

Trabajo Fin de Grado
Grado en Ingeniería Electrónica, Robótica y
Mecatrónica

Diseño y desarrollo experimental de sistemas y dispositivos electrónicos para el apoyo a la criopreservación mediante equilibrio termodinámico de órganos.

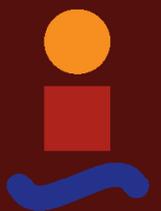
Autor: Enrique Alcalá Guerrero

Tutor: Ramón Risco Delgado

Cotutor: Marcin Balcerzyk

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

Sevilla, 2019



Trabajo Fin de Grado
Grado en Ingeniería Electrónica, Robótica y Mecatrónica

Diseño y desarrollo experimental de sistemas y dispositivos electrónicos para el apoyo a la criopreservación mediante equilibrio termodinámico de órganos.

Autor:

Enrique Alcalá Guerrero

Tutor:

Ramón Risco Delgado

Cotutor:

Marcin Balcerzyk

Dpto. Física Aplicada III

Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2019

Trabajo Fin de Grado: Diseño y desarrollo experimental de sistemas y dispositivos electrónicos para el apoyo a la criopreservación mediante equilibrio termodinámico de órganos.

Autor: Enrique Alcalá Guerrero

Tutor: Ramón Risco Delgado

Cotutor: Marcin Balcerzyk

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

Quisiera agradecer en primer lugar a mis compañeros de equipo el haber llegado hasta aquí. Este proyecto ha sido únicamente posible gracias a su sacrificio, dedicación y aportación de conocimientos; Beatriz Albiol, José Manuel Ortiz, Víctor Villalar.

No menos importante ha sido la aportación de numerosos profesionales, quienes se han volcado desde sus respectivas instituciones y áreas de conocimiento para que este trabajo pudiera salir adelante. Gracias a los departamentos de Química y Fluidos por su atención y equipos, al personal de CITIUS III e IBIS, a Marcin Balcerzyk y Ángel Parrado del Centro Nacional de Aceleradores por darnos acceso a equipo de alto nivel y ayudarnos en el análisis de los TAC, a Javier del CNIC por sus consejos y su ayuda en la cirugía, a AirLiquide por su atención y servicio, y sobre todo a Itziar Benito, del Hospital Universitario Virgen Macarena, por su inestimable ayuda y su comprensión.

Por supuesto, agradecer a Ramón Risco la oportunidad de formar parte de este proyecto, el interés y el entusiasmo mostrado por su desarrollo, su atención y sus ánimos en todas las etapas.

Por último, quisiera agradecer a mi familia y mis amigos su apoyo durante las numerosas y extensas jornadas de laboratorio. Ellos han presenciado los éxitos y los momentos más duros del proyecto, y sin su apoyo no habría sido posible dedicar tanto tiempo y esfuerzo a este proyecto.

Enrique Alcalá Guerrero
Sevilla, 2019

Resumen

Mediante el presente proyecto se desarrollan sistemas de apoyo a la criopreservación de órganos de *mus musculus* a partir de la técnica *equilibrium vitrification* aplicada a diferentes tejidos desde un acercamiento experimental.

La tarea en cuestión comporta el diseño y cálculo de una serie de sistemas electrónicos, térmicos, hidráulicos y químicos, extendiéndose por numerosas ramas de la ingeniería y las ciencias. Para ello, se establece como objetivo principal la perfusión con crioprotector de corazón y encéfalo de ratón y la supervivencia del órgano hasta este instante de perfusión. La técnica de vitrificación por equilibrio requiere, en concreto, el seguimiento de unas curvas de concentración de crioprotector y de temperatura para una serie de instantes de tiempo, y esto se hubo de aplicar a ambos órganos.

Se realizaron pues tres experimentos (con diversos ensayos para cada uno de ellos) para la correcta criopreservación de los tejidos, a saber: la supervivencia ex-vivo del corazón en un medio artificial mediante sistemas térmicos, electrónicos e hidráulicos, la perfusión del corazón aislado siguiendo las curvas propias de la técnica, y la perfusión del encéfalo o tejido nervioso central, no aislado, siguiendo las anteriores curvas. Esto se consigue con sistemas hidráulicos, electrónicos, químicos y térmicos.

A lo largo de la fase experimental se comprobó la mejora de la supervivencia de los órganos aislados (corazones) gracias al ajuste de los parámetros tales como el caudal y presión de perfusión, obedeciendo las condiciones de contorno impuestas por los propios sistemas biológicos. Se obtuvo igualmente una mejora en la perfusión y en la retención de agente crioprotector conforme se mejoraba la supervivencia de dichos órganos. En lo referente a corazón, se alcanzaron los valores de concentración deseados y marcados por las curvas de vitrificación de equilibrio, así como la temperatura a la cual se alcanzaban los valores deseados. En el caso del encéfalo, se obtuvieron valores menores a los del corazón dada la estructura tisular y el comportamiento de los elementos hidrosolubles con la pared celular del tejido nervioso.

