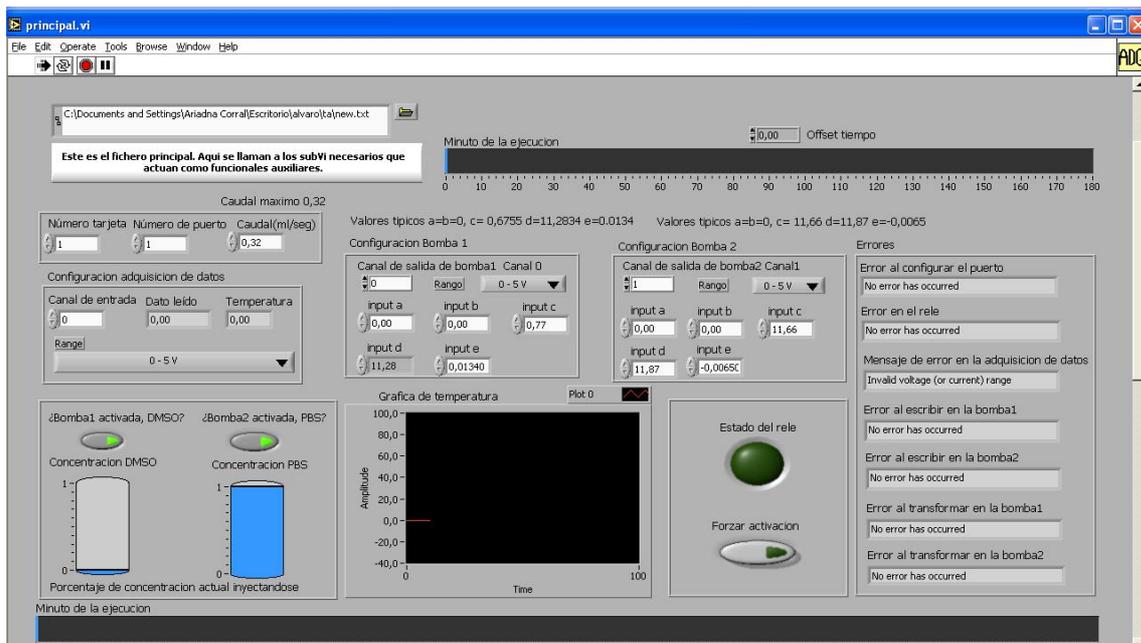


Figura 25. Parámetros introducidos antes de ejecutar programa.

Puede verse la evolución temporal de las concentraciones de las bombas en la parte inferior del programa.

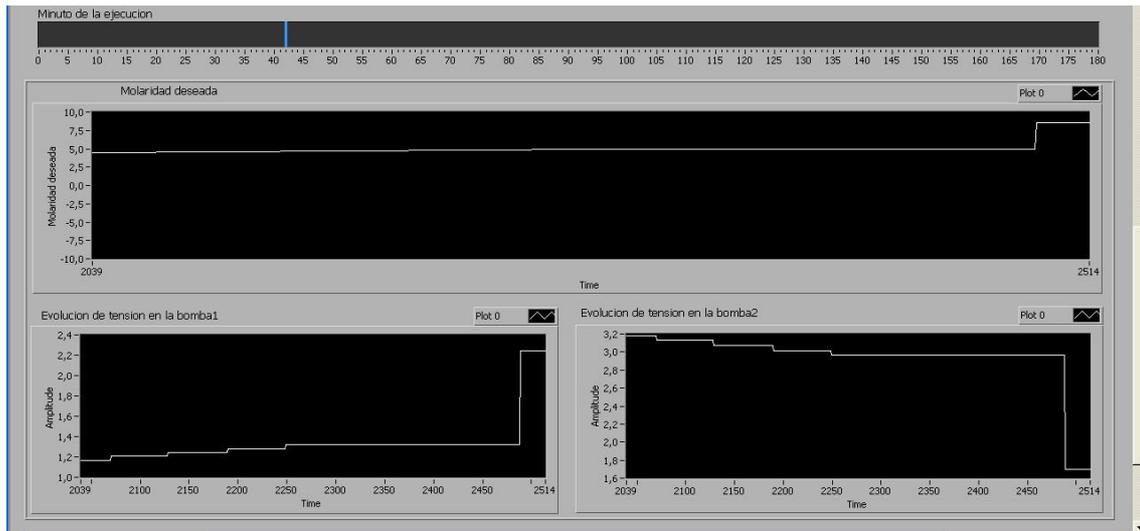


Figura 26. Representación de molaridad DMSO y PBS en función del tiempo de ejecución del programa.

“

Modificación curvas concentración

Las curvas de concentraciones están basadas en el experimento de Fahy para riñón de conejo

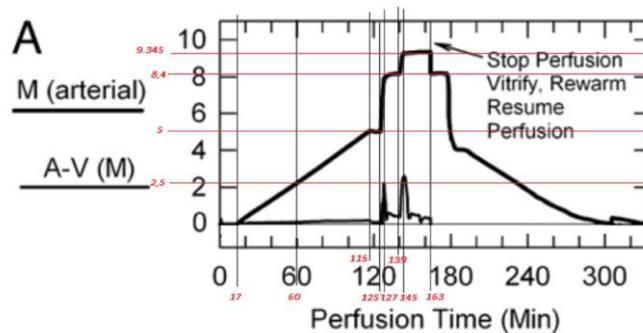


Figura 27. Gráfica Molaridad anticongelante frente al tiempo para perfusión de riñón de conejo.

Al igual que en las curvas de enfriamiento, y debido a que ambas tienen que estar sincronizadas, se ha reducido el tiempo de perfusión de 163 minutos a 60 minutos. Se obtiene la siguiente gráfica de concentración de DMSO (mol) frente al tiempo:

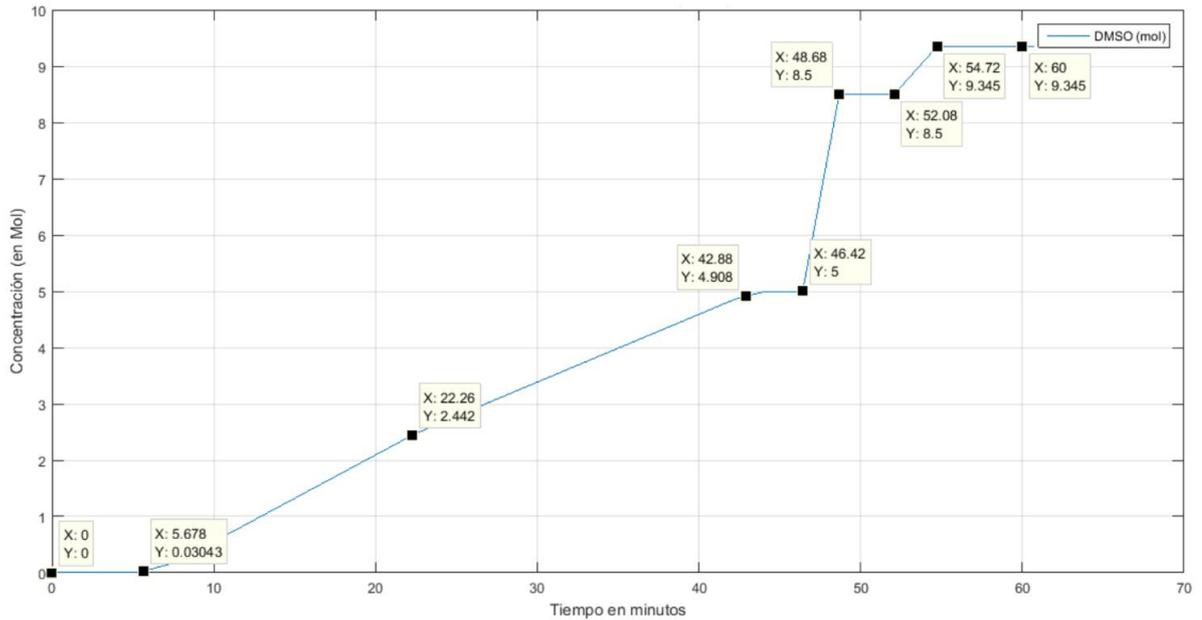
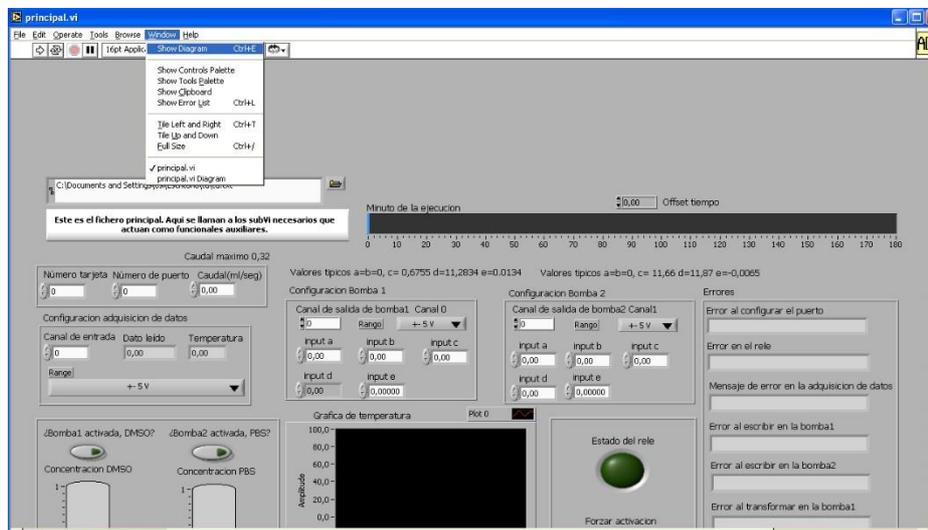


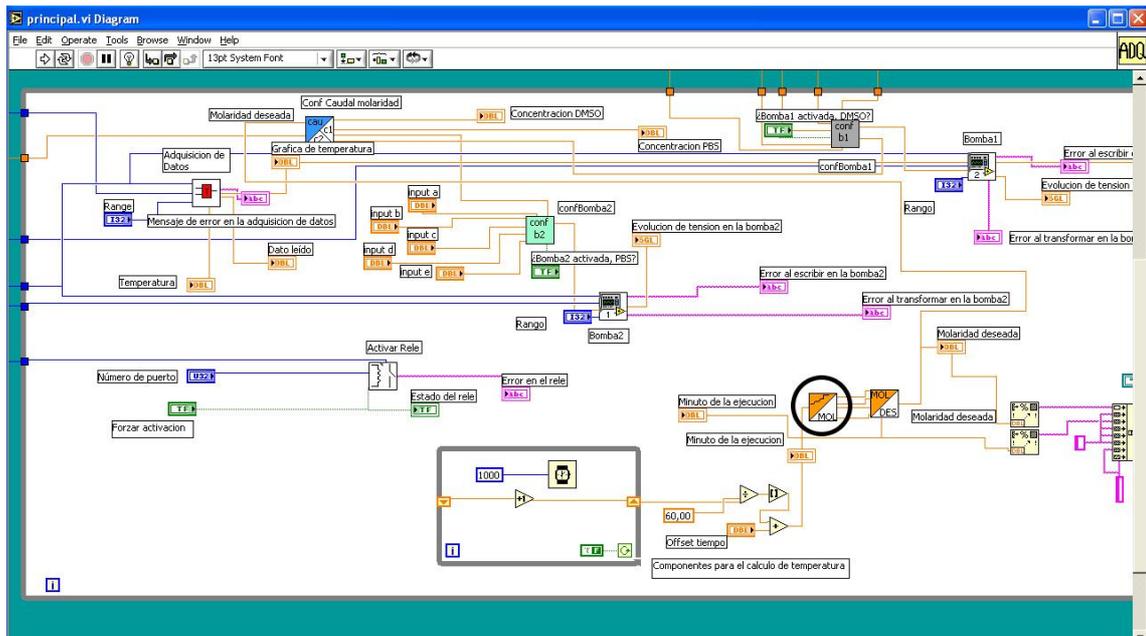
Figura 28. Gráfica concentración DMSO frente al tiempo para perfusión corazón de ratón.

Para obtener estas nuevas concentraciones, se ha modificado el software original. A continuación se describe cómo **cambiar las curvas de concentración**.

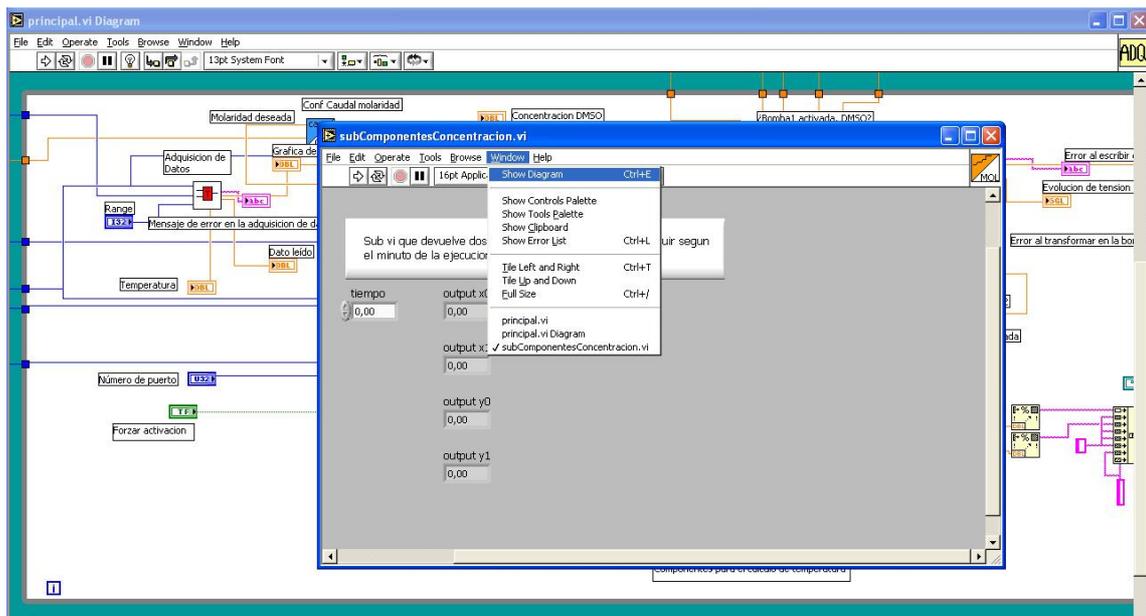
1. En la interfaz de usuario, pulsar en “Window→ Show Diagram”.



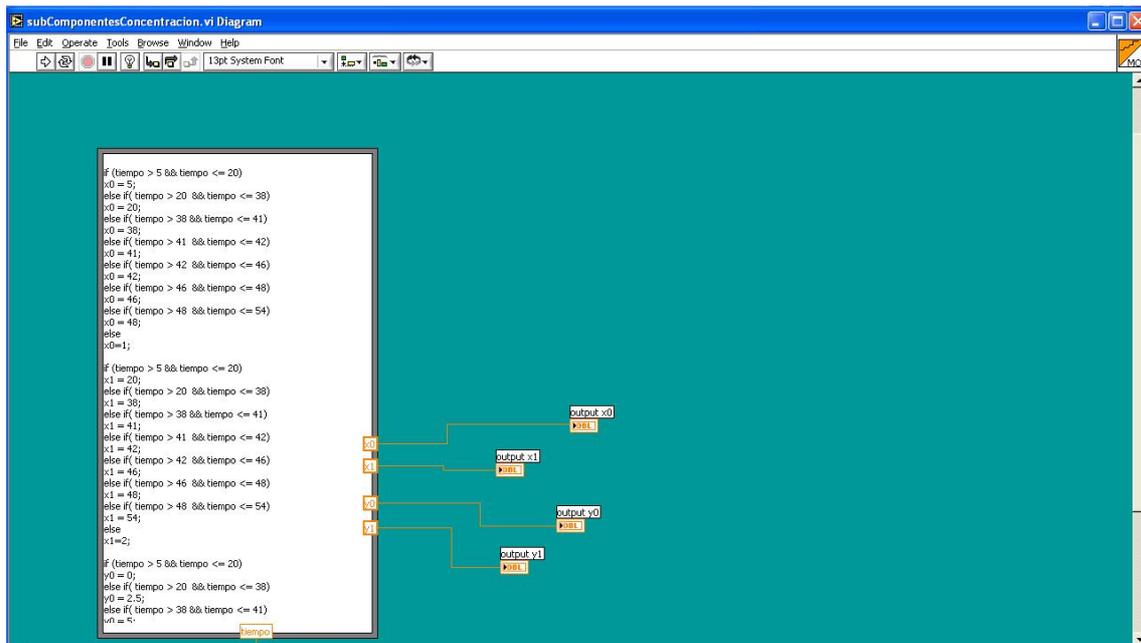
2. Dentro del Diagrama de bloques, doble click en el diagrama subComponentesConcentracion.vi. (Ver siguiente imagen, resaltado con círculo grueso)



Dentro del panel de subcomponentes.vi, seleccionar Window→Show diagram



Se abre el archivo con las curvas de concentración en función del tiempo. Basta con modificar los valores deseados para cambiar concentraciones o acortar/alargar el tiempo.



3.3.5 Comprobación experimental de concentraciones

Para verificar que la solución resultante sigue la concentración teórica de acuerdo con las curvas de molaridad implementadas en el software, se ha procedido a medir experimentalmente. Para ello se ha usado un **refractómetro**, que mide el Brix. Los grados Brix son una unidad de cantidad (símbolo °Bx) y sirven para determinar el cociente total de materia seca (generalmente azúcares) disuelta en un líquido.

En primer lugar se ha establecido la relación entre Brix y concentración (molaridad). Para calcularla se han realizado 11 medidas de distintas soluciones variando la cantidad de DMSO y PBS en cada solución.

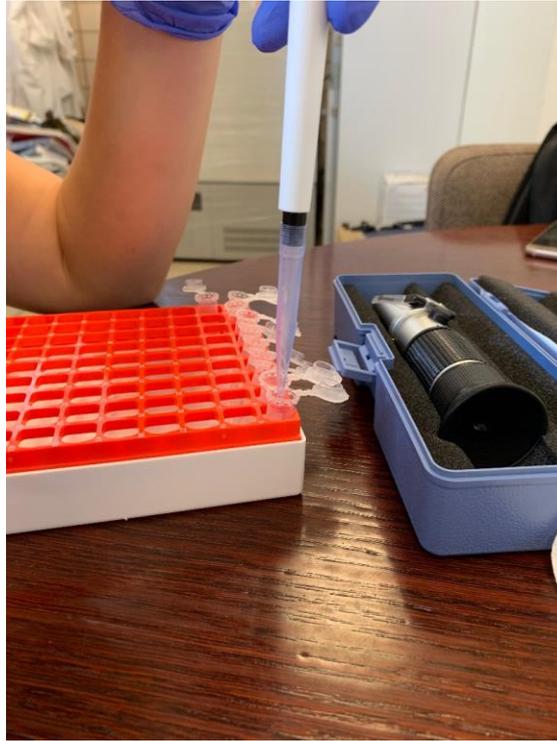


Figura 29. Soluciones de DMSO y PBS con distintas concentraciones.

Los resultados se han recogido en la siguiente tabla:

% DMSO	Vol DMSO (ml)	Vol PBS (ml)	Brix (%)	Molaridad DMSO
0	0	2	2	0
10	0.2	1.8	11.2	1.3
20	0.4	1.6	20.1	2.55
30	0.6	1.4	29.2	3.83
40	0.8	1.2	37.9	5.11
50	1	1	37.9	6.39
60	1.2	0.8	56	7.66
70	1.4	0.6	74.5	8.94
80	1.6	0.4	80.5	10.22
90	1.8	0.2	90.5	11.49
100	2	0	100	12.77

Tabla 4. Concentración de DMSO para distintas soluciones.

La molaridad de ha calculado de acuerdo a la densidad del DMSO=1kg/L y su masa molecular 78,3g. Siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Vol. DMSO (ml)} \cdot \frac{10^3 \text{ g DMSO}}{10^3 \text{ ml DMSO}} \cdot \frac{1 \text{ mol DMSO}}{78.3 \text{ g DMSO}} \cdot 2 \text{ ml de disolución} = \text{Molaridad DMSO}$$

Se presenta la gráfica y puede deducirse que el Brix es aproximadamente lineal con la Molaridad

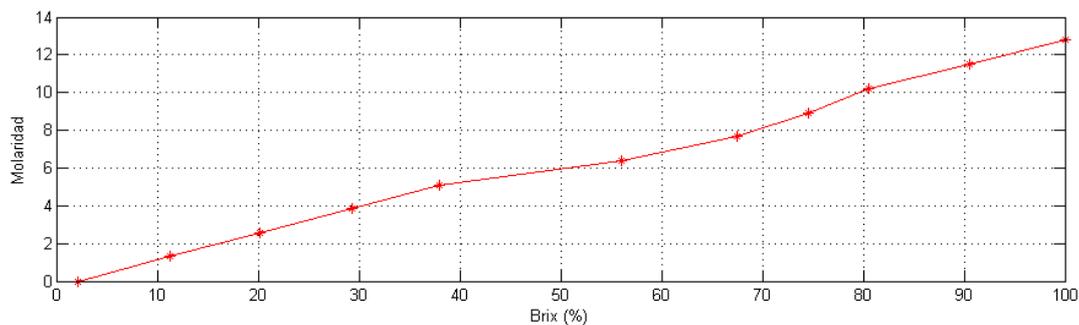


Figura 30. Gráfica Concentración DMSO (mol) en función del Brix (%).

A continuación se ejecuta el programa y se mide para cada instante de tiempo, el Brix de la solución resultante a la salida del conducto en forma de "T" con el refractómetro. En la tercera columna se ha añadido la correspondencia en Molaridad.

Tiempo	Brix (%)	Concentración DMSO (mol)
0	2	0.135
3	2	0.135
5	2	0.135
10	2	0.135
13	17	2.019
18	17	2.019
20	18	2.145
22	19	2.270
24	22	2.647
24.5	26	3.150
29	29	3.527

33	31	3.778
35	31	3.778
37	36	4.406
41	36	4.406
42	47	5.788
43.6	64.5	7.987
44	70	8.678
49.4	71	8.804
52	72	8.929
55	73	9.055
60	74	9.181

Tabla 5. Brix y Molaridad de DMSO para cada instante.

A continuación se representan ambas gráficas

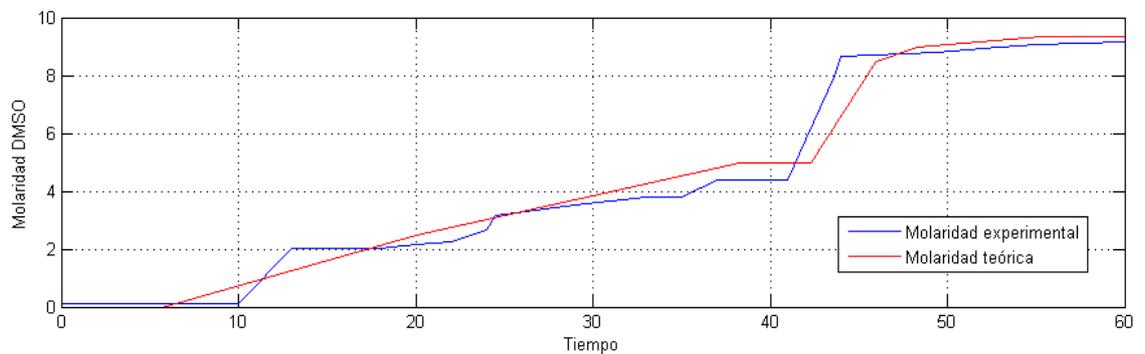


Figura 31. Gráfica Concentración teórica y experimental (mol) frente al tiempo de experimento.

Se puede observar un desfase entre la Molaridad teórica que recoge el software y la Molaridad experimental que se ha medido. Esto es debido a que la bomba tiene una zona muerta, hasta que no le llegan 0.7V no comienza a moverse la bomba de DMSO. Por este motivo, se observa que la concentración de DMSO no aumenta hasta el minuto 10. Para solucionar este desfase se estudiará emplear recipientes con concentraciones mixtas.

3.3.6 Incidencias y mejoras

- El DMSO es muy corrosivo. Como se puede observar en la figura 32 (izquierda). Daña el plástico, tanto los Luer de conexión como los propios tubos, por lo que los tubos de plástico se han sustituido por otros de polietileno (figura 32 derecha). Las conexiones de los luers se han sustituido por uniones selladas con epoxy, que evita pérdidas.

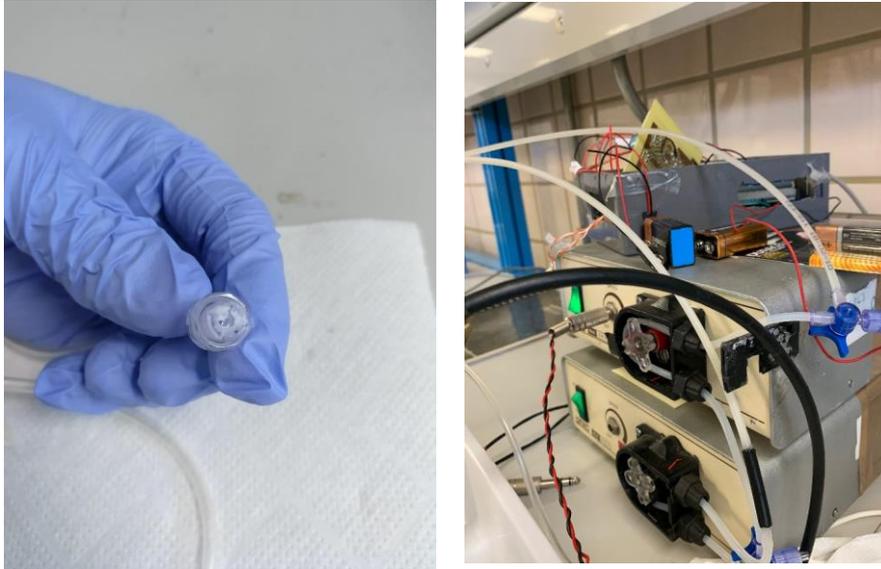


Figura 32. Tubos de plásticos dañados debido a la corrosión de DMSO (izquierda). Sustitución por tubos de polietileno (derecha)

4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En este capítulo se van a describir los procedimientos realizados en los experimentos. En primer lugar se estudia y comprueban los latidos del corazón aislado mediante sistema Langendorff. A continuación se procede a la criocongelación en sí, a través de la coordinación de BioCool y sistema de perfusión.

Hay que tener en cuenta que ambos procesos pueden ser independientes, esto es, se puede realizar Langendorff sin necesariamente criopreservar después, especialmente en los primeros experimentos para ahondar y perfeccionar en las técnicas de canulación.

4.1 Cirujía y Langendorff

Este experimento consiste en extraer y aislar un corazón de *Mus Musculus*, realizar una canulación retrógrada por la arteria aorta y comprobar su viabilidad a través del sistema Landendorff, examinando la supervivencia del órgano para verificar si es apto para proceder a su congelación.

Consideraciones previas

Al trabajar con animales se han de tener en cuenta ciertas precauciones y buenas praxis, tanto para el investigador como para el propio animal:

- Es importante asegurar que el animal no sufra y que no esté consciente. Para ello, una vez sacrificado, se comprueban sus reflejos antes de proseguir.
- Siempre proceder bajo supervisión de un técnico o experto con certificación en manipulación de animales. En este caso, Ramón Risco.
- El tiempo de canulación es crítico, así como su posterior acoplamiento al sistema Langendorff, por lo que es importante tener todo el material y componentes debidamente preparados. Todos los equipos necesarios deberán estar próximos y de rápido acceso
- Este proceso requiere mínimo dos personas, especialmente durante canulación. Recomendable tres para que una tercera facilite material rápidamente y tome mediciones.
- Todo el personal implicado en el procedimiento debe ir con el equipo necesario: Bata de laboratorio y guantes de latex. El pelo debe ir recogido.

Equipo y Materiales

- Aguja de perfusión con jeringuilla [1]
- Heparina [2]
- Hilo de sutura [3]
- Tijeras [4]
- Pinzas [5]
- Corcho [6]
- Placa de Petri 9.5cm de diámetro [7]
- Placa de Petri 14cm de diámetro [8]

- Solución Tyrodes 1L
- Medidor de pH
- Agua para recipiente Langendorff

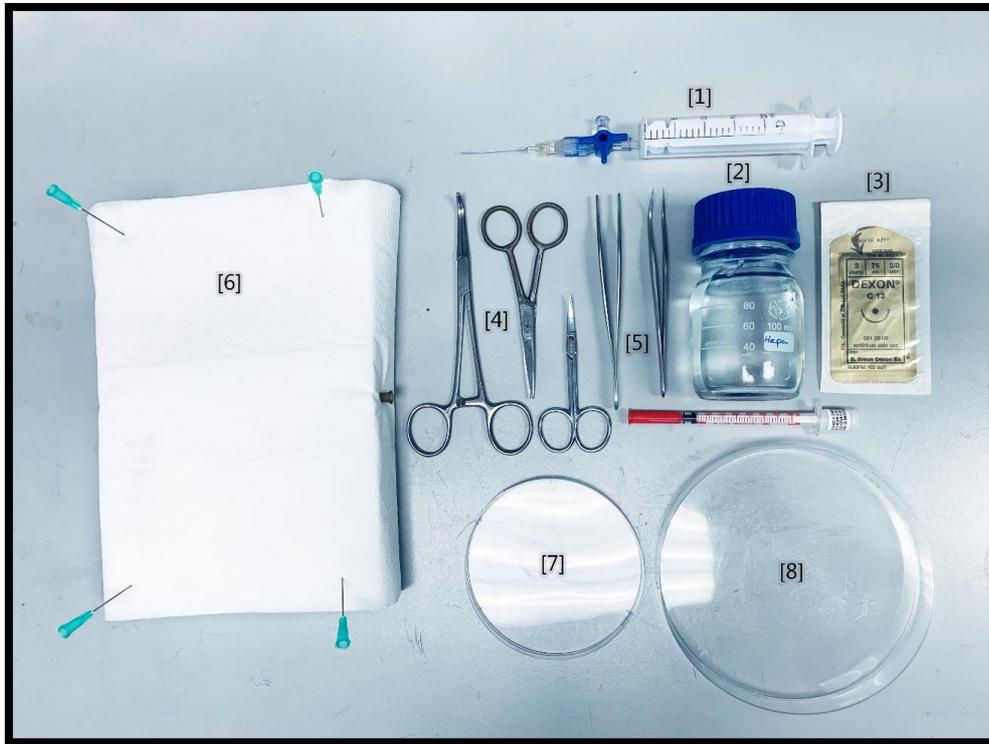


Figura 33. Materiales necesarios para cirugía.

Preparativos

- ✓ Cubrir la placa de Petri de mayor diámetro con hielo picado para mantener el corazón a baja temperatura mientras se manipula sobre ella y guardar en congelador hasta que se necesite.
- ✓ Verter sobre la placa de Petri más pequeña solución Tyrodes (0.5 ml aprox) y guardar en el frigorífico hasta que se requiera.
- ✓ Realizar lazo de doble nudo con el hilo de sutura. Conviene preparar otro adicional.
- ✓ Cubrir con papel absorbente la placa de corcho
- ✓ Verter solución de Tyrodes en vaso de precipitado de 1L.
- ✓ Llenar baño de agua de Langendorff y ajustar temperatura a 39 °C
- ✓ Oxigenar la solución Tyrodes de 1L con carbógeno.
- ✓ Ajustar pH de la solución con carbógeno e Hidróxido de sodio hasta alcanzar pH 7 aprox.
- ✓ Cebear tubos con solución Tyrodes oxigenada mediante jeringuilla.
- ✓ Llenar recipiente de menor tamaño donde irá el corazón con Tyrodes oxigenado
- ✓ Llenar jeringuilla con Tyrodes oxigenada, a través del sistema eliminación de burbujas, y colocar en la bomba de jeringa Harvard.

Cirujía

1. Heparinizar al ratón por vía intraperitoneal 35 minutos antes de operar para prevenir trombos durante la cirugía. Dosis de 0.1ml compuesta por 0.2µL de heparina disueltos en 0.1ml de solución con agua pura (cálculos recogidos en Anexo C).
2. Sacrificar al ejemplar mediante dislocación cervical por persona autorizada. No debe realizarse mediante anestesia por posibles daños cardiovasculares.
3. Extender el ratón sobre el corcho sujetándolo con cuatro agujas en sus extremidades.
4. Sujetar la piel que cubre el esternón con las pinzas de punta roma y tirar, realizar un corte horizontal a la altura del diafragma con unas tijeras pequeñas. Separar el diafragma de las costillas con otro corte. Con ayuda de unas pinzas curvas, levantar el esternón y dejar expuesto el corazón y pulmones.
5. Cortar los vasos sanguíneos para aislar el corazón. Es importante seguir el conducto desde los pulmones para tener localizada la arteria aorta y no cortar esta arteria muy próxima al corazón.
6. Colocar el corazón aislado sobre la placa de Petri pequeña sumergida en Tyrodes. Esta placa debe estar dentro de la placa de diámetro mayor cubierta de hielo picado. El corazón debe tener latidos débiles.



Figura 34. Eliminación de tejido adiposo con pinzas examinando con microscopio.

Canulación

7. Colocar ambas placas bajo el microscopio para localizar la aorta. Recomendable no exponer a mucha luz para evitar calentamientos. Eliminar tejido adiposo y pulmones.



Figura 35. Corazón a vista de microscopio para identificación de arteria aorta.

8. Introducir la aguja a través del lazo del hilo de sutura.
9. Con mucha precaución introducir la aguja por la Aorta, evitando perforar conducto o paredes del corazón. Para localizar con más precisión se puede presionar suavemente con las pinzas sobre el órgano y observar el conducto por donde sale una pequeña cantidad de sangre. Este conducto es la aorta.
10. Una vez introducida la aguja por la aorta, una segunda persona debe tirar de los extremos del hilo para cerrar el nudo en torno a la aguja y fijarla con el corazón.

Conexión al sistema Langendorff

11. Lo más rápidamente posible trasladar a sistema Langendorff. Conectar la aguja fijada al corazón al sistema de perfusión
12. Colocar la aguja con el corazón en el brazo sujetor de manera que el corazón quede sumergido en la solución Tyrodes contenida en el vaso de precipitaciones pequeño.
13. Comenzar perfusión seleccionando el programa en la máquina de perfusión Harvard.
14. Evaluar visualmente los latidos del corazón. Los latidos, si se ha realizado correctamente, deben aparecer al poco tiempo de conectar el corazón y comenzar la perfusión. Se recomienda elevar el órgano fuera del recipiente para observar con más claridad y posteriormente volver a introducirlo en la solución.

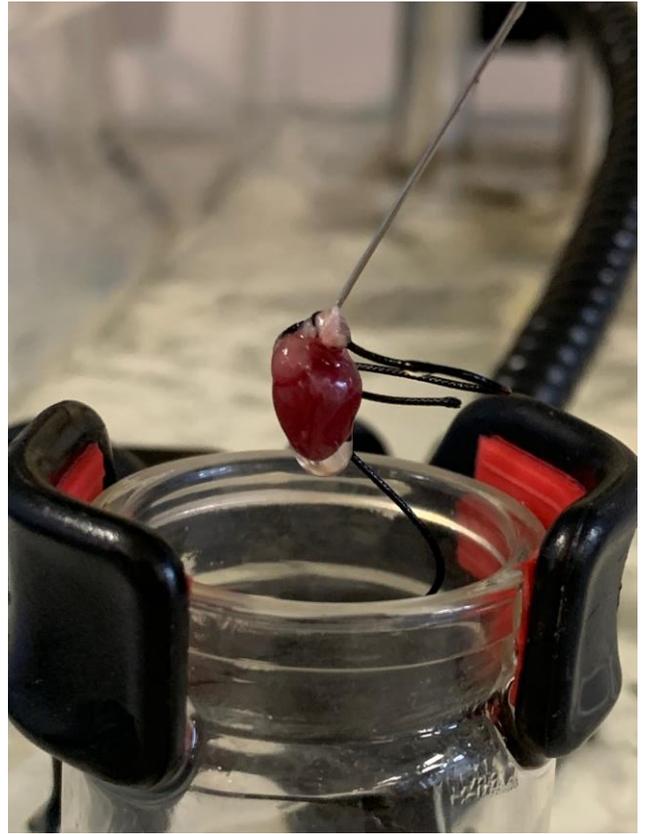
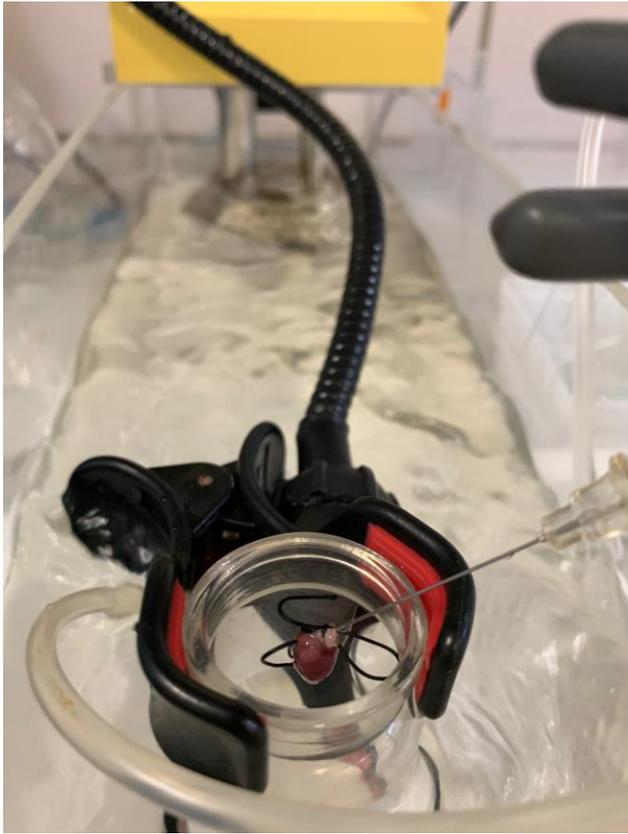


Figura 36. Corazón conectado a sistema Langendorff (izquierda) y ampliado mientras es perfundido (derecha).

4.2 Criopreservación

Posteriormente a la cirugía y comprobación de viabilidad con el Langendorff, se procede a la criopreservación.

En este proceso se utilizará tanto el sistema de perfusión como el BioCool (ver figura 37). El soplador lateral finalmente fue eliminado por enfriar demasiado, lo que desvirtuaba la temperatura deseada.



Figura 37. Configuración sistema de perfusión y sistema de enfriado BioCool para trabajar simultáneamente.

Para ello se debe ir añadiendo progresivamente DMSO a medida que disminuye la temperatura, siguiendo las siguientes gráficas (Figura 38).