Abstract

Through the present project, the development of support systems for murine organ cryopreservation using the *equilibrium vitrification* technique applied to different tissues is presented. This involves an experimental approach to the problem.

The task comprises the design and calculation of several electronic, thermal, hydraulic and chemical systems. For this matter, the main objective was established: whole organ perfusion with cryoprotectant, for both murine heart and encephala, and the survival of said organ up to the initiation of perfusion. The equilibrium vitrification technique requires, specifically, following certain concentration and temperature curves for given instants in time, and this had to be applied to both organs.

Hence three experiments took place (with several repetitions for each one of them) to correctly cryopreserve the tissues: ex-vivo survival of the murine heart in an artificial environment thanks to electronic, thermal and hydraulic systems following the previously stated curves, and the correct perfusion of central nerve system or encephala, in-vivo, following the curves, which requires chemical, hydraulic, electronic and thermal systems and their control.

Throughout the experimental phase it was proven the survival of the isolated heart provided the correct adjustment of flow and pressure parameters, subject to the conditions imposed by the biological systems. Likewise, it was observed an improvement in the perfusion and retention of the cryoprotecting agent according to the improvement of organ survival up to this phase. Regarding to the heart, the desired ACP values were reached as given by the concentration curves for equilibrium vitrification, as well as the temperatures reached within the time specifications. Regarding encephala, lower values were reached due to the tissue structure and behavior of hydrosoluble reactants given the nervous tissue wall structure.

Agradecimientos	vii
Resumen	ix
Abstract	xi
Índice	xiii
Índice de Tablas	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
1 INTRODUCCIÓN	21
1.1 <i>Introducción a la criopreservación</i>	21
1.2 <i>Objetivo del trabajo</i>	22
1.3 <i>Fisiología murina</i>	25
1.4 <i>Introducción a la electrocardiografía</i>	27
2 FASE EXPERIMENTAL	28
2.1 <i>Elección del agente crioprotector</i>	28
2.2 <i>Experimento de Langendorff</i>	31
2.2.1 <i>Descripción de sistemas</i>	31
2.2.1.1 <i>Cirugía</i>	32
2.2.1.2 <i>Equipo para supervivencia ex-vivo</i>	32
2.2.1.3 <i>Circuito hidráulico</i>	35
2.2.1.4 <i>Equipo para electrocardiografía</i>	42
2.2.2 <i>Procedimiento experimental</i>	56
2.2.2.1 <i>Cirugía de mus musculus</i>	57
2.2.2.2 <i>Canulación de la aorta</i>	60
2.2.2.3 <i>Perfusión retrógrada aórtica de Langendorff</i>	60
2.3 <i>Equilibrium vitrification de corazón</i>	62
2.3.1 <i>Descripción de sistemas</i>	62
2.3.1.1 <i>BioCool</i>	62
2.3.1.2 <i>Perfusor controlado en rampa de concentración</i>	66
2.3.1.3 <i>Reactivos</i>	75
2.3.1.4 <i>PicoLog y termopares</i>	76
2.3.2 <i>Procedimiento experimental</i>	79
2.3.2.1 <i>Preparación de equipos, material e instalaciones</i>	80
2.3.2.2 <i>Preparación de la perfusión y conexión al perfusor</i>	81
2.4 <i>Equilibrium vitrification de tejido nervioso central</i>	85
2.4.1 <i>Descripción de sistemas</i>	85
2.4.2 <i>Procedimiento experimental</i>	86
2.4.2.1 <i>Preparación de equipos, material e instalaciones</i>	87
2.4.2.2 <i>Preparación de la perfusión y conexión al perfusor</i>	88
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	92
3.1 <i>Resultados generales</i>	92
3.2 <i>Sobre el Experimento 1: perfusión aislada Langendorff</i>	97

3.2.1 Sobre la cirugía	97
3.2.2 Sobre los latidos.....	98
3.3 Sobre los Experimentos 2 y 3: equilibrium vitrification	102
3.3.1 Seguimiento de las curvas	102
3.2.1 Resultados tomografía computarizada.....	104
3.2.1.1 Unidades HU	105
3.2.1.2 CALIBRACIÓN DEL CT.....	107
3.2.1.3 Imágenes de los análisis	112
3.3.2 Inspección tisular	122
4 CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO.....	123
ANEXO A: ARTÍCULO DE G. M. FAHY	125
ANEXO B: TRABAJO CON ANIMALES	134
ANEXO C: INFORMACIÓN SOBRE RATONES.....	135
ANEXO D: TRANSPORTE DE ANIMALES	137
ANEXO E: PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	147
ANEXO F: INCIDENCIAS CON EL DMSO.....	150
ANEXO G: CÁLCULO DE DOSIS DE HEPARINA.....	152
ANEXO H: ANEXO DE CÓDIGOS	154
ANEXO I: DISEÑO DEL SOPORTE 3D.....	157
ANEXO J: ANÁLISIS ADICIONAL DE DATOS	161
REFERENCIAS.....	163

Índice de Tablas

Tabla 1. Comparativa de ACPs.....	28
Tabla 2: Dimensiones de la aguja.....	36
Tabla 3. Resultados del experimento de presión a la entrada vs caudal Q.....	37
Tabla 4. Datos de ECG de pruebas con personas.....	44
Tabla 5. Datos extraídos del análisis ECG comparativo de electrodos.....	48
Tabla 6. Datos del ratón para el experimento 1.....	50
Tabla 7. Datos ECG bajo influencia del TBE.....	51
Tabla 8. PPM según cálculo.....	54
Tabla 9. Datos del ratón para el experimento 3.....	54
Tabla 10. Datos ECG bajo influencia del TBE.....	54
Tabla 11. Comparativa de frecuencia cardíaca y anestesia utilizada. (Ho et al., 2011).....	56
Tabla 12. Materiales para el Experimento 1.....	57
Tabla 13. Equivalencias de botones e indicadores.....	64
Tabla 14. Valores experimentales con la bomba peristáltica.....	71
Tabla 15. Valores Brix % y molaridad de las disoluciones medidas en el refractómetro.....	73
Tabla 16. Resultados de la medida del perfusor: DMSO. Errores en la figura posterior.....	74
Tabla 17. Materiales para el Experimento 2.....	79
Tabla 18. Valores para programación de las rampas de temperatura.....	83
Tabla 19. Material para el Experimento 3.....	86
Tabla 20. Tabla completa de resultados (1/3).....	93
Tabla 21. Tabla completa de resultados (2/3).....	94
Tabla 22. Tabla completa de resultados (3/3).....	95
Tabla 23. Datos del ratón en el experimento.....	100
Tabla 24. Datos de electrocardiografía.....	100
Tabla 25. Distribución de muestras para análisis.....	104
Tabla 26. Valores HU y RAW para rack de calibración (Sesión 1).....	109
Tabla 27. Valores HU y RAW para rack de calibración (Sesión 2).....	109
Tabla 28. Cantidad de DMSO retenido. (100% supone una molaridad de 12, 0% de 0).....	120
Tabla 29. Reactivos para preparar Tyrode's HEPES.....	147
Tabla 30. Reactivos para preparar PBS.....	147
Tabla 31. Parámetros de impresión para el soporte.....	159

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Gráficas para perfusión de riñón de conejo de G. M. Fahy.....	23
2. Aparato circulatorio y estructura del corazón.....	25
3. Datos cardiovasculares de mus musculus. (Kaese, 2012). (Roca i Acín, 2001).....	26
4. Señal ECG (Shuo-Tsung, y otros, 2014).....	27
5. Comparativa de resistencia a la cristalización de dos ACP y etanol.....	29
6. Comparativa que muestra al DMSO como más favorable sobre el glicerol.....	30
7. Montaje para experimento de Langendorff.....	31
8. Báscula de precisión - uso durante preparación de reactivos.....	32
9. Lupa de laboratorio, apoyo a la canulación.....	32
10. Cabezal creador del medio térmico.....	33
11. Superior izquierda: entubado de oxigenación. Inferior izquierda: manorreductor antiguo (izq.) y nuevo (dch.). Derecha: bombona de carbógeno.....	34
12. Control de pH de la solución de Tyrode's tras oxigenar.....	35
13. Esquemático de la aguja de perfusión diseñada.....	36
14. Curvas de presiones a la entrada y la salida de la aguja.....	37
15. Detalle de las curvas obtenidas. Izquierda: diferencia entre <i>Pen</i> y <i>Psal</i> . Derecha: rango de operación para perfusión.....	38
16. Bomba de jeringa para perfusión Langendorff.....	39
17. Curvas de presiones según caudal. Datos con bomba Harvard.....	40
18. Diagrama del circuito hidráulico para perfusión Langendorff.....	41
119. Esquemático del AD8232 para medición.....	42
20. Contenido del paquete preparado para medición.....	42
21. Esquema de bloques para el experimento ECG.....	43
22. Esquema de conexionado Arduino UNO y placa ECG.....	43
23. ECG y análisis del sujeto 1.....	45
24. ECG y análisis del sujeto 2.....	45
25. ECG y análisis del sujeto 3.....	46
26. ECG y análisis del sujeto 4.....	46
27. Electrodo elaborado en el laboratorio.....	47
28. Comparativa de dos ECG con diferentes electrodos.....	48
29. Comparativa de los espectros de ECG con diferentes electrodos.....	49
30. Material y disposición del experimento ECG de ratón.....	50
31. Secuencia ECG de FVB anestesiado con TBE.....	51
32. Secuencia completa del ECG de TS1CJE.....	52
33. ECG de TS1CJE tras anestesiarse.....	53
34. ECG de CD-1 tras anestesiarse (100 uL).....	55
35. Secuencia completa ECG de CD-1.....	55
36. Material de cirugía requerido.....	57
37. Disposición del ratón para cirugía.....	58
38. Limpieza de los vasos sanguíneos y retirada del tejido adiposo.....	59
39. Visualización de la aorta (superior izquierda del corazón).....	59
40. Fotogramas de corazones durante el experimento de Langendorff. Por orden: A: 02-05-2019, B: 06-05-2019, C: 18-05-2019, D: 14-06-2019, E: 17-06-2019, F: 17-06-2019 (2), G: 02-07-2019, H: 03-07-2019, I: 19-07-2019.....	61
41. Equipo completo para experimento de equilibrium vitrification de corazón.....	62
42. Modificaciones al BioCool. Izquierda: ventilador. Centro y derecha: agitador externo.....	63