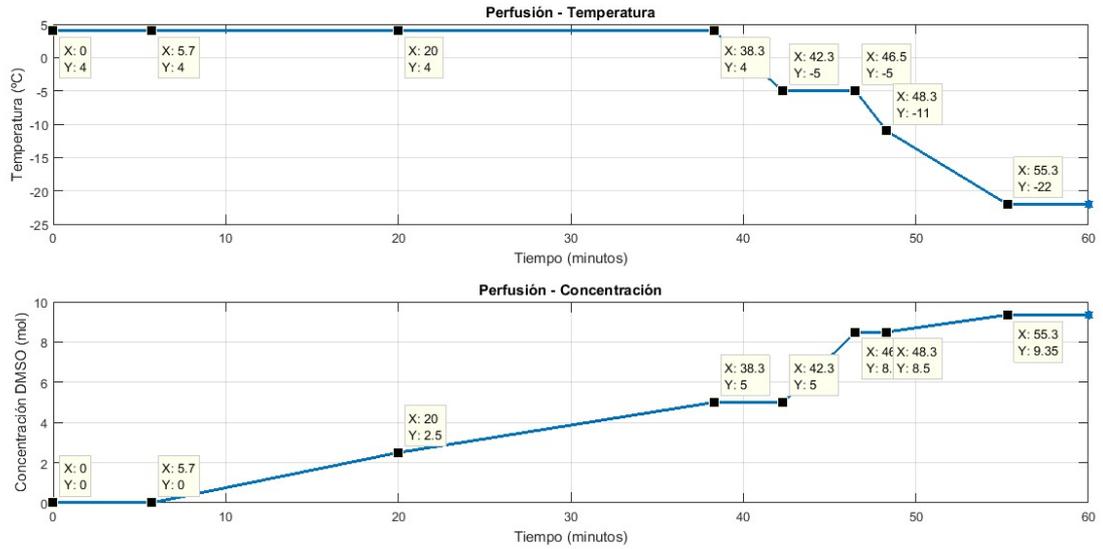


Figura 38. Gráficas temperatura (arriba) y concentración (abajo) frente al tiempo de programa.

Es especialmente importante sincronizar ambas curvas. La curva de Molaridad viene controlada por el software de perfusión antes descrito y la curva de temperatura será ajustada en el BioCool, de manera que se debe programar cada rampa manualmente.

Equipos y material

- DMSO 0.5L
- PBS 0.5L
- Bombas peristálticas
- Pilas Alcalinas 9V
- PC con software conectado a tarjeta de adquisición y ésta a las bombas
- PC con software PicoLog y hardware conectado con tres cables
- Agitador
- Extractor
- Etanol 0.66L y agua destilada 0.33L
- Poliestán troceado
- Voltímetro
- Criotubo para contener al corazón, cuya tapa ha sido atravesada por la aguja previamente

Preparativos

- ✓ Verter DMSO y PBS en sus correspondientes vasos de precipitado
- ✓ Llenar depósito de BioCool con agua destilada (0.33L) y Etanol (0.66L).

- ✓ Cubrir solución de depósito con poliestpán, de forma que quede lo más térmicamente aislado posible
- ✓ Cebarr todos los tubos para evitar bolsas de aire. Tanto el de DMSO como el de PBS mediante voltímetro (recomendado) o jeringuilla
- ✓ Preparar PicoLog. Encender programa. Conectar uno de los cables al recipiente que contendrá al corazón y los otros dos dentro del depósito
- ✓ Encender Bombas y comprobar fuente de alimentación por pilas.
- ✓ Encender PC y abrir el software con el programa de interfaz en archivo “principal.vi”. Introducir los parámetros como se ha explicado anteriormente

Procedimiento

1. Programar con el BioCool la rampa 0 desde la temperatura ambiente hasta alcanzar 4°C. Esto suele tardar unos 10 min aproximadamente.
2. Conectar la aguja con el corazón en un extremo fijado con el hilo de sutura, y en el otro la tapa del criotubo, a la salida del tubo de perfusión en forma de “T”.
3. Acoplar la parte inferior del criotubo a la tapa con la aguja, de forma que el corazón quede dentro del criotubo. Introducir cable de PicoLog antes de cerrar (ver figura 39).

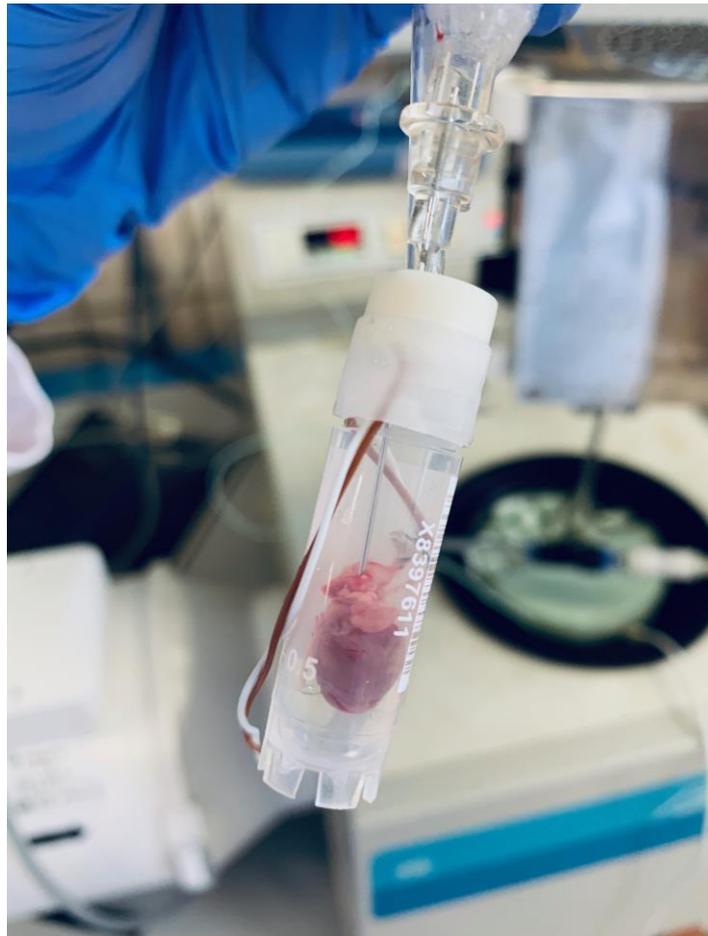


Figura 39. Corazón dentro de criotubo. Cable de PicoLog también introducido dentro del recipiente.

4. Colocar el criotubo sujeto por un brazo de forma que este sumergido completamente debajo de los trozos de poliestpán.



Figura 40. El criotubo con el corazón debe estar completamente sumergido.

5. Iniciar criopreservación. Ejecutar programa de perfusión cuando se alcancen los 4°C de la rampa 0 (el BioCool emitirá un sonido de alarma al alcanzar esta temperatura).
6. Programar y ejecutar la rampa 2 en el minuto 46.5 (ver tabla 6).

	Tinicial (°C)	Rampa (°C/min)	Tfinal (°C)	Hold (min)	Comienzo (min)
Rampa 0	Ambiente	Máxima (5)	4	38	-10
Rampa 1	4	2.3	-5	4.2	38
Rampa 2	-5	2	-22	4.7	46.5

Tabla 6. Programa de curvas de enfriamientos para BioCool.

7. Mientras dura el programa, comprobar medidas de temperatura en la pantalla con PicoLog.
8. A los 60 min de iniciarse, concluye el programa de perfusión.
9. Guardar datos de temperaturas extraídos con PicoLog.
10. Extraer aguja del criotubo y guardar en congelador en la caja de policarbonato congelable para criotubos.



Figura 41. Corazón dentro de criotubo tras completar protocolo de congelación.

5 RESULTADOS EXPERIMENTALES

En esta sección se presentan los experimentos realizados y su análisis. Un conjunto de 19 experimentos, de los cuales 4 han sido criopreservados con éxito llevando a cabo el protocolo de criocongelación completa después de su evaluación en Langendorff. Los 15 restantes han consistido en extracción y Langendorff. Cabe destacar que un factor muy crítico es el tiempo de canulación, por lo tanto ha sido conveniente practicar para alcanzar las destrezas necesarias para reducir este tiempo. En la siguiente tabla se recogen los datos de los experimentos, marcados con el icono ❄ los criopreservados completamente.

Nº	Fecha	Cepa	Edad	Sexo	Peso (g)	Canulación	Perfusión	Latido
1	25/04/19	-	-	-	-	Sí	Sí	No
2	02/05/19	-	-	♀	-	Sí	Sí	No
3	14/05/19	FVB	5 semanas	♀	-	Sí	No	No
4	15/05/19	FVB	5 semanas	♀	-	Sí	No	No
5	17/05/19	FVB	5 semanas	♀	26.04	Sí	Sí	No
6	20/05/19	TS1CJE	11 meses	♂	40.70	30'	Sí	No
7	21/05/19	TS1CJE	11 meses	♂	41.81	7'30"	Sí	No
8	21/05/19	TS1CJE	11 meses	♂	44.21	11'07"	Sí	Sí
9	04/06/19	FVB	7 meses	♂	32.55	8'40"	Sí	Sí
10	05/06/19	FVB	7 meses	♂	31	13'59"	Sí	No
11	07/06/19	FVB	7 meses	♂	30.41	10'	Sí	No
12	12/06/19	FVB	7 meses	♂	28.07	18'	Sí	No
13 ❄	13/06/19	FVB	7 meses	♂	38	7'	Sí	No
14	14/06/19	FVB	7 meses	♂	31.18	13'57"	Sí	No
15 ❄	17/06/19	CD1	8 meses	♂	41.44	8'	Sí	Sí
16 ❄	02/07/19	C57C3H	11 meses	♂	31.50	5'15"	Sí	Sí
17 ❄	03/07/19	C57C3H	11 meses	♂	29.46	1'55"	Sí	Sí
18	05/07/19	C57C3H	11 meses	♂	36.64	5'45"	Sí	Sí
19	05/07/19	CD1	8 meses	♂	40.35	4'30"	Sí	No

Tabla 7. Datos experimentales con ratones.

Los experimentos han sido llevados a cabo por el equipo formado por Enrique, Beatriz y José Manuel. El encargado de sacrificar al ejemplar y aislar el corazón ha sido Enrique con ayuda secundaria de Beatriz y José Manuel. Beatriz y José Manuel intervinieron en la preparación de los equipos y materiales y en proporcionar estos materiales cuando fueron requeridos durante la canulación. En la preparación de los sistemas, funcionamiento y caracterización también participó Víctor. Durante la canulación mientras Enrique introduce la aguja en la aorta, José Manuel o Beatriz fijan el corazón con el hilo de sutura. Esto último puede hacerse o bien manualmente o bien con unas pinzas. José Manuel ha sido el encargado del transporte de ratones desde el Hospital Macarena al laboratorio ya que éstos solo pueden ser transportados en coche. Beatriz y Enrique han tratado directamente con la responsable del animalario, Itziar. José Manuel no ha podido participar directamente en los experimentos 1, 11, 17 y 18.

Langendorff

- Experimentos del 1 al 7. Han sido en su mayoría procedimientos para adquirir la destreza necesaria, ya que especialmente la canulación requiere mucha práctica. Los tiempos de canulación han sido demasiado elevados, superiores a los 15 minutos, por lo tanto el corazón no latió en ninguno de ellos. La cepa FVB con 5 semanas tiene un corazón demasiado pequeño.
- Experimento 8: Tras 10 minutos de perfusión en Langendorff sin latir, el corazón se salió accidentalmente de la aguja y comenzó a latir unos 20 segundos en el guante. Sorprende unos latidos leves con un tiempo de canulación tan elevado (11'07"). A partir de aquí se evidenció que no le llegaba suficiente oxígeno y se cambió el hasta entonces oxigenador de acuario común por carbógeno. Se comprobó que la cepa TS1CJE es más adecuada, siendo este ejemplar el más grande con 44.20g.
- Experimento 9: Latidos débiles durante 20 segundos en el corazón completo. A continuación dejó de latir y de perfundir. Posible error debido a fugas en el sistema de perfusión. Tiempo de canulación sigue siendo elevado (8'40"). Ver Vídeo en Drive.

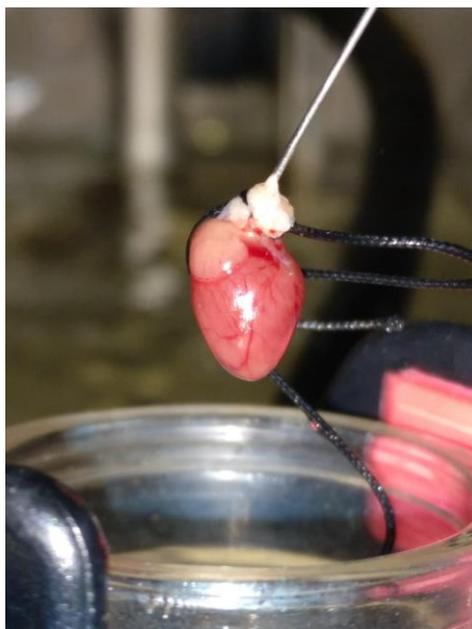


Figura 42. Corazón suspendido mientras se perfunde.

- Experimento 10: Latidos continuados durante 40 segundos en aurícula derecha. Las fugas han sido resueltas con epoxy. Posible error en canulación debido al tiempo excesivo (14').
- Experimento 11: Latidos prácticamente imperceptibles en aurícula. Posible error debido a trombos. Se comenzó a heparinizar, tiempo aproximado 4 minutos antes del sacrificio. Error solventado en los siguientes experimentos aumentando el tiempo de espera tras heparinización a 35 minutos.
- Experimento 12: Error debido a tiempo de canulación excesivamente alto (18'). El hilo se fijó a la aguja de forma errónea y se perdió mucho tiempo. Se mejoraron las técnicas de canulación añadiendo hilo de sutura de emergencia.
- Experimento 13: Error debido a bombas de perfusión con fugas en la aguja. Se añade jeringa de emergencia. A partir de este experimento se cambia la bomba peristáltica por sistema de precisión de jeringa Harvard.
- Experimento 14: Corazón con dificultades para canular, gran cantidad de tejido adiposo y graso. Excesivo tiempo de canulación (14'), por consiguiente no latió el órgano. Definitivamente la cepa FVB no es la más adecuada.
- Experimento 15: Espasmos en el corazón, la canulación se realizó por uno de los vasos salientes del cayó de la aorta. Posible solución dedicar más tiempo a limpiar el corazón durante canulación. Corazón muy voluminoso, ejemplar CD1 muy válido
- Experimento 16: Corazón latió con éxito. Cirujía con normalidad y canulación en tiempo más breve hasta la fecha (5'15"). Latidos en el corazón completo durante más de 10 minutos, tanto corazón sumergido en Tyroe como suspendido sobre él. [Ver video en Drive.](#)

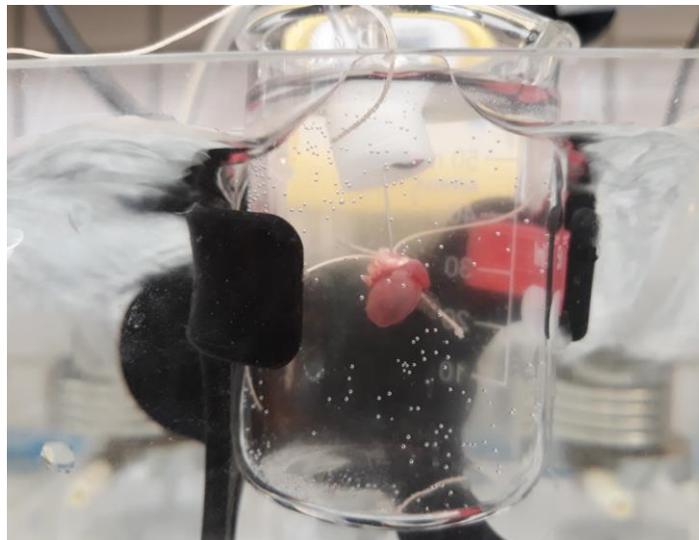


Figura 43. Perfusión de corazón sumergido en solución Tyrodes.

- Experimento 17: Se observaron latidos vigorosos en el corazón completo durante 10 minutos, siendo las palpitations más energéticas hasta la fecha. Puede ser debido al bajo tiempo de canulación. Los latidos se fueron debilitando lentamente, y al subir la temperatura del baño volvió a latir correctamente. [Ver video en Drive.](#)
- Experimento 18: Latidos continuados durante 5 minutos. El corazón se desprende de la aguja y cae al baño de agua. Descartamos su supervivencia. Tiempo de canulación correcto y cepa adecuada, los híbridos C57C3H presentan un corazón muy limpio y más fácil de canular. [Ver video en Drive.](#)

- Experimento 19: No se consiguen latidos debido a error en canulación. El tiempo fue adecuado, pero se canuló incorrectamente y hubo problemas con el hilo de sutura que se cerró indebidamente.

Criopreservación

- ❄ Experimento 13: Se realizó el protocolo de criocongelación con perfusión y BioCool, pese a estar el corazón inerte. Ambos sistemas se adecuaron perfectamente en los tiempos teóricos establecidos. Se observa que el líquido en el interior del criotubo quedó también congelado (Figura 44), con lo cual puede haber dañado al órgano. Se estudiarán procedimientos para evitar esto.



Figura 44: Corazón congelado tras protocolo de criopreservación experimento 13.

- ❄ Experimento 15: Se realizó el protocolo de criocongelación con perfusión y BioCool con éxito. Las temperaturas medidas con el PicoLog se presentan en la siguiente gráfica (figura 45). Se observa que la temperatura dentro del criotubo desciende a temperatura brusca (canal 2). El líquido en el interior del recipiente quedó también congelado al igual que en el experimento anterior. Para solventar esto se añadirá DMSO disuelto al 10% en el interior criotubo.

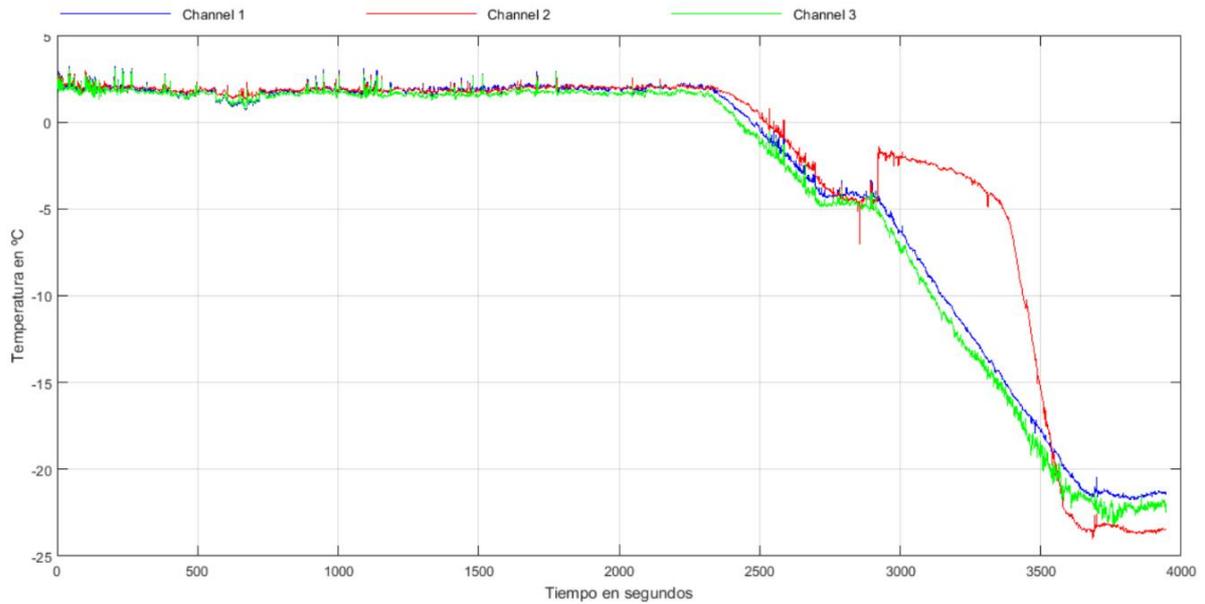


Figura 45. Gráfica de muestras de temperaturas tomadas por Picolog experimento 15. Canal 1 y 3 temperatura procedente de la solución de Agua y Etanol en el interior del BioCool. Canal 2 dentro del criotubo.

- ❄ Experimento 16: Corazón congelado con éxito, sin cristales en el criotubo ya que la solución alrededor del órgano quedó en estado líquido (Figura 47), lo que indica que el corazón y alrededores están correctamente protegidos. Problema de descenso de temperatura en el recipiente del corazón solventado por añadir solución de DMSO al 10%.

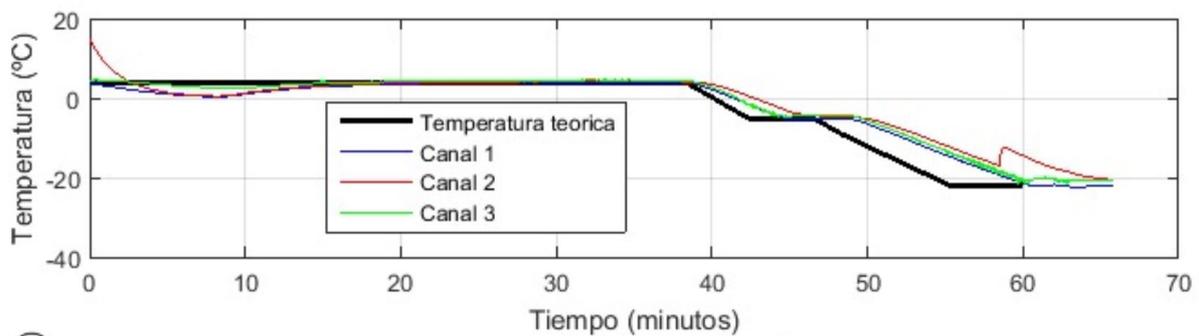


Figura 46. Gráfica de temperaturas tomadas por Picolog frente a temperatura teórica experimento 16. Canal 1 y 3 de temperatura procedente de la solución de Agua y Etanol en el interior del BioCool. Canal 2 dentro del criotubo.

- ❄ Experimento 17: Corazón congelado con éxito, sin cristales en el criotubo. Esta vez no se llenó el recipiente previamente con DMSO para analizar la solución que salía del corazón. Se midió el Brix de la muestra, un 15%, que en concentración corresponde 1.8mol de DMSO. El resto de concentración fue absorbido por el corazón.

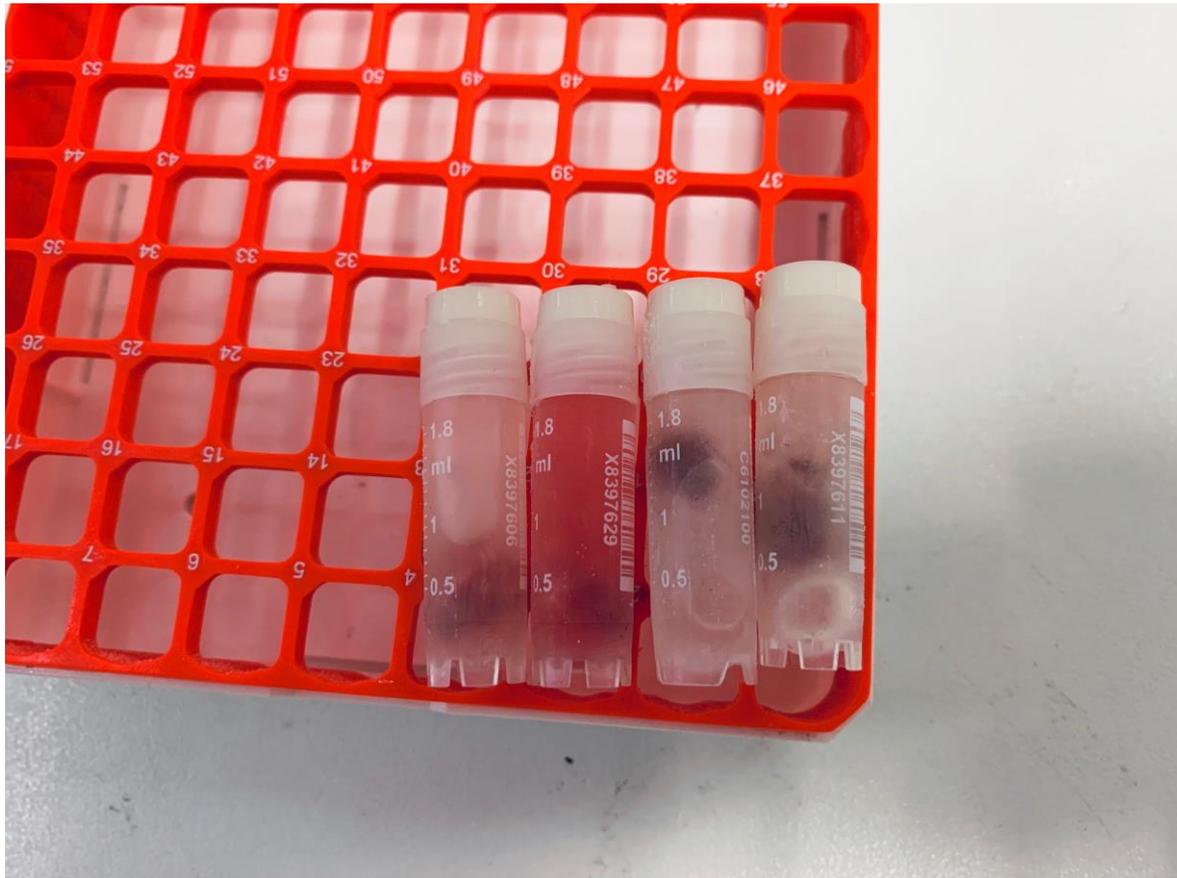


Figura 47. De derecha a izquierda el resultado de la criopreservación de los Experimentos 13,15,16,17. Puede observarse como el líquido interior está congelado en los experimentos 13 y 15, con posible cristalización y daños en el órgano. Con una solución del 10% DMSO en el interior previa al protocolo, la solución no cristaliza y el órgano queda más protegido (experimento 16). El líquido en el interior del criotubo en el experimento 17 es la propia solución que drena el corazón, estando éste vacío al comienzo del protocolo.

6 CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

De las cinco **cepas** distintas con las que se ha trabajado, la más óptima ha resultado ser la cepa CD1 y la cepa híbrida C57C3H. La primera debido a que es la de mayor tamaño en ratones de laboratorio y permite canular mejor con un corazón más grande. La segunda por la limpieza del corazón, presenta poca grasa y poco tejido adiposo, lo que permite localizar mejor la aorta y canular en menos tiempo.

El **tiempo de canulación** es crítico. Para disminuir el tiempo de canulación es necesario adquirir habilidad a base de práctica, pues hay que introducir una aguja por un conducto de tamaño muy pequeño y no fácilmente reconocible. Además requiere otra persona que con mucha precaución cierre el hilo adecuadamente en el preciso momento, un pequeño error aquí ha supuesto el fallo en varios experimentos. Se ha conseguido reducir el tiempo de canulación desde lo más de 30 minutos iniciales a menos de 5 minutos en los últimos experimentos. Destacar la gran habilidad del miembro del equipo Enrique Alcalá como principal responsable de la canulación de la mayoría de los ejemplares. El tiempo de canulación máximo para conseguir latidos débiles o parciales ha sido de 11'07". El tiempo máximo de canulación para conseguir latidos completos y vigorosos en todo el corazón ha sido de 5'45".

La administración de **heparina** es muy importante. La dosis necesaria para cada ejemplar se ha calculado en el Anexo C. Se comenzó a heparinizar 35 minutos o más antes del sacrificio y se observó notablemente la ausencia de trombos a partir del experimento 12.

Las fugas se evitaron en los experimentos con **Langendorff** a partir del experimento 14 con la incorporación de la **bomba de jeringa** Harvard de alta precisión como sustitución de la bomba peristáltica. Hasta entonces la aparición de fugas debido a la gran cantidad de conexiones entre cables y luers ha supuesto fallos en los experimentos. Además esta bomba de precisión permite un mayor caudal de perfusión. Se ha usado un **caudal** de 2.1 ml/min, sin llegar a los 2.8 ml/min que podrían dañar al órgano frente a los 1.27 ml/min que perfundía como máximo la anterior bomba.

La incorporación de **carbógeno** para oxigenar la solución Tyrode también ha sido una importante mejora, pues en algunos experimentos anteriores el corazón sólo ha latido cuando se ha desprendido de la aguja, señal de que no se le introducía la cantidad de oxígeno adecuada. A partir del experimento 13 que se incorporó el carbógeno se consiguió que latieran 4 de los 7 corazones en los experimentos restantes. Los otros tres no latieron por errores en canulación.

El **BioCool** reproduce con bastante exactitud las curvas de enfriamiento, adecuándose a los tiempos de programa establecidos, aunque hay que programar manualmente las rampas. Esto se ha comprobado con PicoLog y con un termómetro externo. El problema de calentamiento interno del BioCool ha sido solventado añadiendo un extractor en su parte posterior.

El **sistema de perfusión** sigue adecuadamente las curvas de concentración para introducir gradualmente el anticongelante, salvo un pequeño salto al inicio del funcionamiento de la bomba de DMSO, debido a que las bombas peristálticas utilizadas tienen una zona muerta hasta que reciben 0.7V. Esto se ha medido experimentalmente con un refractómetro.

Para evitar la **formación de cristales** en el líquido que sumerge al corazón, no es conveniente llenar el criotubo con Tyrode. En su lugar, se provó la efectividad de llenarlo con solución al 10% de DMSO (experimento 16) y vacío inicialmente (experimento 17). Ambas opciones resultaron apreciablemente satisfactorias, pues el líquido final no había congelado y el corazón quedó más protegido (ver Figura 47).

Este trabajo ha sido un paso más hacia el trasplante de órganos humanos, pero aún queda mucho por investigar y descubrir a corto y largo plazo. Es muy interesante la parte de descongelación con distintas técnicas para comprobar que han sido efectivamente criopreservados los órganos con éxito.

Se puede profundizar y ampliar este proceso de criopreservación. Una posibilidad es depurar el software utilizado, permitiendo experimentar con distintos crioprotectores o adaptar el software para permitir trabajar en otro sistema operativo distinto al Windows XP, siendo esto un posible problema dada su antigüedad. También se puede mejorar el sistema de perfusión para evitar la zona muerta de la bomba de DMSO, bien utilizando otras bombas peristálticas o bien estudiando la posibilidad de utilizar concentraciones mixtas. Otra posibilidad es estudiar experimentos con distintas curvas de concentración a fin de encontrar la más óptima. Puede también incorporarse el análisis de la actividad eléctrica del corazón latiendo en vacío mediante electrocardiograma.

ANEXO A: INSTALACIÓN SOFTWARE Y CONFIGURACIÓN TARJETA DE ADQUISICIÓN

Se necesita PC con Windows XP. Todos los archivos necesarios están en el Drive. Dentro de él hay 5 carpetas y un archivo de instalación. Bajar todos los archivos a un disco local.

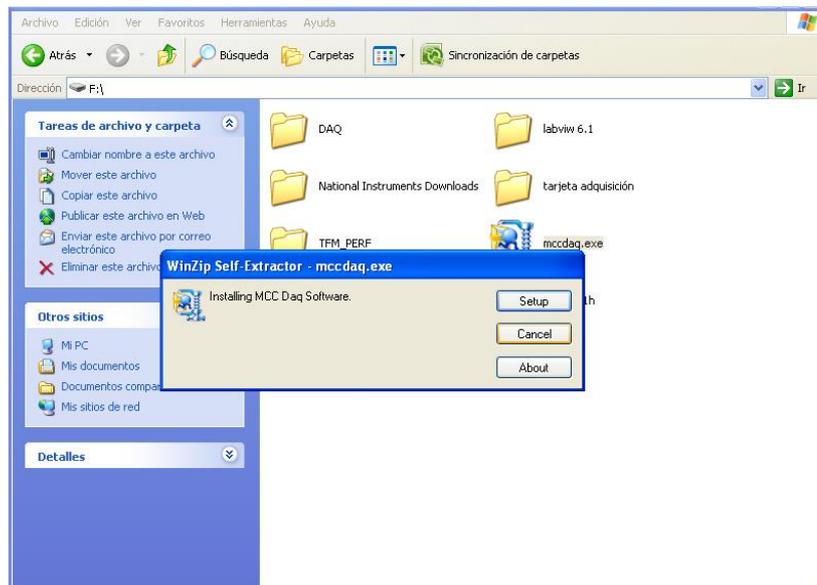
<https://drive.google.com/drive/folders/1b0VdH5nyybVZ7U6cK2sI8mcyFEbdWcsl>

1. Copiar la carpeta “Universal Libery” que se encuentra dentro de “LABView 6.1” y copiarla en la siguiente ruta en el disco local:

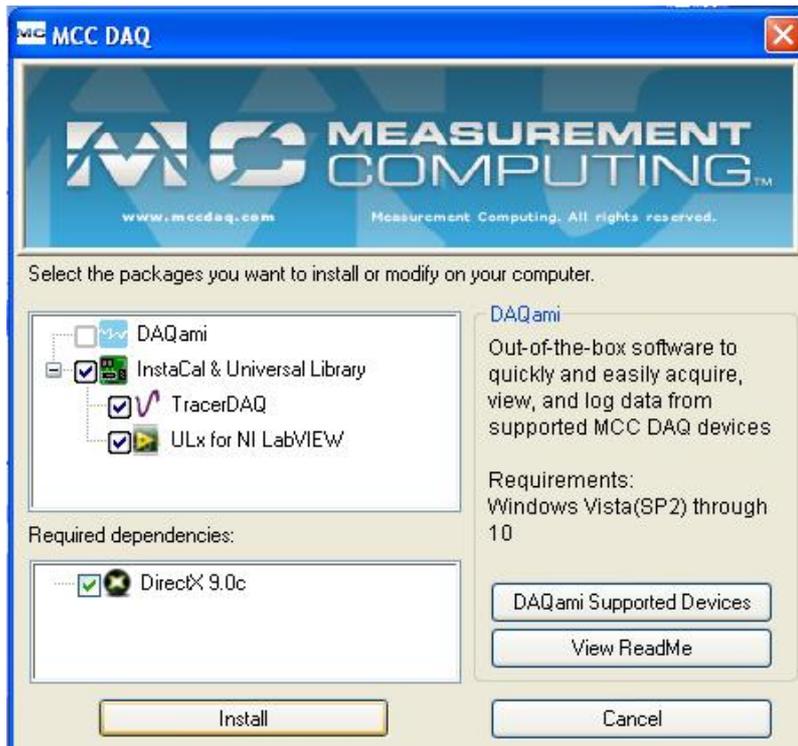
C:\Archivos de programa\National Instruments\ LabVIEW 6.1\ menus\Universal Library

Con esto se tienen todo el software de LABview. No es necesario instalación.

2. Instalación de los drivers de la tarjeta. Instalar el archivo “mccdaq” abriendo el ejecutable. Se abrirá la siguiente ventana. Seleccionar “Setup”.

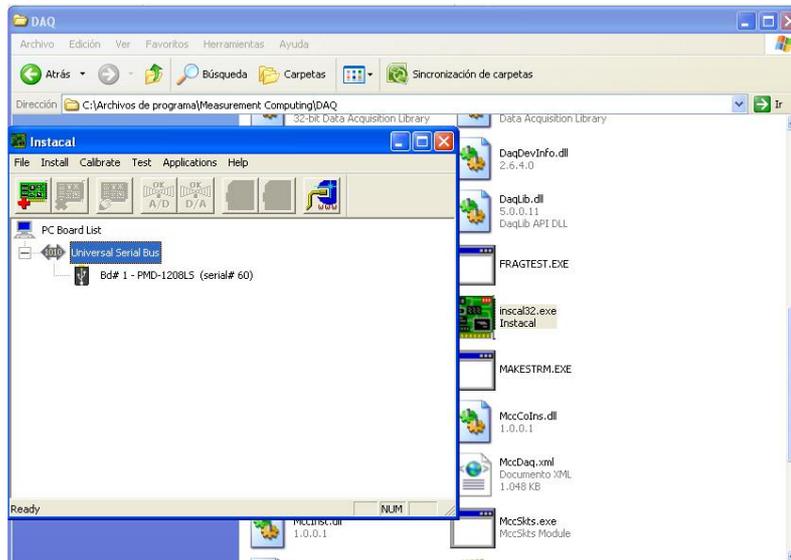


Cuando se hayan cargado los archivos, pulsar “Install”.

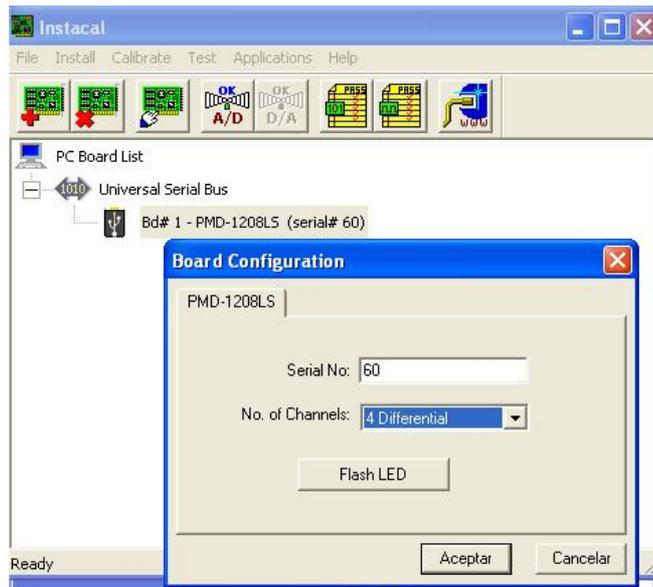


3 Copiar la carpeta “DAQ” y pegarla en el directorio del disco duro
 C:\Archivos de programa\Measurement Computing\DAQ

4. Dentro de la carpeta DAQ, abrir el archivo “inscal32.exe”. Conectar la tarjeta mediante USB al PC y el programa la identifica.

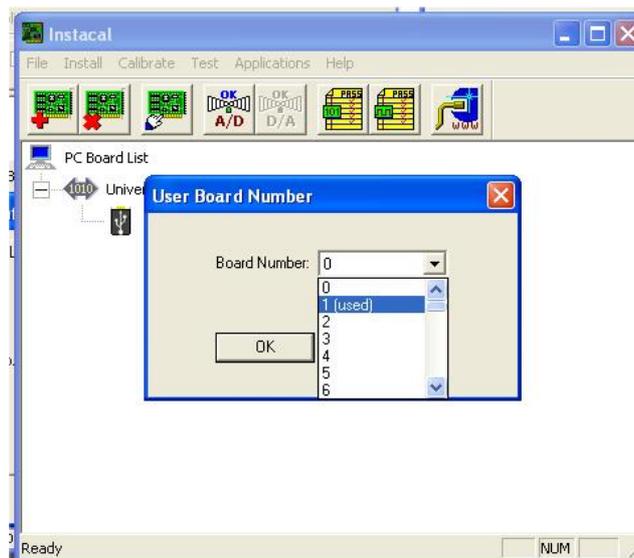


5. Seleccionar la tarjeta con doble click y saldrá el menú de configuración. Escribir los siguientes datos:
 Serial No: 60
 No. Of Channels: 4 Differential.
 Pulsar “Aceptar”.