43. Botonera y panel de programación del congelador. Arriba: según aparece en el manual de instrucciones. Abajo, color: imagen del panel en el periodo de espera al acabar una rampa.....	64
44. Equipo de perfusión por control de concentración.	66
45. Panel frontal de principal.vi para la perfusión.	67
46. Panel frontal durante la perfusión.	67
47. Diagram de principal.vi	68
48. subComponentesConcentracion.vi para modificar el perfil de la curva de concentración.	68
49. Bombas peristálticas de DINKO para la perfusión. Se alimentan con un conector tipo JACK.....	69
50. Sistema hidráulico de perfusión de crioprotector.....	70
51. Watson-Marlow - cómo funcionan las bombas peristálticas.....	70
52. Característica estática de la bomba peristáltica y ajuste.	71
53. Medición del Brix % de (por orden de izquierda a derecha): PBS, H2O TII, DMSO 99.5%, DMSO 50% en PBS.....	72
54. Proceso de medición comparativa Brix % frente a molaridad del DMSO.	73
55. Relación entre la medida del refractómetro y la molaridad del DMSO de las disoluciones.	74
56. Comparativa de concentración de DMSO a la salida frente a la teórica.....	75
57. Thermoelement – Temperaturmessung (Termoelemento, medición de temperatura).....	76
58. Seguimiento de temperatura en la cámara de criopreservación.	78
59. Izquierda: Equipo de criopreservación listo para el funcionamiento. Derecha: criovial preparado para la vitrificación.	80
60. Parámetros de programación de rampas para el BioCool.	82
61. Disposición de los ventiladores de apoyo al BioCool.	83
62. Resultado del equilibrium vitrification al término de la perfusión.	84
63. Izquierda: idea genérica del soporte. Derecha: soporte construido y utilizado en los experimentos.....	85
64. Montaje genérico del experimento.....	89
65. Parámetros de programación de rampas para el BioCool.	89
66. Disposición de los ventiladores de apoyo al BioCool.	90
67. Pasos de la cirugía craneal.....	90
68. Resultado del equilibrium vitrification al término de la perfusión.	91
69. Evolución del tiempo de canulación.	97
70. Calidad del latido frente a dosis de heparina.	98
71. Evolución de la calidad del latido según el tiempo de canulación.	99
72. Diagrama de toma de datos para ECG ex vivo.	99
73. Filtro de paso alta para obtener la señal sin la componente de baja frecuencia.	100
74. Electrocardiografía ex-vivo de mus musculus en perfusión Langendorff.	101
75. Recta TBE (2%) - latidos para mus musculus.	101
76. Curvas temperatura - concentración para el Experimento 2: corazón.	102
77. Curvas temperatura – concentración para el Experimento 3: tejido nervioso central.	103
78. Rack para crioviales (imagen con recipientes vacíos de ejemplo)	104
79. NanoSPECT/CT para muestras biológicas de experimentación animal.....	105
80. Rack calibración DMSO en PBS.....	106
81. Rack corazones día 31.....	106
82. Rack tejido nervioso central día 31.....	106
83. Rack 4: mixto de tejidos, día 7.....	107
84. Muestras recalentadas y organizadas por racks.....	107
85. Imágenes calibración. Arriba: día 31/07. Abajo: día 07/08.....	108
86. Calibración HU con fondo de escala en H2O mili Q, día 31/07.....	109
87. Calibración HU con fondo de escala en PBS, día 31/07	110
88. Calibración RAW con fondo de escala en H2O mili Q, día 31/07.....	110
89. Calibración HU con fondo de escala en H2O mili Q, día 07/08.....	111