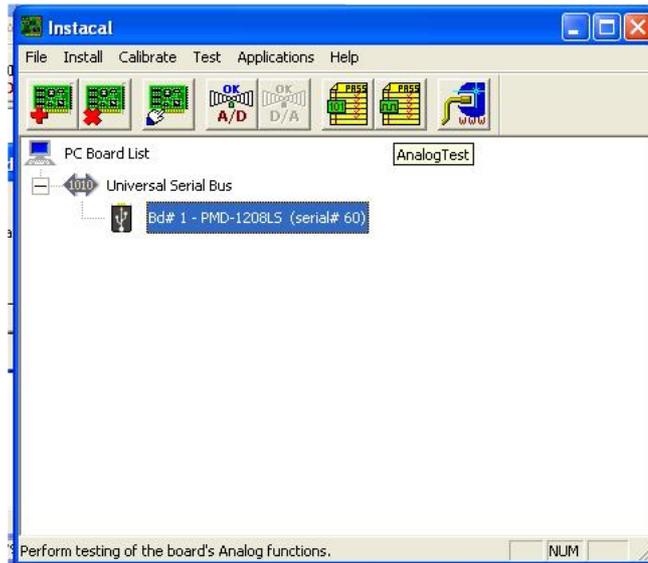
A continuación, click derecho sobre la tarjeta y pulsar en “Change Board”.

Seleccionar Board Number: 1. Pulsar OK

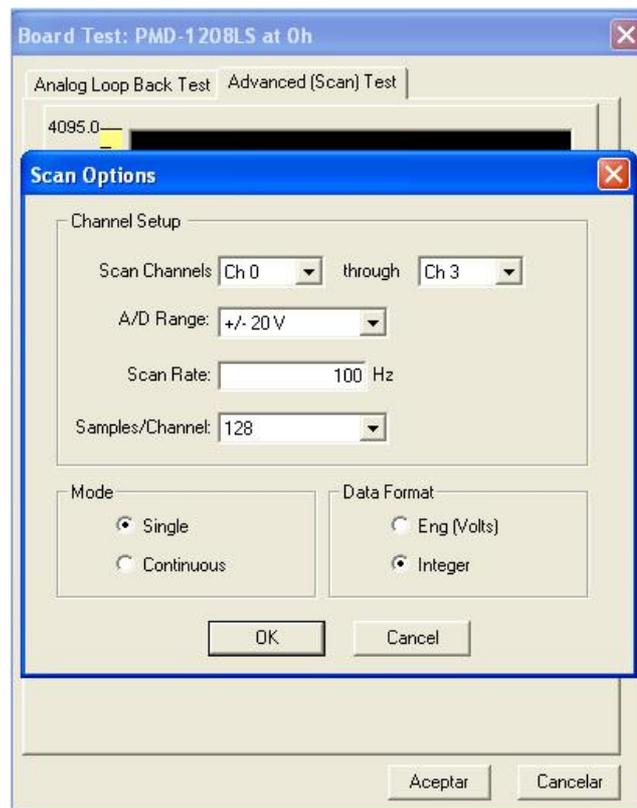


6. Para comprobar que está bien conectada se realiza un Test analógico.

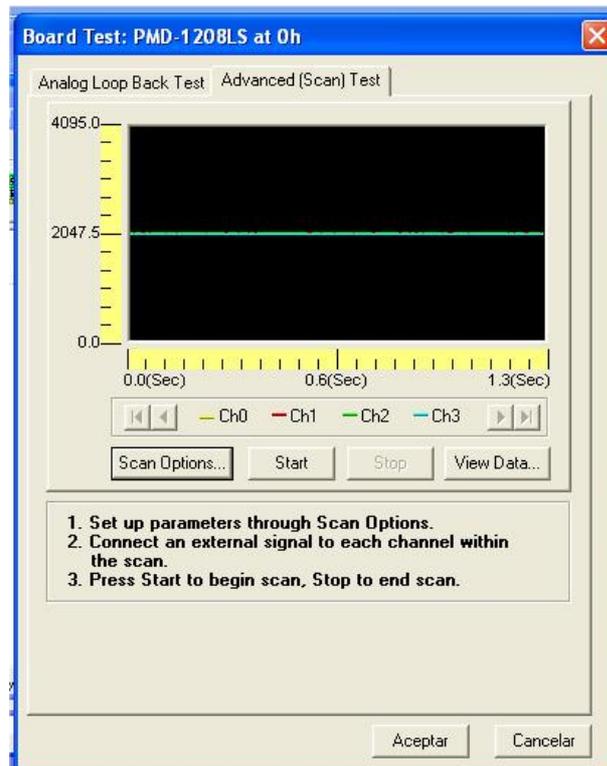
Seleccionar “Analog Test”.



Abrir "Scan Options". Dejar los valores tal como están y seleccionar "OK".



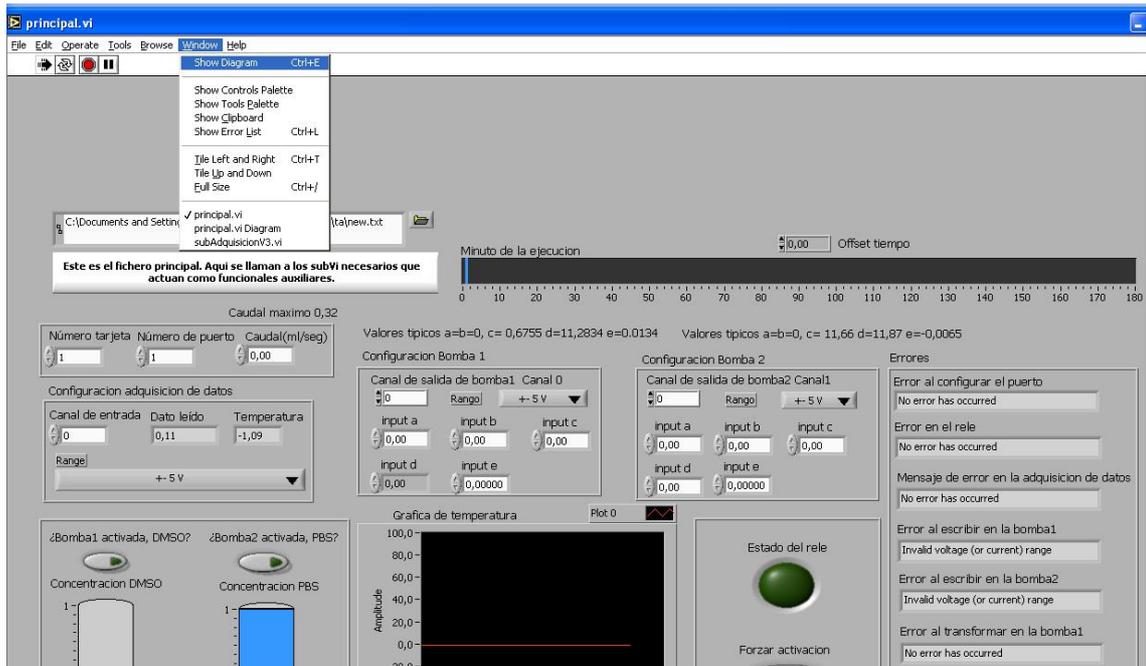
Pulsar "Start" y a continuación "View Data".



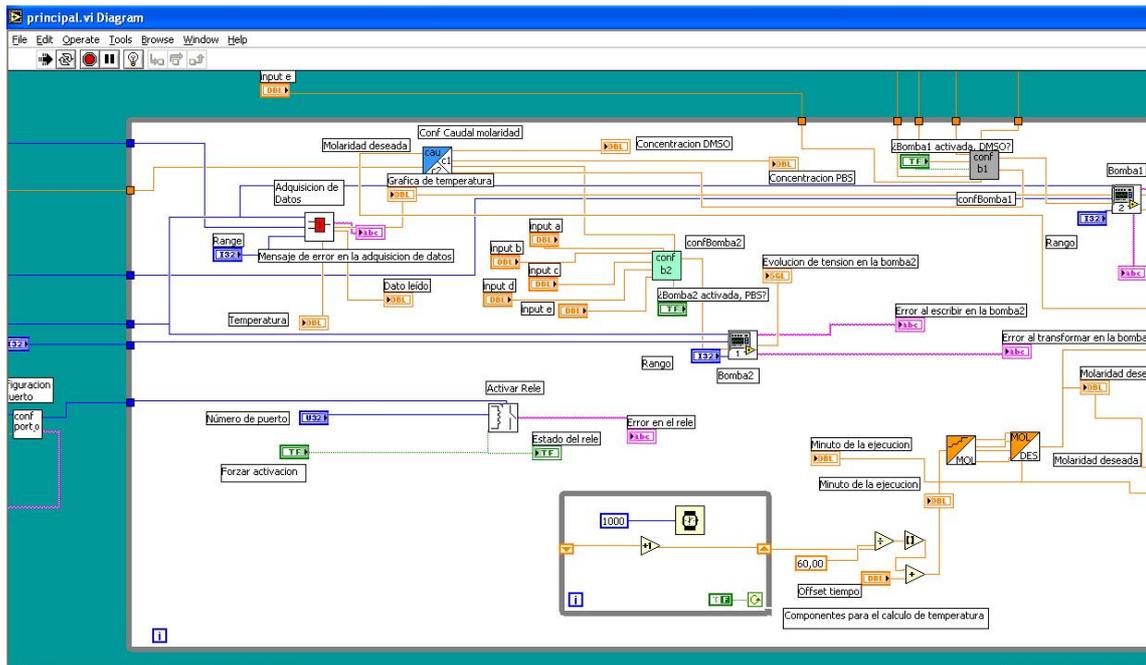
En View data saldrá una tabla con valores similares a los siguientes:

Scan Info	Time(sec)	Chan 0	Chan 1	Chan 2	Chan 3
122	1.2100	2059.000	2048.000	2048.000	2047.000
123	1.2200	2059.000	2048.000	2048.000	2047.000
124	1.2300	2059.000	2048.000	2048.000	2047.000
125	1.2400	2059.000	2048.000	2048.000	2047.000
126	1.2500	2059.000	2048.000	2049.000	2047.000
127	1.2600	2059.000	2048.000	2048.000	2047.000
128	1.2700	2059.000	2048.000	2049.000	2047.000
Mean		2059.008	2047.945	2047.945	2047.000
Var		0.008	0.099	0.430	0.000
Std Dev		0.088	0.315	0.656	0.000
Avg Dev		0.016	0.106	0.444	0.000

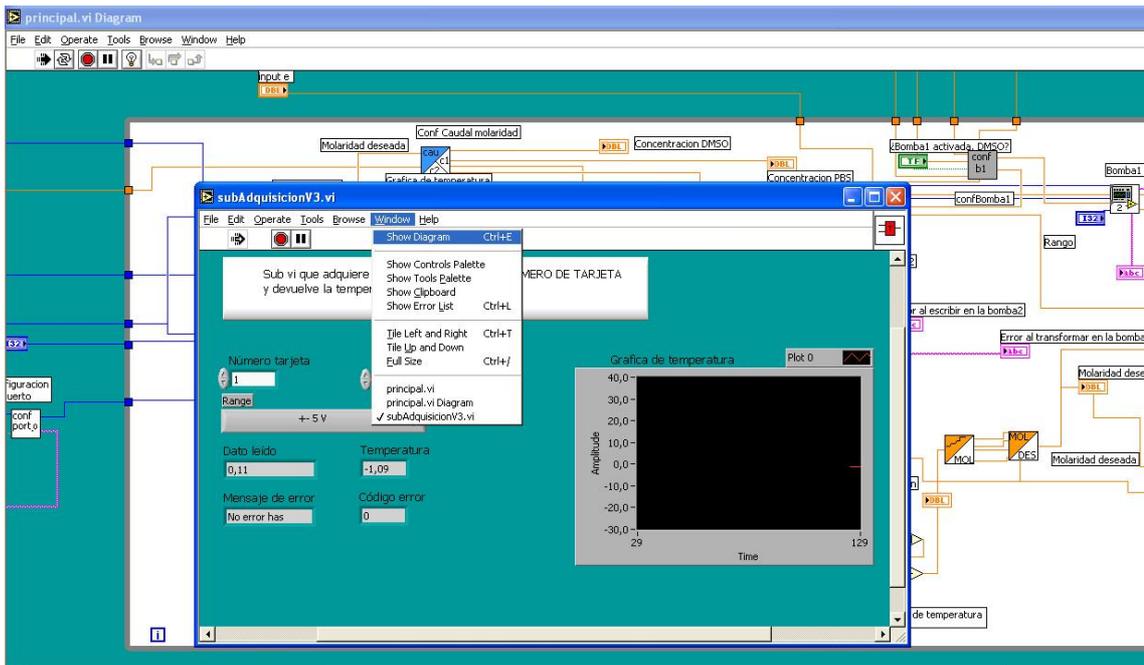
7. Comprobación que se ha configurado y conectado correctamente. Abrir el archivo de LABView "principal.vi". Aparecerá una interfaz de usuario. Seleccionar la ruta .txt donde se escribirán los datos. Seleccionar "Window -> Show Diagram".



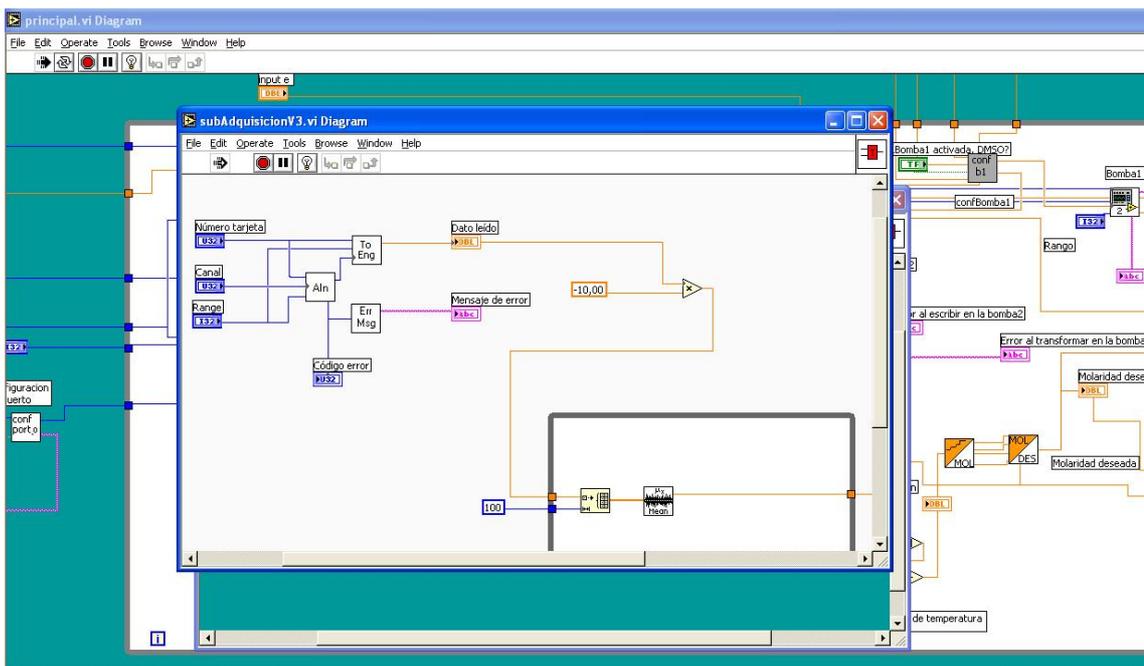
Dentro del panel de Diagrama, buscar el bloque Adquisición de Datos y hacer doble click.



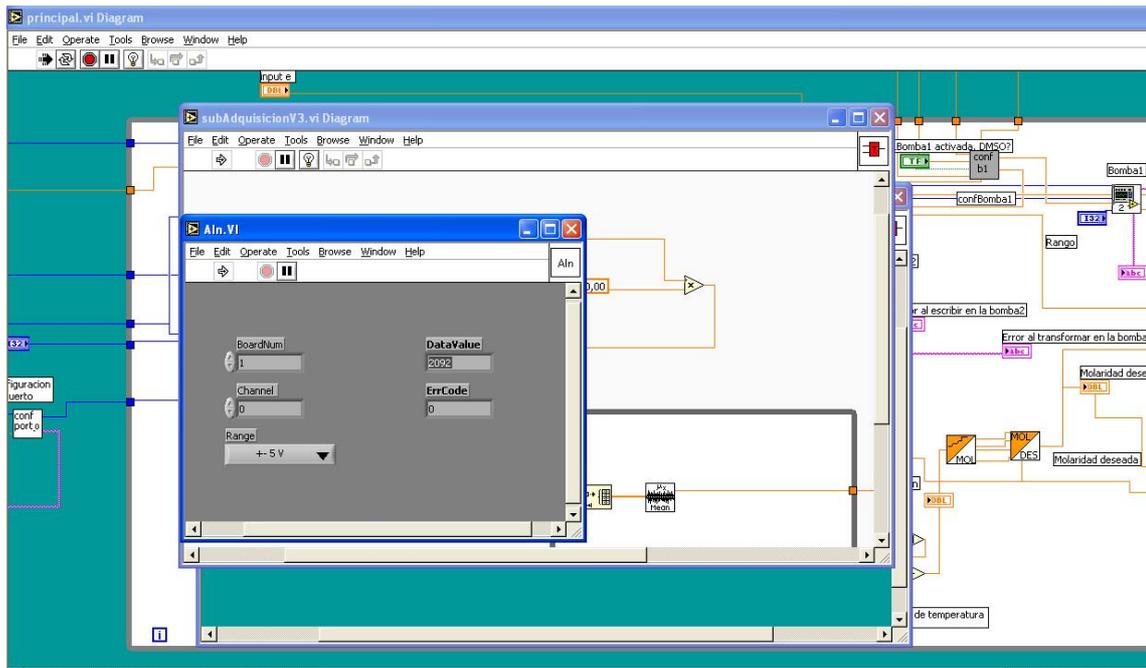
Dentro de este bloque, llamado "subAdquisicionV3.vi" seleccionar "Window/Show diagram".



En el diagrama hacer doble click en el módulo “Ain”.



Se mostrará el siguiente panel, donde se comprueba en la casilla “DataValue” debe tener un valor similar al de la tarjeta.



Physical and biological aspects of renal vitrification

Gregory M. Fahy,* Brian Wowk, Roberto Pagotan, Alice Chang, John Phan, Bruce Thomson and Laura Phan

21st Century Medicine, Inc.; Fontana, CA USA

Keywords: biobanking, cryopreserved, cryoprotective agents, ice-free cryopreservation, organ preservation, organ banking, long-term organ preservation, vitreous, vitrification solutions

Cryopreservation would potentially very much facilitate the inventory control and distribution of laboratory-produced organs and tissues. Although simple freezing methods are effective for many simple tissues, bioartificial organs and complex tissue constructs may be unacceptably altered by ice formation and dissolution. Vitrification, in which the liquids in a living system are converted into the glassy state at low temperatures, provides a potential alternative to freezing that can in principle avoid ice formation altogether. The present report provides a brief overview of the problem of renal vitrification. We report here the detailed case history of a rabbit kidney that survived vitrification and subsequent transplantation, a case that demonstrates both the fundamental feasibility of complex system vitrification and the obstacles that must still be overcome, of which the chief one in the case of the kidney is adequate distribution of cryoprotectant to the renal medulla. Medullary equilibration can be monitored by monitoring urine concentrations of cryoprotectant, and urine flow rate correlates with vitrification solution viscosity and the speed of equilibration. By taking these factors into account and by using higher perfusion pressures as per the case of the kidney that survived vitrification, it is becoming possible to design protocols for equilibrating kidneys that protect against both devitrification and excessive cryoprotectant toxicity.

Introduction

The long-term banking of human organs or their engineered substitutes¹ for subsequent transplantation is a long-sought²⁻⁴ and important^{1,2,5-11} goal. Given that the full demand for vital and non-vital organ replacements may be over one million per year in the United States alone, supply chain management issues may become more and more critical as the success of laboratory construct creation increases.¹ Contemplating the possible development of emergency organ replacements with generic allografts without the availability of organ biobanking is a bit like trying to envision attempting to distribute human blood with a 24-hour shelf life limitation.