90. Calibración RAW con fondo de escala en H2O mili Q, día 07/08.....	111
91. Secuencia completa Rack 2: corazones 31/07.....	112
92. Detalle de las muestras almacenadas a -196°C	113
93. Detalle de los corazones en medio DMSO+PBS.....	113
94. Secuencia completa Rack 3: 31/07.....	114
95. Detalle de tejido nervioso central: control (izq.) y día 24/06 (dch.).....	115
96. Secuencia completa Rack 4: mixto de tejidos.....	116
97. Retención de DMSO en ambos órganos.....	120
98. Retención de DMSO según tiempo de canulación en corazones.....	121
99. x4 (arriba izq.), x10 (arriba dch.), x40 (abajo izq.), x100 (abajo dch.).....	122
100. Reactivos para preparar Tyrode's HEPES.....	147
101. Reactivos para preparar PBS.....	147
102. Preparación de Tyrodes HEPES.....	148
103. Ajuste de pH.....	149
104. Ataque del DMSO a los tubos y conexiones (1/2).....	150
105. Ataque del DMSO a los tubos y conexiones (1/2).....	151
106. (Kaese, 2012).....	152
107. Preparación y cálculo de la dosis.....	153
108. Versiones 1, 2 y mejora en versión 3 del soporte.....	157
109. Montaje genérico de prueba para el experimento.....	158
110. Impresión del soporte en Ender 3.....	159
111. Resultado del soporte y prueba.....	160
112. Relación entre el peso del animal y el tiempo de canulación.....	161
113. Relación edad - peso separado por cepas.....	162
114. Relación peso - sexo del animal.....	162

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción a la criopreservación

Desde la década de 1950 el problema de la criopreservación ha sido abordado en numerosas ocasiones. El proceso consiste en la congelación de un órgano, tejido o célula, ralentizando su metabolismo, con el fin de mantener la muestra viva aún a temperaturas bien por debajo de los -80°C . Para que esta congelación sea exitosa es crucial garantizar que la célula o células que componen un tejido, o el órgano, se encuentra correctamente protegido frente a las bajas temperaturas.

Al congelar, es frecuente que se produzca la aparición de cristales de hielo (nucleación) por la cristalización de las moléculas de agua presentes en el citosol (medio que rellena la célula en el que se encuentran los orgánulos) o bien en el medio extracelular. Estos cristales son disruptivos y llegan a matar a las células por dos vías: el medio extracelular se congela y cristaliza mientras que el citosol permanece líquido, lo cual hace que las sales del medio exterior se concentren en las zonas no cristalizadas, elevando la concentración de estas sales en las porciones no cristalizadas. La célula, por el mecanismo de ósmosis, deja pasar medio a través de su membrana con el fin de aumentar la cantidad de solvente para un mismo soluto (las sales) y así reducir la concentración, lo que termina por deshidratarla. El medio cristalizado y distribuido como un proceso estocástico presiona, perfora y dilata la pared celular, los orgánulos, el núcleo o la estructura extracelular, destruyéndolas.

La aparición de cristales se puede mitigar controlando la presencia de sales en el medio intra y extracelular, el intercambio de sustancias por medio de la pared celular (cuya rigidez depende de la temperatura) y el proceso de osmosis, lo cual se consigue con agentes crioprotectores (Ávila-Portillo, 2006). Estos agentes se agrupan en tres categorías: los azúcares (glucosa, sacarosa), los alcoholes (etilenglicol, glicerol, propanodiol, butanodiol, etanol, metanol) y el dimetilsulfóxido o DMSO. En un capítulo posterior se elegirá el crioprotector que usaremos en nuestros experimentos.

La criopreservación resulta fundamental para la creación de bancos de órganos, o *biobanks*, facilitando el proceso de trasplante a pacientes con esta necesidad. La capacidad de mantener un órgano vivo hasta el momento del trasplante es revolucionaria para el protocolo actual, donde los tiempos desde que el órgano es retirado del donante hasta que es trasplantado al receptor no puede superar en muchos casos las 12 horas. La preservación de embriones completos es también otra aplicación de estas técnicas, quizás la más estudiada y prominente por el momento. Además, esta extensión se puede y se debe hacer a especies animales amenazadas o en peligro de extinción, garantizando un mínimo de supervivencia a la especie por el almacenamiento de gametos criogenizados.

Los mecanismos y protocolos para la criopreservación son variados y complejos. Entre ellos podemos destacar los siguientes (Risco, 2018):

- Formulación de nuevos cócteles criopreservantes. Esta técnica surge como alternativa a los agentes crioprotectores tóxicos a altas concentraciones. Especialmente prominente en este

campo es Gregory M. Fahy, cuyas gráficas para altas concentraciones se usarán en los experimentos.