Biobanking of organ and tissue replacements has not been widely discussed perhaps in part because the technology for doing this without damage to the graft is not in hand. Although freezing can achieve limited success for some organs,^{7,9,12-15} freezing of the heart, liver or kidney has not been accomplished with subsequent life support function following cooling to temperatures low enough for long-term preservation, despite work on this problem dating back to the 1950s.^{3,6} Kidneys and hearts have been the most widely studied organs, but neither has been reproducibly recovered after freezing to temperatures lower than about -20°C,¹⁶⁻²⁰ evidently due at least in part to mechanical damage from ice itself,²¹⁻²⁴ although in the case of kidneys at least, sporadic survival has sometimes been claimed after freezing to about -40 to -80°C.²⁵⁻²⁸

Some time ago, one of us (GMF), after witnessing transplanted dog kidneys turning deep blue and passing urine that resembled

whole blood after freezing to only -30°C with 3 M glycerol (unpublished observations using the same methodology²⁹ used for rabbit kidney freezing), proposed a way of cooling organs to cryogenic temperatures without incurring the consequences of ice formation.³⁰⁻³³ This is possible because high concentrations of cryoprotective agents reduce the likelihood and the speed of ice crystal formation, and sufficiently high concentrations can prevent ice formation completely, even at the low cooling and warming rates that are applicable to organ-sized objects.^{1,34-36} Cooling an ice-free biological system to a low enough temperature eventually results in a transition from a mobile fluid state to a molecularly arrested glassy state (this transition being referred to as vitrification, or the glass transition). A glass is essentially a liquid that cannot flow over most time scales of interest to the observer,³⁶ and a vitrified biological system can theoretically be stored for virtually any desired length of time due to the extreme slowing of all diffusion-driven change below the glass transition temperature³⁷ (T_g). "Vitrification solutions"³⁸ are solutions of cryoprotective agents that are sufficiently concentrated to enable vitrification or virtual vitrification of a living system at the cooling rates employed for that purpose.

Major advances in vitrification technology have recently been reported,^{6,39} and it is now possible to vitrify entire organs,⁶ but to do so with full recovery of viability after transplantation is still difficult due in large part to devitrification. Devitrification is ice formation during rewarming, and it arises because ice nuclei, which form initially only at temperatures too low for appreciable crystal growth,^{36,40} encounter temperatures during warming that maximize ice growth.^{40,41} To date, small ovaries,⁴²⁻⁴⁵ blood

*Correspondence to: Gregory M. Fahy; Email: gfahy@21cm.com

Submitted: 07/15/09; Revised: 08/31/09; Accepted: 09/02/09

Previously published online: www.landesbioscience.com/journals/organogenesis/article/9974

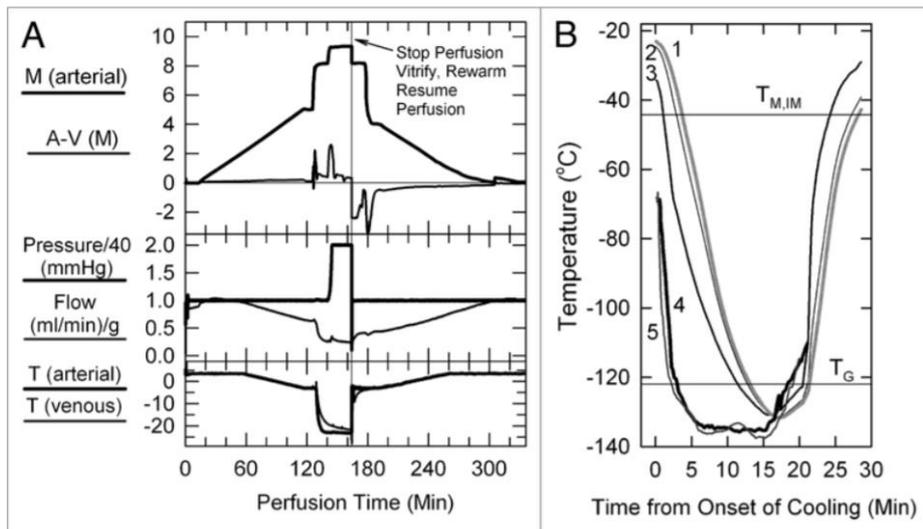


Figure 1. (A) Perfusion protocol for renal survival after vitrification and rewarming. M, molarity; A-V (M), arteriovenous difference in molarity; T, temperature in degrees Celsius. The protocol, as usual,^{6,39} employs an initial 5 M plateau, a second plateau at 8.4 M to allow cooling to -22°C without freezing, and a final plateau during M22 perfusion. In the experiment shown, the perfusion was interrupted at the point shown to enable the kidney to be vitrified, rewarmed and reperfused with 8.4 M cryoprotectant at -3°C . (B) Thermal history of the transplanted kidney based on invasive temperature measurements in a model rabbit kidney cooled and rewarmed by a procedure identical to that used for the vitrified-transplanted rabbit kidney. Line 1: inner medullary temperature, as documented by a thermocouple located 1.2 cm below the renal surface; line 2: outer medullary temperature, measured 7 mm below the renal surface; line 3: cortical temperature 2 mm below the renal surface; line 4: environmental temperature of the test kidney; line 5: environmental temperature of the kidney that was transplanted after previous vitrification. $T_{M,IM}$, estimated melting point of inner medullary tissue (upper horizontal line); T_G , estimated glass transition temperature of inner medullary tissue (lower horizontal line).

vessels,¹¹ heart valves,⁴⁶ corneas⁴⁷ and similar structures⁴⁸ that can all be cooled and rewarmed rather rapidly so as to avoid devitrification, are the only macroscopic structures that have been reported to recover at least in part after vitrification.

Research on vitrification of organs that require immediate vascular anastomosis upon transplantation has been carried out primarily on the rabbit kidney.^{5,6,39,49-51} The rabbit kidney provides a useful illustration of the general problems of preserving both natural and laboratory-generated organ replacements. In this article, we describe the special problems of vitrifying the kidney and progress made toward their solution, including the first case of life support after vitrification and rewarming.

Results

Survival of the first large solid organ after vitrification and transplantation: a case history. In late 2002 and early 2003, several rabbit kidneys were perfused with the M22 vitrification solution,⁶ vitrified and transplanted⁵² back to their original donors (autografts) with immediate contralateral nephrectomy either to evaluate survival or to evaluate short-term blood reflow only for the first several minutes in vivo. No rabbit survived when perfused with M22 at 40–60 mmHg, but one of two survived after perfusion with M22 at 80 mmHg for 25 min, and the second

rabbit in this small group lived for 9 days after transplantation, which was longer than any other non-surviving rabbit studied. Although anecdotal, the sole survivor proves that organ cryopreservation by vitrification can result in life-supporting function after transplantation, and a detailed examination of this case reveals many interesting aspects of the problem of successfully preserving an organ by vitrification.

The events during perfusion of the surviving kidney are shown in Figure 1A and, with the exception of the elevated perfusion pressure during M22 perfusion, are typical of protocols we have described for several years.^{5,6,49} The venous concentration just before cooling the kidney to below T_G was 96.4% of the arterial concentration, and the absolute arteriovenous concentration difference was 330–340 mM. Under the conditions of this perfusion, this venous concentration predicts⁶ an inner medullary tissue concentration that is 92.1% of the

arterial concentration, which is sufficient to permit vitrification on cooling although insufficient to preclude devitrification.⁶

Figure 1B shows the thermal history of the kidney during cooling and warming and indicates that all parts of the transplanted kidney were below T_G for about 8 min, the thermal nadir being about -130°C for the cortex, outer medulla and inner medulla (approximately 7–8°C below the estimated T_G of the inner medulla⁶). The warming rate of the inner medulla from T_G to -60°C was about $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and declined to $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ from -60°C to the predicted inner medullary melting point ($T_{M,IM}$) of -44.2°C . During the removal of M22, the kidney perfused normally, and during transplantation, the urine was not bloody and the kidney appearance was reasonable and seemed to be recovering at closure.

The animal became anemic on the first postoperative day and again on day 10 (Fig. 2A). This symptom was not previously seen after cooling to -45°C .⁶ Fortunately, the anemia spontaneously resolved after being successfully treated, suggesting recovery of adequate renal production of erythropoietin. Acute hyperkalemia developed on days 2 and 3 but was successfully controlled. Thereafter, K^+ levels slowly rose until reaching a stable value by about day 32. Serum creatinine peaked at 14.6 mg/dl (Fig. 2B) on day 4 and then fell to a nadir of 3.3 mg/dl on day 24 inde-

pendent of diuresis and hydration. It then slowly rose again until reaching an apparently stable value of 6.0–6.4 by day 38.

Clinically, the animal regained normal drinking behavior, a normal fecal output score, and a normal urine volume output score by about 1–2 weeks postoperatively, but food consumption and to a lesser extent water consumption and urine output declined on balance after day 24. The rabbit lost about 18% of its body weight by the fifth postoperative day and thereafter maintained this weight while also maintaining normal posture and behavior other than some sluggishness.

After ensuring that the animal appeared capable of living indefinitely using the vitrified kidney as the sole renal support, it was euthanized for histological follow-up on day 48. Ice formation during warming was not expected in the cortex but was expected to be equivalent to 1–2% of the total inner medullary mass,⁶ so the fate of the renal medulla was of special interest. To our surprise, examination of an entire renal cross section showed that medullary damage was essentially confined to one side of the kidney, the medullary portion of the peripelvic columns on the opposite side displaying remarkably good survival (Fig. 3). This raises fascinating but still unresolved mechanistic questions about the origin of the observed damage, but indicates that under the experimental conditions achieved, the delivery of M22 to the medulla was sufficient to allow survival of considerable medullary mass, inspiring hope that relatively small improvements in medullary cryoprotectant delivery might enable full survival of the renal medulla.

Despite lack of expected freezing in the renal cortex, considerable cortical injury was observed as well. This damage ranged from reasonably mild loss of superficial cortical tubules (Fig. 4, top) to predominant loss of tubules in the cortex corticis with persistence of glomeruli (Fig. 4, middle) to loss or atrophy of both superficial tubules and associated glomeruli (Fig. 4, bottom). We speculate that this injury is the result of previously undiscovered stress-strain phenomena in the outer cortex caused by the establishment of large thermal gradients in relatively stiff and brittle tissue near the glass transition temperature. Lowering cooling or warming rates to avoid this form of injury is feasible in principle but will require still better distribution of M22 into the renal medulla because medullary devitrification will otherwise be exacerbated by lower cooling and warming rates, as verified by direct observation (unpublished results).

The problem of renal medullary water replacement. These results identify the renal medulla as a tissue that seems to be poised at the dividing line between the success and the failure of vitrification.

Figure 3. (A) Cross-section of the vitrified/rewarmed kidney (PAS staining) showing surviving (S) and non-surviving (NS) medullary areas; white box designates the region depicted in (B), and black box identifies the location of (C). Non-surviving areas are confined to one side of the kidney. Scale bars: in (A), 3 mm; in (B and C), 100 microns.

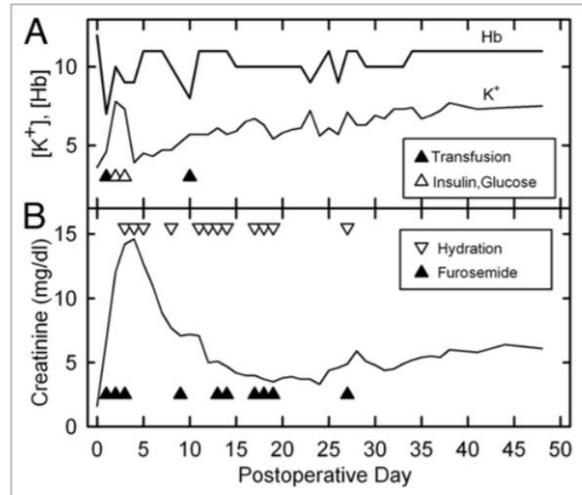
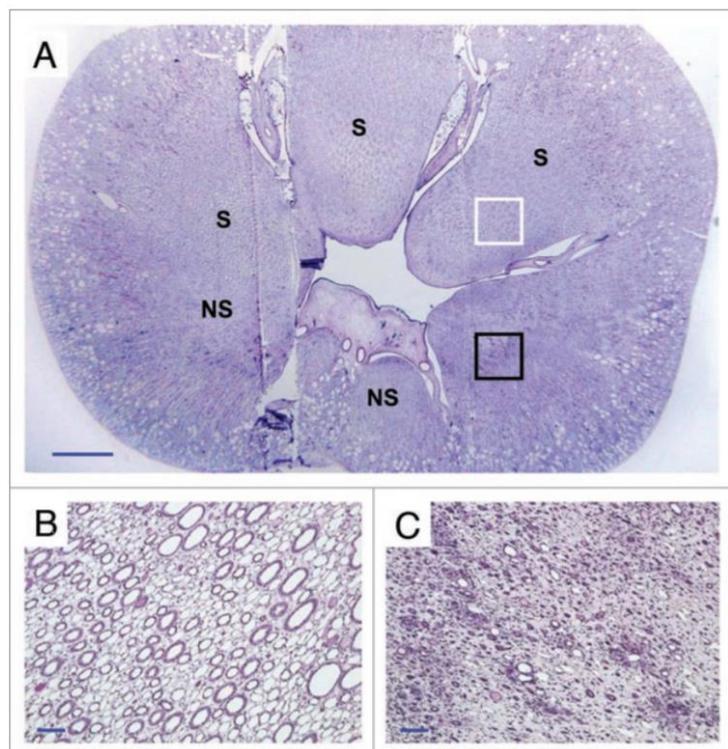


Figure 2. (A) Changes in blood levels of hemoglobin and potassium after transplantation of a previously vitrified rabbit kidney and interventions to correct both (triangles). Hyperkalemia was corrected by intravenous glucose (20 ml of 5% dextrose in 0.45% NaCl) and insulin (0.4 ml of 1 U/ml, IV). Anemia was corrected with 20 ml of whole rabbit blood (~6–8 ml/kg) on each occurrence. Blood levels were measured before corrective interventions given on the same day. [Hb], hemoglobin concentration in g/dl; [K⁺], potassium concentration in meq/l. (B) Postoperative creatinine levels and diuretic support history. Lower triangles indicate furosemide administration (generally 5–10 mg, IV or IM); upper triangles indicate hydration (generally 100–200 ml, consisting of equal volumes of 0.9% NaCl and 0.45% NaCl plus 5% glucose, subcutaneously). Blood levels were measured before corrective interventions given on the same day.

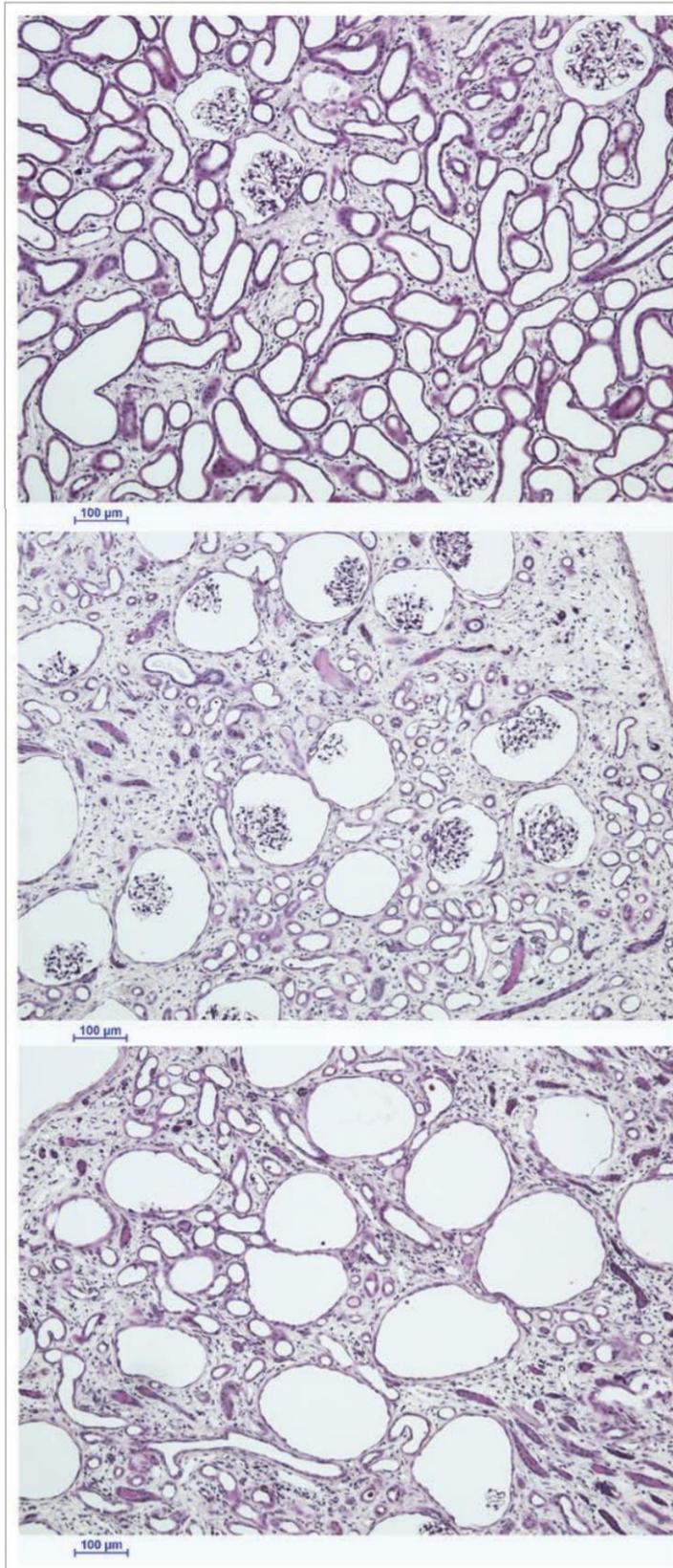


Figure 4. The spectrum of renal cortical responses to vitrification and rewarming. Top: area showing predominant survival of both tubules and glomeruli. Scale bars all represent 100 microns. Middle: transitional zone between predominantly surviving superficial renal cortex and non-surviving cortex, showing loss of tubules but survival of glomeruli. Bottom: non-surviving superficial cortex, showing loss of both tubules and glomeruli, with ballooning of Bowman's capsule. PAS stain.

The survival of the medulla presumably depends on the relationship between medullary cryoprotectant delivery and medullary ice formation, and deeper insight into this relationship will be fundamental for understanding the requirements for successful vitrification and recovery of the kidney and, by extension, for the recovery of vitrified organized tissues in general.

The anatomy of the renal vasculature is organized so as to constrain medullary blood flow to a small fraction of total renal blood flow,⁵³ an arrangement that allows the kidney to concentrate urine but makes the task of delivering cryoprotectant to the medulla a difficult one. Anatomically, the medullary circulation is provided by the vasa recta, which originate either directly from widely-spaced points along the arcuate arteries or indirectly from efferent arterioles of juxtamedullary glomeruli, which comprise about 9% of the total number of glomeruli;⁵⁴ in either case, the originating blood vessels subdivide into many parallel vascular channels, each of which carries a small fraction of the flow that enters the originating vessel.

These anatomical limitations are a given, but medullary delivery of cryoprotectant can be influenced by factors such as perfusate viscosity, cryoprotectant delivery protocol, and the permeability and diffusivity of the cryoprotectants in the vitrification solution. In addition, the vascular system is not the only route of delivery for cryoprotectants. The medulla consists also of tubules and collecting ducts that can convey permeable cryoprotectants along their lengths, diffusing as they go. At the temperatures of our experiments⁶ (-22°C to 3°C, and particularly -22°C or -3°C for delivery of the highest concentrations of cryoprotectants), and in the presence of more than 8 molar cryoprotectant (<-48% v/v water), no appreciable renal metabolism can be expected, and therefore tubular delivery of cryoprotectants to the medulla is presumably entirely passive and driven only by filtration at the glomerulus followed by local diffusion (no secretion, no active reabsorption, just diffusion) until delivery into the pelvis. Given that medullary blood flow amounts to only about 10% of total renal blood flow under ordinary conditions,⁵³ a filtration fraction in the vicinity of just 10%, which we have observed for rabbit kidneys,⁴⁹ would be sufficient to deliver enough ultrafiltrate to the medulla to match the total volume flowing through the medullary blood vessels.

The best vitrification solution known for the kidney to date is M22,⁶ whose critical cooling rate (the cooling rate above which ice formation is not observed) is 0.1°C/min, and whose critical warming rate (the warming rate above which ice formation is not observed) is 0.4°C/min.^{1,34} As determined from the cooling and warming curves of **Figure 1B**, the rabbit kidney can, conservatively, be cooled and warmed by conduction at about 8°C/min or more, which implies that 100% equilibration of the medulla with M22 is not required. Key questions are, what is the level of equilibration that is required, what is required to achieve it, and how can we know when we have achieved it? These questions are taken up in the next section.

Measuring and achieving adequate equilibration. Comparisons between cryoprotectant concentrations in the urinary space and in the venous effluent revealed that the “urine” (perfusate ultrafiltrate) tends to lag far behind the venous effluent in concentration (**Fig. 5**). This is logical since the urine flow rate is a fraction of the arterial flow rate, and since the venous effluent disproportionately samples the overperfused renal cortex, which accounts for ~90% of total renal perfusate flow, and therefore under-represents poorly-equilibrated areas. In addition, the urine makes three passes through the renal medulla (descending and ascending limbs of the loop of Henle followed by passage through the collecting ducts) and therefore is in intimate osmotic/diffusive communication with the renal medulla before it is collected. For these reasons, the urine is expected to reflect medullary tissue concentrations of cryoprotectant better than is the venous effluent concentration, and experimental results described below bear out this expectation.

Figure 6 provides a basis for illustrating many features of medullary cryoprotectant introduction. The figure shows the effects of perfusion temperature and the polymer content of M22 on arterial flow and urine concentration equilibration with the arterial perfusate. As in **Figure 1A**, perfusion with the VMP transitional solution³⁹ (8.4 M total concentration, the second concentration plateau of **Fig. 1A**) begins at -3°C and in the standard protocol⁶ continues during continuous perfusion-cooling to -22°C to allow M22 perfusion to begin at -22°C, but we see in **Figure 6** that when this is done (M22-22), the urine concentration lags so far behind the arterial concentration that at the end of M22 perfusion, urine concentration is just reaching the concentration of VMP, or only about 90% of the full concentration of M22. Perfusion of VMP and M22 only at higher temperatures (-3°C) reduces viscosity and greatly improves both arterial flow and equilibration, as expected, allowing about 95% equilibration to be attained (M22-3). Removing all polymers from M22 at -3°C (M22NP) further reduces viscosity, improves flow, and improves equilibration, as expected. However, an anomaly is introduced when M22NP is supplemented with just one of the polymers of M22, namely, the commercial Supercool X-1000™ ice blocker⁵⁵ (X-1000). Perfusing this solution (M22NP + 2X, containing 2% w/v X-1000, or twice the usual concentration of X-1000 in M22,⁶) slows the arterial perfusion rate yet ultimately allows a degree of equilibration similar to that achieved after M22NP perfusion. Therefore, urinary space equilibration is not proportional to the arterial flow rate.

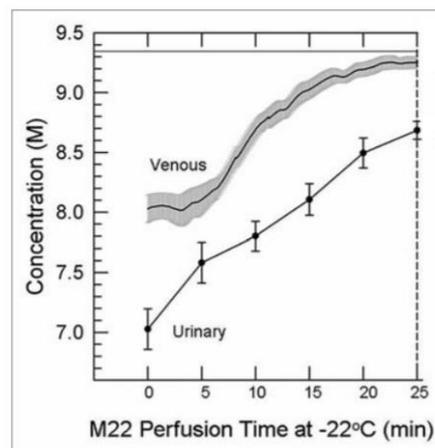


Figure 5. Difference between the venous concentration and the urinary space concentration during M22 perfusion at -22°C and 40 mmHg (n = 4 perfusions). Urine concentrations (discreet data points ±1 SEM) determined manually; venous concentrations (line with gray “halo” consisting of ±1 SEM) determined by computer. The time base gives time from the nominal onset of M22 perfusion, with includes a lag time as M22 makes its way through the perfusion circuit. The horizontal line near the top of the graph shows the concentration of M22, which is not fully reached even by the venous effluent by the end of M22 delivery.

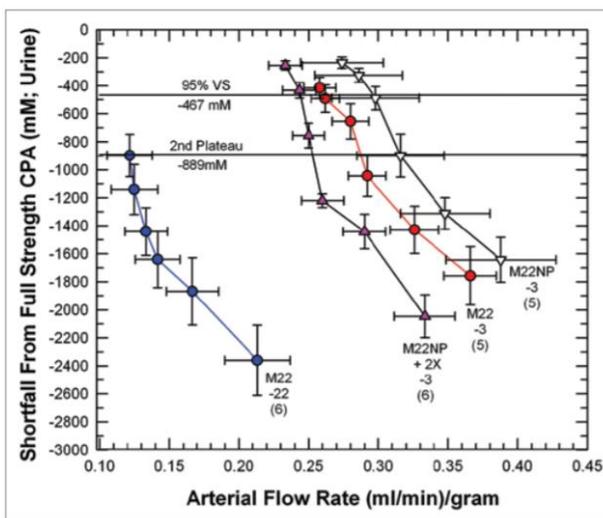


Figure 6. Equilibration shortfalls (urine concentration minus nominal arterial concentration) in rabbit kidneys perfused with M22 at -22°C (M22-22) or at -3°C (M22-3) plotted as a function of arterial flow rates (which decline as higher concentrations are reached and viscosity increases). M22NP-3 refers to M22 minus all polymers, perfused at -3°C; M22NP + 2X-3 refers to M22NP containing 2% X1000 ice blocker, perfused at -3°C. Values in parentheses indicate the number of perfusions of each type. Each data point represents urine equilibration measured at 5-min intervals, beginning at VS perfusion time zero to the right and ending at VS perfusion time = 25 min to the left. The horizontal lines are “landmark” concentrations and refer to the concentrations of VMP (2nd Plateau, which falls at a shortfall of -889 mM) and 95% of full-strength vitrification solution (VS) (which, because of the negligible molarity of the polymers of M22, is essentially the same for M22, M22NP and M22NP + 2X). Error bars designate ±1 SEM. For discussion, see text.

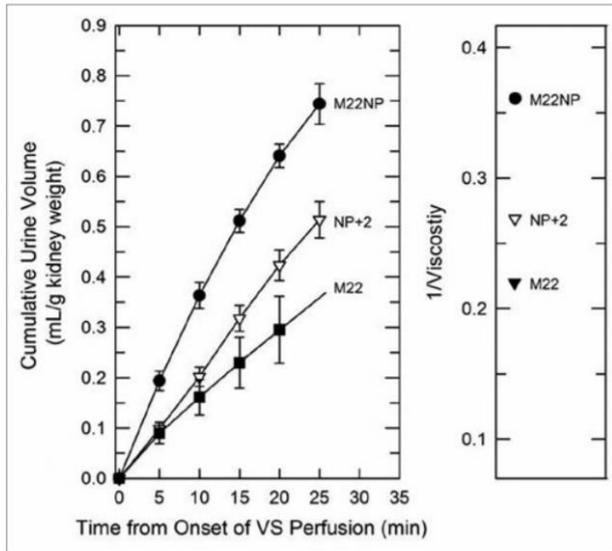


Figure 7. Left: urine accumulation during perfusion with M22, M22NP + 2% X1000 (NP + 2), and M22NP at -3°C ; right: reciprocal viscosities of these three vitrification solutions (cP^{-1}). The total accumulated urine volumes are inversely proportional to the total viscosity of each VS (M22 = 4.54 cP; M22NP + 2X = 3.71 cP; M22NP = 2.77 cP). The urine volume for M22 at 25 min was not consistently recorded and so is indicated by extrapolation. Data points represent means ± 1 SEM.

Equilibration was, however, mirrored by differences in the urine flow rates in these groups, and the latter were in turn closely accounted for by the viscosities of the M22 variant solutions (Fig. 7). Thus, it seems that urinary equilibration is more closely correlated with urine flow rate than with arterial flow rate.

Figure 8 answers the question of “how much equilibration is enough” and brings out a number of other important points. The left panels describe the devitrification temperatures, percent ice formed at the point of devitrification, and percent of ice melted at the tissue melting point, for urine samples collected at the end of the perfusion, and the right panels report the same information for inner medullary tissue samples (all data obtained by differential scanning calorimetry).

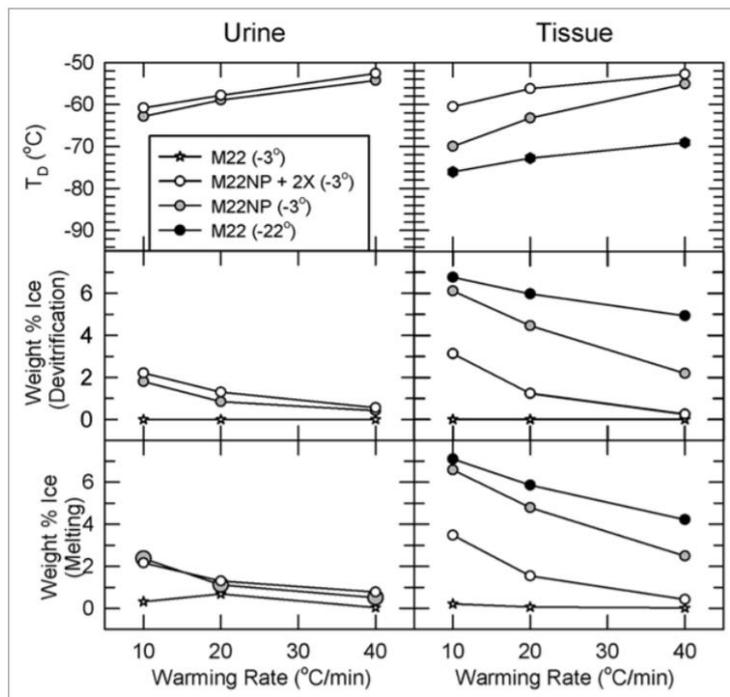


Figure 8. Temperature, extent and warming rate dependence of ice formation in urine (left) and tissue samples (right) obtained from kidneys subjected to the four protocols of Figure 6 and relationship between the amount of ice formed during devitrification and the amount of ice that thawed upon complete rewarming. Urine was not collected from the M22 kidneys perfused at -22°C . Upper: devitrification temperatures (T_D); middle: the percentage of sample mass that crystallizes during devitrification; lower: the percentage of sample mass that melts upon continued warming. Each point represents the mean of generally 5–6 independent measurements; devitrification temperatures are averaged only for those samples that devitrified. No devitrification event was observed for any specimen in the M22 -3°C group. Error bars omitted for clarity. Groups are represented as indicated in the inset. For discussion, see text.

The first thing to note is that perfusion of M22 at -22°C causes about 7% of inner medullary mass to crystallize as ice during rewarming, and this result is little affected by the warming rate. This amount of ice is substantially greater than was predicted for our surviving vitrified kidney, presumably because in the experiments of Figure 8 we perfused at 40 mmHg rather than at 80 mmHg, which is known to make a significant difference.⁶ In complete contrast, perfusion of M22 at -3°C (stars) results in no tissue ice formation at any warming rate. Therefore, the required degree of urinary space equilibration lies between 90% and 95%, and is probably close to the latter limit.

Second, perfusing M22NP at -3°C results in less ice formation than perfusing M22 at -22°C even though M22NP is a more dilute and intrinsically less stable solution; this is undoubtedly because the higher equilibration level of M22NP delivers more net cryoprotectant despite its lower total concentration. Finally, adding 2% X1000 to M22NP greatly suppresses tissue ice crystal formation, which demonstrates the ability of X1000 to usefully penetrate into and protect inner medullary tissue.

Comparing tissue results to urine results shows that tissue generally devitrifies at a lower temperature than does urine from the same kidney, and that the amount of ice formed in tissue is accordingly higher than it is in urine from the same kidney, indicating that tissue concentrations lag behind urine concentrations. Interestingly, for both urine and tissue, in most cases the percentage of sample mass that melts upon thawing is the same as the percentage that freezes during devitrification, meaning that vitrification is generally complete on cooling with the regimen used for tissue analysis.

Visual assessment of ice formation. Although tissue biopsies allow quantitative results to be obtained as presented in Figure 8, we have been interested in developing methods for visualizing ice formation across entire renal cross-sections in order to be able to judge the two and three-dimensional extent of ice formation. Although these methods are still in development, we present an example of the type of information that can be obtained in Figure 9. In this example, the warming rate was about 1°C/min, and therefore more ice is expected than with the more rapid warming used in Figure 8. Nevertheless, the maximum extent of ice formation, judged by whitening of the tissue during rewarming, did not include the cortex in this example, and the ice that formed appeared to be uniformly distributed.

Using this method and differential scanning calorimetry will eventually allow us to determine the extent to which medullary ice formation can be tolerated by the kidney. We have been able to show that medullary damage can be assessed in the acute post-operative period by removing kidneys 30 min after transplantation, flushing them to remove blood, and examining the extent of medullary blood trapping by inspection of renal cross-sections (unpublished observations). Although preliminary, such observations have identified conditions that allow blood trapping to be avoided, and as our methods improve, we should be able to use such methods to determine how much medullary ice formation, if any, is acceptable, and to select perfusion methods for evaluation by permanent transplantation.

Materials and Methods

Procedure for obtaining survival after rabbit kidney vitrification. A 12.7 gram rabbit kidney was perfused with M22, a 9.3 M vitrification solution with very low critical cooling and warming rates,^{1,6,34} in an LM5 carrier solution under computer control⁵⁶ using a variation of our standard protocol⁶ on December 10th, 2002 (Fig. 1A). Perfusion began with Renasol-14 containing 2% w/v B. Braun hydroxyethyl starch (HES) and no cryoprotectant and continued, after a pause at 5 M cryoprotectant to allow the arteriovenous (AV) concentration gradient to level, to VMP³⁹ in LM5 containing no HES. To distribute M22 more thoroughly than usual while minimizing damage from perfusion pressures over 40 mmHg, perfusion pressure was raised to 80 mmHg only during the 25-min period of exposure to M22 itself. The kidney was removed from the perfusion apparatus at the end of M22 perfusion and cooled in rapidly-moving nitrogen vapor⁶ (Fig. 1B) The intra-renal thermal history was determined by inserting a three-point needle thermocouple (beads at 2, 7 and 12 mm depths; PhysiTemp, Huron, PA) into an identically-treated but non-transplanted kidney.

Rewarming was accomplished by slowly raising the environmental temperature to about -115°C in order to bring the cortical temperature to just above T_C , at which point the kidney was returned to the perfusion machine and further warmed by pouring M22 at -22°C over the renal surface for 8 min. Rewarming was completed by perfusing the kidney with VMP at -3°C, after which cryoprotectant washout was completed as usual⁶ (Fig. 1A), transitioning from VMP in LM5 to Renasol-14 + 2% HES, and

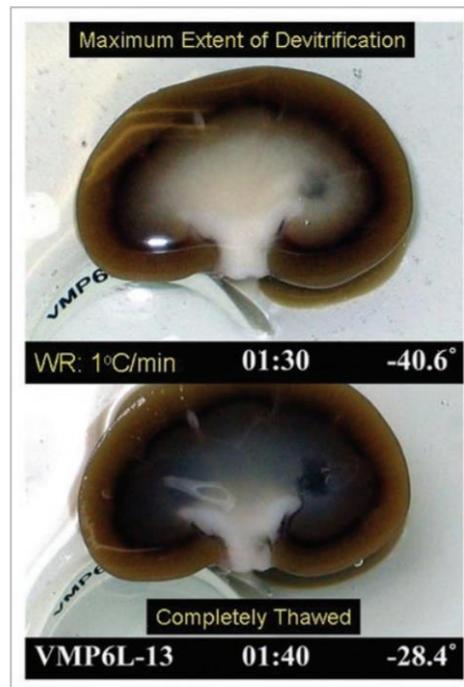


Figure 9. Visual appearance of ice in an exemplary rabbit kidney cross-section during rewarming. The kidney was perfused with M22 at -22°C, cut in half, immersed in M22, vitrified in a CryoStar freezer at -135°C, and eventually rewarmed at about 1°C/min while being photographed from time to time. Rewarming was accomplished by transfer of the kidneys to an insulated box through which liquid nitrogen vapor was circulated slowly so as to allow steady warming of the contained atmosphere from just below T_g to well above the renal melting points. Times (1:30 and 1:40) represent times in hours and minutes since the onset of slow warming, and temperatures refer to ambient atmospheric temperatures near the kidney but not within the kidney itself. The upper panel shows the kidney at the point of maximum ice cross-sectional area, and the lower panel shows the kidney after complete ice melting. Both panels show the site of an inner medullary biopsy taken for differential scanning calorimetry.

the kidney was transplanted according to our published method⁵² with immediate contralateral nephrectomy.

Perfusion of kidneys with M22 and alternative vitrification solutions at 40 mmHg. All perfusions were carried out under computer control in the general manner represented in Figure 1A. However, because B. Braun discontinued the manufacturing of HES and because the use of all alternative forms of HES was associated with higher post-transplantation peak creatinine levels (unpublished results), we replaced HES with 2% w/v decaglycerol (dG) in the carrier solution at the beginning of the perfusion. We also used TransSend-4 at the beginning and end of each experiment, but retained LM5 as the carrier for VMP, M22, and their variants. Remaining protocol details other than the perfusion pressure were as reported in Figure 1A and elsewhere.⁶

End point measurements. Determination of tissue freezing points (devitrification temperatures), percent ice formation and percent ice melted were all carried out by differential scanning

calorimetry. The cooling and warming protocol for inner medullary samples was to cool to -120°C at $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and to rewarm at 10, 20 or $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ when the endpoint was devitrification. Heats of devitrification and of melting were obtained by integrating peak areas and were converted from units of joules/gram into percent ice formation by dividing by 3.34.⁶ The temperatures of devitrification were taken to be the temperatures at the tops of the observed peaks.

Cryoprotectant concentrations were determined from refractive index readings on the basis of appropriate calibration curves. Baseline data were freshly derived for each experiment during priming of the perfusion system. All refractive indices were recorded continuously at -0°C using ice-immersed in-line process refractometers (AFAB Enterprises, Eutis, FL, Model PR-111) at the beginning (priming) and experimental phases of each perfusion except that urine refractive index was determined using a bench-top Bellingham Stanley RFM 330 refractometer at room temperature and converted to concentration using a separate room temperature calibration obtained using the same refractometer. Viscosities were measured using a Gilmont falling-ball viscometer (Cole Parmer) at room temperature.

Conclusions

Clearly, the problem of eliminating or sufficiently limiting ice formation throughout the kidney without inducing unacceptable toxicity is a complex and many-faceted one. So far, the most

promising single approach seems to be the one described in **Figure 1**, which resulted in survival after transplantation. However, the many lessons that have been learned since that experiment will undoubtedly result in methods for protecting the kidney that are more effective than those used in **Figure 1**, and that will allow better and more consistent survival to be obtained after vitrification and rewarming. Certainly, the availability of new methodologies to evaluate renal tissue resistance to ice formation will be helpful, and the use of microwave rewarming to reduce the likelihood of damage from devitrification could also be highly beneficial for our efforts to solve the very complex problem of fully successful renal vitrification.