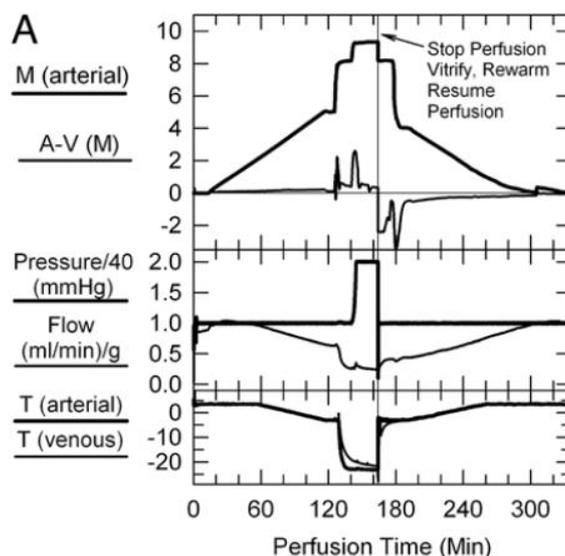
- Uso de proteínas anticongelantes, como una versión mejorada del agente crioprotector, que permite trabajar a altas concentraciones sin implicar mayor toxicidad, e introduce nuevos mecanismos en la mitigación de la nucleación.
- Liquidus tracking. Esta técnica se nutre del hecho de que, con una alta concentración de crioprotector, la temperatura del sistema se puede bajar más pausadamente. El objetivo es diseñar un sistema que permita monitorizar la temperatura y la concentración de crioprotector que entra al sistema, lo cual es complejo debido al aumento de viscosidad y disminución de la permeabilidad de las membranas celulares con el descenso de las temperatura.
- Trabajar a distintas presiones, lo que afecta a la cantidad de crioprotector necesaria a una misma temperatura.

Gregory M. Fahy propuso un protocolo para la perfusión renal siguiendo la curva de equilibrio sólido-líquido, implicando altas concentraciones de agentes crioprotectores, permitiendo una transición a un estado vítreo detenido a nivel molecular, desde un estado fluido en movimiento (Fahy, 2009). Esto es, en esencia, la vitrificación. Se denominará *equilibrium vitrification* (Risco, 2018) al proceso mediante el cual se perfunde con ACP a concentraciones cada vez mayores, hasta una temperatura relativamente alta, en torno a los -22°C , para posteriormente almacenar a temperaturas más bajas. Este es el experimento que se realizará para la preservación tanto de tejido nervioso central como de corazón.

1.2 Objetivo del trabajo

El objetivo principal consiste en realizar un estudio del mecanismo de *equilibrium vitrification* para órganos completos mediante la perfusión con crioprotector, que limite la aparición de cristales de hielo en el tejido a medida que se congela el órgano. Para ello se deberá hacer uso de un conjunto amplio de aparatos y sistemas, su caracterización, control y correcto uso para poder alcanzar este objetivo. En concreto, nos basaremos en tres experimentos, asociados a diversos equipos:

1. Supervivencia aislada de corazón de mus musculus en perfusión retrógrada aórtica (método de Langendorff): sistemas electrónicos, hidráulicos y térmicos de apoyo a la perfusión. Este experimento nos permite preparar el corazón para la vitrificación, y a su vez comprobar el estado de supervivencia antes de la criogenización.
2. *Equilibrium vitrification* de corazón de mus musculus con perfusión de dimetilsulfóxido (experimento de Gregory M. Fahy): sistemas electrónicos, hidráulicos y térmicos de apoyo al proceso. Para este experimento y para el siguiente, deberemos seguir las curvas de molaridad y temperatura propuestas por G. M. Fahy, adaptadas al volumen del órgano que se utilizará.



1. Gráficas para perfusión de riñón de conejo de G. M. Fahy.

3. *Equilibrium vitrification* de tejido nervioso de *mus musculus* con perfusión de dimetilsulfóxido (variación del experimento de Suda): sistemas electrónicos, hidráulicos y térmicos de apoyo al proceso.

Para alcanzar estos objetivos y completar los experimentos, se requerirá de los siguientes aparatos, a diseñar y construir o utilizar por los integrantes del equipo: intercambiador de masa o perfusor de crioprotector, congelador en rampa basado en PID, sistema de recreación del entorno basal para el mantenimiento del corazón en condiciones *ex vivo* (perfusión de sustancia hematomimética y calefactor) y sistema de adquisición y análisis de bioseñal cardíaca (electrocardiografía).

Los resultados a los tres experimentos se obtendrán por análisis tomográfico de las muestras criopreservadas, en el caso de la vitrificación, o mediante la observación y cálculo de actividad cardíaca en el caso del experimento de perfusión Langendorff. Para esto, se analizará la retención de DMSO en los tejidos de los diversos órganos, y se medirá la frecuencia cardíaca del corazón en el experimento de perfusión aislada.

Los objetivos específicos de este trabajo, agrupados por experimentos, son los siguientes:

1. Experimento de Langendorff para corazón de *mus musculus*

- 1.1. Diseño y construcción de un sistema para experimento de Langendorff
 - 1.1.1. Diseño del circuito hidráulico de perfusión
 - 1.1.1.1. Creación del ambiente favorable para la supervivencia
 - 1.1.1.2. Control del pH de la solución perfundida y del medio para la suspensión del corazón
 - 1.1.1.3. Control de oxigenación con carbógeno para la perfusión oxigenada 95% / 5% en carbógeno.
 - 1.1.1.4. Sistema con temperatura regulable para ajustar a 37°C
 - 1.2. Cirugía de *mus musculus* para extracción del corazón sin daños y sin coágulos.
 - 1.2.1. Administración de heparina.
 - 1.2.2. Sacrificio según métodos homologados.
 - 1.2.3. Apertura de la caja torácica, aislamiento del corazón y extracción.

- 1.3. Canulación de la aorta con cánula de calibre 22G para ratones pequeños y 26G para ratones con aortas más gruesas. La canulación se ha de hacer sobre un medio frío y con un tiempo que no exceda los 4 minutos para garantizar supervivencia, aunque en la práctica se ha observado que hasta 10 minutos de canulación permiten (baja) actividad cardíaca en la perfusión.
 - 1.4. Monitorización de la actividad cardíaca. Si bien se puede hacer uso de técnicas gráficas (vídeo), es altamente valorable la obtención de un electrocardiograma de los latidos del corazón aislado. Por consiguiente:
 - 1.4.1. Circuito para obtención de bioseñal ECG y software necesario para almacenar y analizar los datos.
 - 1.4.2. Pruebas de viabilidad *in vivo* en personas y ratones.
 - 1.4.3. Prueba con corazón aislado.
- 2. *Equilibrium vitrification de corazón de mus musculus***
- 2.1. Preparación del sistema de perfusión. En esta ocasión nos apoyaremos en el Trabajo Fin de Máster de Álvaro Pérez Aguilar.
 - 2.1.1. Adaptación (software) al tiempo elegido para perfusión durante la vitrificación: 1 h.
 - 2.1.2. Reparación del circuito hidráulico: arreglo de fugas, material resistente a la acción corrosiva del crioprotector.
 - 2.1.3. Nuevos acoples para las agujas de perfusión.
 - 2.1.4. Caracterización de las concentraciones a la salida del perfusir en los diferentes instantes de tiempo y ajuste a los valores necesitados.
 - 2.2. Reparación, puesta a punto y control del congelador de rampa BioCool de FTS Systems.
 - 2.2.1. Arreglo del agitador y colocación de un nuevo agitador para mantener el líquido del depósito en movimiento.
 - 2.2.2. Aislamiento del depósito con material aislante.
 - 2.2.3. Control de temperatura mediante los parámetros para control PID del congelador.
 - 2.2.4. Montaje de la refrigeración externa del BioCool (la propia estaba dañada).
 - 2.3. Perfusión del ACP disuelto en medio salino hasta la concentración deseada.
 - 2.4. Monitorización de la temperatura con termopares para validar el seguimiento de la gráfica de G. M. Fahy.
 - 2.5. Comprobación y resultados del experimento.
 - 2.5.1. Comprobación al término del experimento del estado físico del órgano y el medio que lo rodea, medición de la concentración de ACP en los alrededores del órgano.
 - 2.5.2. Almacenamiento en Nitrógeno líquido o en congelador a -27°C a la espera del análisis de la difusión del ACP en el órgano.
 - 2.5.3. Tomografía axial Computerizada de los órganos perfundidos para medir el porcentaje de DMSO absorbido.
 - 2.5.4. (Opcional) Microscopía óptica de los tejidos para comprobación del estado de la membrana plasmática y la estructura extracelular y presencia de cristales al término de la vitrificación.
- 3. *Equilibrium vitrification de tejido nervioso central de mus musculus***. Lo referente al sistema de perfusión es compartido con los objetivos del experimento anterior.
- 3.1. Diseño y construcción de un soporte para el ratón durante la vitrificación.