Because of its unique vascularization, the kidney may be the most challenging organ of them all to vitrify and rewarm successfully. If so, continued progress with the kidney should be encouraging for the future vitrification and recovery of other complex living systems, including laboratory-produced organ and tissue replacements, whose accessibility to cryoprotectant may be significantly greater than that of the renal medulla.

Acknowledgements

Transplantation of the surviving kidney was carried out by Dr. Jun Wu, who is now in private dental practice. The authors wish to thank Ms. Perlie Tam for expert surgical assistance. Supported by 21st Century Medicine, Inc., All procedures involving animal use were done according to USDA standards and with IACUC approval.

References

- Fahy GM, Wowk B, Wu J. Cryopreservation of complex systems: the missing link in the regenerative medicine supply chain. *Rejuvenation Res* 2006; 9:279-91.
- Starzl TE. A look ahead at transplantation. *J Surg Res* 1970; 10:291-7.
- Smith AU. Problems in the resuscitation of mammals from body temperatures below 0°C . *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957; 147:533-44.
- Karow AM Jr. The organ bank concept. In: Karow AM Jr, Abouna GJM, Humphries AL Jr, eds. *Organ Preservation for Transplantation*. Boston: Little, Brown and Company 1974; 3-8.
- Khirabadi B, Fahy GM. Permanent life support by kidneys perfused with a vitrifiable (7.5 molar) cryoprotectant solution. *Transplantation* 2000; 70:51-7.
- Fahy GM, Wowk B, Wu J, Phan J, Rasch C, Chang A, et al. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology* 2004; 48:157-78.
- Wang X, Chen H, Yin H, Kim S, Lin Tan S, Gosden R. Fertility after intact ovary transplantation. *Nature* 2002; 415:385.
- Karlsson JO, Toner M. Cryopreservation. In: Lanza RP, Langer R, Vacanti J, eds. *Principles of Tissue Engineering*, Second Edition. San Diego: Academic Press 2000; 293-307.
- Arav A, Revel A, Nathan Y, Bor A, Gacitua H, Yavin S, et al. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. *Hum Reprod* 2005; 20:3554-9.
- Kaiser J. New prospects for putting organs on ice. *Science* 2002; 295:1015.
- Song YC, Khirabadi BS, Lightfoot F, Brockbank KG, Taylor MJ. Vitreous cryopreservation maintains the function of vascular grafts. *Nat Biotechnol* 2000; 18:296-9.
- Bedaiwy MA, Jeremias E, Gurunluoglu R, Hussein MR, Siemianow M, Biscotti C, et al. Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. *Fertil Steril* 2003; 79:594-602.
- Martinez-Madrid B, Dolmans M-M, van Langendonck A, Defrere S, Donnez J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril* 2004; 82:1390-4.
- Hamilton R, Holst HI, Lehr HB. Successful preservation of canine small intestine by freezing. *J Surg Res* 1973; 14:313-8.
- Fahy GM. Analysis of "solution effects" injury: rabbit renal cortex frozen in the presence of dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* 1980; 17:371-88.
- Elami A, Gavish Z, Korach A, Houminer E, Schneider A, Schwab H, et al. Successful restoration of function of frozen and thawed isolated rat hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135:666-72.
- Toledo-Pereyra LH. Organ freezing. *J Surg Res* 1982; 32:75-84.
- Pegg DE, Green CJ, Walter CA. Attempted canine renal cryopreservation using dimethyl sulphoxide, helium perfusion and microwave thawing. *Cryobiology* 1978; 15:618-26.
- Smith AU. The effects of glycerol and of freezing on mammalian organs. In: Smith AU, ed. *Biological Effects of Freezing and Supercooling*. London: Edward Arnold, Ltd 1961; 247-69.
- Kubota S, Lillehei RC. Some of the problems associated with kidneys frozen to -50°C or below. *Low Temp Med* 1976; 2:95-105.
- Pegg DE, Diaper MP. The mechanism of cryoinjury in glycerol-treated rabbit kidneys. In: Pegg DE, Jacobsen IA, Halasz NA, eds. *Organ Preservation, Basic and Applied Aspects*. Lancaster: MTP Press, Ltd 1982; 389-93.
- Karow AM Jr, Shlafer M. Ultrastructure-function correlative studies for cardiac cryopreservation. IV. Prethaw ultrastructure of myocardium cooled slowly ($\leq 2^{\circ}\text{C}/\text{min}$) or rapidly ($\geq 70^{\circ}\text{C}/\text{sec}$) with or without dimethyl sulfoxide (DMSO). *Cryobiology* 1975; 12:130-43.
- Hunt CJ. Studies on cellular structure and ice location in frozen organs and tissues: the use of freeze-substitution and related techniques. *Cryobiology* 1984; 21:385-402.
- Pollack GA, Pegg DE, Hardie IR. An isolated perfused rat mesentery model for direct observation of the vasculature during cryopreservation. *Cryobiology* 1986; 23:500-11.
- Halasz NA, Rosenfield HA, Orloff MJ, Seifert LN. Whole organ preservation II. Freezing studies. *Surgery* 1967; 61:417-21.
- Halasz NA, Miller S. Rewarming methods for whole organ freezing. In: Norman JC, ed. *Organ Perfusion and Preservation*. New York: Appleton-Century-Crofts 1968; 731-7.
- Guttman FM, Lizin J, Robitaille P, Blanchard H, Turgeon-Knaack C. Survival of canine kidneys after treatment with dimethylsulfoxide, freezing at -80°C , and thawing by microwave illumination. *Cryobiology* 1977; 14:559-67.
- Lehr H. Progress in long-term organ freezing. *Transplant Proc* 1971; 3:1565.
- Fahy GM. Activation of alpha adrenergic vasoconstrictor response in kidneys stored at -30°C for up to 8 days. *Cryo Letters* 1980; 1:312-7.
- Fahy GM. Prospects for vitrification of whole organs. *Cryobiology* 1981; 18:617.
- Fahy GM, Hirsh A. Prospects for organ preservation by vitrification. In: Pegg DE, Jacobsen IA, Halasz NA, eds. *Organ Preservation, Basic and Applied Aspects*. Lancaster: MTP Press 1982; 399-404.
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation.

33. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA. Recent progress toward vitrification of kidneys. *Cryobiology* 1982; 19:668-9.
34. Wowk B, Fahy GM. Toward large organ vitrification: extremely low critical cooling and warming rates of M22 vitrification solution. *Cryobiology* 2005; 51:362.
35. Wowk B, Fahy GM. Ice nucleation and growth in concentrated vitrification solutions. *Cryobiology* 2007; 330.
36. Wowk B. Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology* 2009; 59:(in press).
37. Fahy GM. Vitrification: An overview. In: Liebermann J, Tucker MJ, eds. *Vitrification in Assisted Reproduction: A User's Manual and Troubleshooting Guide*. London: Informa Healthcare 2007; (in press).
38. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; 313:573-5.
39. Fahy GM, Wowk B, Wu J, Paynter S. Improved vitrification solutions based on predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology* 2004; 48:22-35.
40. Fahy GM. The role of nucleation in cryopreservation. In: Lee REJ, Warren GJ, Gusta LV, eds. *Biological ice nucleation and its applications*. St. Paul: APS Press 1995; 315-36.
41. Fahy GM. Vitrification. In: McGrath JJ, Diller KR, eds. *Low Temperature Biotechnology: Emerging Applications and Engineering Contributions*. New York: American Society of Mechanical Engineers 1988; 113-46.
42. Courbiere B, Massardier J, Salle B, Mazoyer C, Guerin J-F, Lornage J. Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. *Fertil Steril* 2005; 84:1065-71.
43. Sugimoto M, Maeda S, Manabe N, Miyamoto H. Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. *Theriogenology* 2000; 53:1093-103.
44. Salehnia M. Autograft of vitrified mouse ovaries using ethylene glycol as cryoprotectant. *Exp Anim* 2002; 5:509-12.
45. Migishima F, Suzuki-Migishima R, Song S-Y, Kuramochi T, Azuma S, Nishijima M, et al. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol Reprod* 2003; 68:881-7.
46. Brockbank KG, Song YC. Morphological analyses of ice-free and frozen cryopreserved heart valve explants. *J Heart Valve Dis* 2004; 13:297-301.
47. Armitage WJ, Hall SC, Routledge C. Recovery of endothelial function after vitrification of cornea at -110°C. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:2160-4.
48. Taylor MJ, Song YC, Brockbank KG. Vitrification in tissue preservation: new developments. In: Fuller BJ, Lane N, Benson EE, eds. *Life in the frozen state*. Boca Raton: CRC Press 2004; 603-41.
49. Fahy GM, Ali SE. Cryopreservation of the mammalian kidney II. Demonstration of immediate ex vivo function after introduction and removal of 7.5 M cryoprotectant. *Cryobiology* 1997; 35:114-31.
50. Fahy GM, da Mouta C, Tsonev L, Khirabadi BS, Mehl P, Meryman HT. Cellular injury associated with organ cryopreservation: chemical toxicity and cooling injury. In: Lemasters JJ, Oliver C, eds. *Cell Biology of Trauma*. Boca Raton: CRC Press 1995.
51. Khirabadi BS, Fahy GM, Ewing L, Saur J, Meryman HT. 100% survival of rabbit kidneys chilled to -32°C after perfusion with 8 M cryoprotectant at -22°C. *Cryobiology* 1994; 31:597.
52. Wu J, Ge X, Fahy GM. Ultrarapid nonsuture mated cuff technique for renal transplantation in rabbits. *Microsurgery* 2003; 23:1-5.
53. Ofstad J, Aukland K. Renal circulation. In: Seldin DW, Giebisch G, eds. *The kidney, physiology and pathophysiology*. New York: Raven Press 1985; 471-96.
54. Kaissling B, Kritz W. Structural analysis of the rabbit kidney. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1979; 56:1-123.
55. Wowk B, Leitl E, Rasch CM, Mesbah-Karimi N, Harris SB, Fahy GM. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology* 2000; 40:228-36.
56. Fahy GM. Organ perfusion equipment for the introduction and removal of cryoprotectants. *Biomed Instrum Technol* 1994; 28:87-100.

ANEXO C: CÁLCULO DOSIS HEPARINA

La dosis de heparina que se le inyecta al ratón para evitar trombos se va a calcular a partir de la dosis necesaria para un humano y escalarla de acuerdo a la relación entre volúmenes sanguíneos entre humanos y ratones *Mus Musculus*.

Se tiene como dato que se necesita 0.5 ml aproximadamente de Heparina Sódica (cima, fuente de información de medicamentos) para heparinizar a un adulto.

La siguiente tabla (Kaese, Verheule S. *Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size*, *Front Physiol.* 2002) muestra el volume sanguíneo 5-6L para un adulto entre 58-85kg y un volumen sanguíneo de 0.002-0.03L para un ratón entre 15-43g, que se adecua a las cepas que se han experimentado.

	Human	Mouse	References
GENERAL			
Body mass (kg)	58–85	0.015–0.043	Sheng et al., 1999; Verheule et al., 1999; VanderBrink et al., 2000; Janssen and Smits, 2002; Speakman et al., 2002; Noujaim et al., 2004; Xiao et al., 2004; Muller et al., 2005; Hong et al., 2008; Barwe et al., 2009; Brands et al., 2010; Carlstrom et al., 2010; Gros et al., 2010; Carroll et al., 2011
Lifespan (year)	70–80	2–2.5	Speakman et al., 2002; Zhang and Zhang, 2009
Basal metabolic rate (kJ/d)	6279	15.6	Speakman et al., 2002
Basal metabolic rate (O ₂ consumption L/(kg * h))	0.9	0.8–3	Desai et al., 1997; Janssen and Smits, 2002
HEART			
Heart weight (g)	261–366	0.12–0.17	Muller et al., 2005; Hong et al., 2008; Barwe et al., 2009; Carlstrom et al., 2010; Carroll et al., 2011
Heart weight/body weight ratio (kg/kg)	0.004–0.006	0.004–0.005	Muller et al., 2005; Hong et al., 2008; Barwe et al., 2009; Carlstrom et al., 2010; Carroll et al., 2011
HEMODYNAMIC			
Stroke volume (mL)	50–100	0.015–0.05	Janssen and Smits, 2002; Fabritz et al., 2010; Gros et al., 2010; Hyyti et al., 2010; Maslov et al., 2010
Cardiac output (L/min)	4–8	0.005–0.03	Janssen and Smits, 2002; Mestas and Hughes, 2004; Gros et al., 2010; Maslov et al., 2010
Blood pressure (mean arterial pressure, mmHg)	88–100	73–125	Kass et al., 1998; Sheng et al., 1999; Janssen and Smits, 2002; Brands et al., 2010; Carlstrom et al., 2010
Blood volume (L)	5–6	0.002–0.03	Sheng et al., 1999; Janssen and Smits, 2002; Mestas and Hughes, 2004

Tabla 8. Comparación fisiología cardíaca entre ratón y humano (Kaese, Verheule S. *Cardiac*, 2002).

Para los cálculos se van a utilizar los valores más restrictivos, ya que una dosis superior puede causar la muerte. Por lo tanto se necesitan 0.5ml de Heparina para un adulto de 5L de volumen sanguíneo y 0.2µL para un ratón.

Esta cantidad es inapreciable para ser suministrada, por lo que es necesario disolverla en agua pura para obtener una dosis inyectable total (agua+heparina) inyectable con una jeringuilla de insulina.

La dosis individual para cada ratón será de 0.1ml para ser apreciable compuesta por 0.998 ml de agua pura y 0.002ml de heparina.

La cantidad de heparina obtenida inicialmente fue en una jeringuilla de 0.2ml, con lo que pueden suministrarse 1.000 dosis. Se disolvieron los 0.2ml en 99.9ml de agua pura para conseguir 1L de solución con la concentración antes mencionada. De esta forma, basta con tomar 0.1ml de esta solución para suministrar a cada ratón.

Tiempo heparinización

Se comenzó heparinizando a los ejemplares 5 minutos antes de su sacrificio. No obstante, la aparición de trombos fue evidente sobre todo en el experimento 11. Se consultó con expertos en experimentos de laboratorio (Itziar Castro, entre otros) y se recomendó heparinizar 35 minutos antes del sacrificio. Tras el experimento 11 los resultados fueron notorios, a partir de este tiempo de heparinización óptimo no se volvieron a apreciar trombos.

ANEXO D: MATERIAL Y EQUIPOS

La siguiente lista recoge todos los materiales y equipos que han sido necesarios para llevar a cabo el proyecto. Se incluye su proveedor, referencia y precio. Algunos datos no han sido conocidos o bien por antigüedad o bien por no tener acceso a su precio o referencia concreta.

Nombre	Proveedor	Referencia/Especificación	Precio
Agitador	-	-	-
Agujas	GPIVisual	-	15€ (100 unidades)
Bidón agua destilada con grifo	Cosela	BCGP-05K-001	11.47€ (5L)
BioCool	-	-	-
Bomba perfusión de jeringa Harvard	Harvard apparatus	PHD 4400 Programmable Hpsi Programmable Syringe Pump	-
Bombas peristálticas	Dinko/Dinter	-	-
Buffer Básico	Cosela	PHBS-004-250	7€ (1L)
Buffer Neutro	Cosela	PHBS-007-1K0	7€ (1L)
Caja de policarbonato congelable para criotubos	Labbox	FBPC-N02-001	6.30€
Calefactor Langendorff	-	-	-
Carbógeno	Air Liquide	1 botella 50 L	232€
Criotubo con tapón de rosca	Labbox	CRTD-018-050	20.32€ (50 unidades)
DMSO	Panreac Applichem	361954.1612	197.21€ (2.5L)
Etanol	Cosela	ETHA-90A-1K0	15.07€ (1L)
Extractor	-	-	-
Frasco de laboratorio graduado 1L	Labbox	SBG3-100-010	19.66€ (10 unidades)
Guantes desechables talla M	Labbox	GLON-00M-100	7€ (100 unidades)
Heparina	Farmacia Puerta	30 ml	27,57€

	Carmona		
Luers	GPIVisual	Macho Doble	0.12€ 0.26€
Matriz erlenmeller 2L	Labbox	EFN3-2K0-001	7.15€
Medidor pH	Cosela	MPMT-005-001	173,03€
PBS	Sigma-Aldrich	P3813-10PAK	172€ (para preparar 1L)
Pinzas punta fina, extremo en curva	Cosela	FORS-007-002	6.05€ (2 unidades)
Pinzas rectas para disección	Cosela	FORS-001-002	6.03€ (2 unidades)
Pipeta 10ml	Labbox	VPIA-010-006	11.28€ (8 unidades)
Placas Petri poliestireno 150mm diámetro	Cosela	PDIP-15E-140	62.51€ (12 unidades)
Placas Petri poliestireno 90 MM diámetro	Cosela	PDIP-093-500	57.48€ (500 unidades)
Refractómetro analógico portátil	Labbox	REF-B20-001	57€
Tarjeta adquisición de datos	Measurement Computing	PMD-1208LS	129€
Tijeras disección recta	Cosela	SCIS-14A-001	2.94€
Tijeras microscopía recta	Cosela	SCIS-115-001	2.94€
Tubería PFTE	Labbox	TEFT-002-005	19.27€ (5 metros)
Tubería silicona	Labbox	ILT-002-005	3.84€ (5 metros)
Tyrode's Salt	Sigma-Aldrich	T2397-1L	127€ (1L)
Vaso de precipitado 0.5L	Labbox	BKL3-050-012	7.40€ (12 unidades)

Tabla 9. Listado de material y equipos utilizados.

REFERENCIAS

- [1] Gregory M. Fahy. *Physical and biological aspects of renal vitrification*. Organogenesis. 2009.
- [2] Álvaro. Aguilar Perez, *Diseño e implementación de sistema de monitorización y control en temperatura y concentración de crioprotector para criopreservación de órganos*. TFM US. 2018
- [3] Daniel Coissins. *¿Realmente algún día podremos congelar nuestros órganos?*. BBC. 2014
- [4] Carmen Ortiz Serrano. *Prototipo de sistema de perfusión de crioprotector controlada para criopreservación de órganos*. TFG US. 2015
- [5] Erik Baltaxe. *Preparación de Langendorff: corazón de mamífero aislado y perfundido*. Researchgate. 2004
- [6] Órganos animales. Atlas de histología vegetal y animal.
https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/guiada_o_a_05cardiovascular.php
- [7] CNX Anatomy and Physiology. *Structure and Function of Blood Vessels*
- [8] Ángela Boto y Pablo Juaregui. *El mapa del genoma del ratón, un 99% coincidente con el del hombre*. El Mundo. 2002
- [9] Roca i Acín. *La utilización de animales en experimentación biomédica (I)* . 2001
- [10] Kaese, Verheule. *Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size*. 2012.
- [11] Centro de información de medicamentos, cima.
- [12] Robert M. Bell, Mihaela M. Mocanu, Derek M. Yellon. *Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion*. Elsevier. 2010
- [13] Yuri Pichugin, Gregory M. Fahy, Robert Morin. *Cryopreservation of rat hippocampal slices by vitrification*. Elsevier. 2006
- [14] Ministerio de salud. Instituto nacional de salud. *Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón*.

- [15] Mark A. Suckow, Peggy Danneman, Cory Brayton. *The laboratory mouse*. CRC press. 2001
- [16] Néstor Estrada, Liliana Maulini, Raúl Montenegro. *Biología Humana*. Editorial brujas. 2010.
- [17] Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio. *Principios éticos de investigación y docencia con modelos animales*.
- [18] Hugo Sachs Elektronik. *Isolated Heart Perfusion Systems for mouse to rabbit animal models*. Harvard Apparatus.