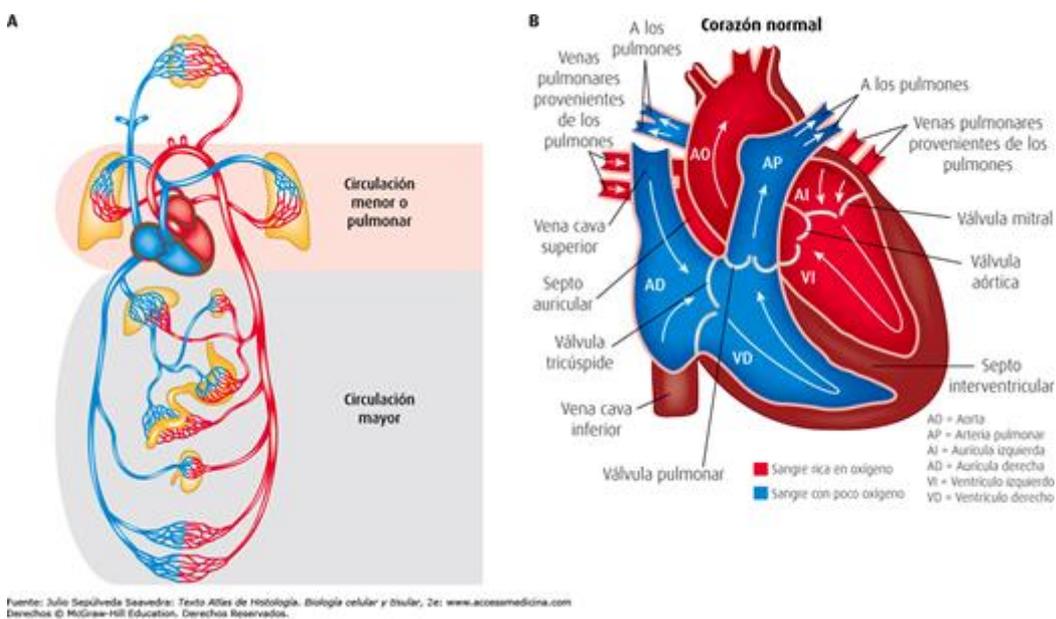
- 3.2. Heparinización, sacrificio por administración de anestesia y cirugía de mus musculus para aislamiento del corazón.
 - 3.2.1. Perforación del ventrículo izquierdo con la aguja en soporte, exanguinación del ratón y conexión al sistema de perfusión.
- 3.3. El protocolo de vitrificación es idéntico al de corazón.
- 3.4. Cirugía de extracción del tejido nervioso central perfundido y almacenamiento de la muestra en Nitrógeno líquido.
- 3.5. Análisis de resultados son idéntico al de corazón, con la salvedad del ECG.

Para que los experimentos tengan cierto grado de validez y credibilidad, se usará una muestra de tamaño ~40 para los experimentos, a distribuir en su mayoría hacia el experimento de Langendorff y de vitrificación de equilibrio para corazón, al estar relacionados, y un porcentaje menor para tejido nervioso central. Se trabajará exclusivamente el experimento de Langendorff hasta que se obtengan latidos en los corazones aislados, momento en el cual se pasará a la vitrificación de estos órganos. Más adelante se comenzará con tejido nervioso una vez se tenga dominada la vitrificación del corazón.

1.3 Fisiología murina

La perfusión del ACP se realizará en ambos casos a través del sistema vascular, ya sea por medio de la aorta o por vía ventricular. Debemos tener por lo tanto ciertas nociones de histología y fisiología para los órganos con los que trabajaremos.

El corazón es, en términos de ingeniería, una bomba peristáltica en circuito cerrado, tomando el fluido por las aurículas (al haber una diferencia de presión entre las aurículas y los ventrículos) e impulsando este fluido fuera por medio de la contracción ventricular. Consta de cuatro cavidades conectadas dos a dos, a saber: ventrículo izquierdo (el más poderoso), aurícula izquierda, ventrículo derecho y aurícula derecha. Las cuatro cavidades trabajan a diferente presión en ausencia de cardiopatías, y explotaremos las características hidráulicas del corazón para hacer llegar nuestro ACP al punto deseado.



2. Aparato circulatorio y estructura del corazón.

La arteria aorta es el canal más grueso de todos los vasos sanguíneos que entran y salen del corazón, y se encarga de impulsar la sangre hacia la circulación mayor o principal, englobando todo el cuerpo salvo los pulmones. La salida de la aorta se encuentra bloqueada por la válvula aórtica, que se abre cuando el ventrículo izquierdo hace presión sobre ella e impulsa la sangre oxigenada al resto del organismo.

Se usará el sistema cardiovascular como un circuito hidráulico natural, y para ello se ha de trabajar con un fluido hematimimético en cuanto a temperatura, acidez, pH y composición química, pero también debe tenerse en cuenta las restricciones hidráulicas del sistema. Por restricciones hidráulicas entendemos volumen del corazón, presión arterial y volumen de sangre murino. Conocidos estos parámetros, se pueden poner condiciones de contorno a los sistemas de perfusión y evitar daño tisular o fallo orgánico durante los experimentos.

Table 1 | Comparison of mouse and human (cardiac) physiology.

	Human	References	Mouse	References
GENERAL				
Body mass (kg)	58-85	de la Grandmasson et al., 2001; Stein et al., 2002; Nisajam et al., 2004; Johnstone et al., 2005; Kasper et al., 2008; Later et al., 2010; Barnes et al., 2012	0.015-0.043	Shang et al., '11 et al., 2002; Jia et al., 2002; Fic Muller et al., '31 2009; Branch et al., 2010; Cai
Lifespan (year)	70-80	Zhang and Zhang, 2009	2-2.5	Spekman et a
Basal metabolic rate (kJ/d)	6279	Johnstone et al., 2005	16.6	Spekman et a
Basal metabolic rate (O2 consumption L/kg /h)	0.9	Janssen and Smits, 2002	0.8-3	Dese et al., '10
HEART				
Heart weight (g)	261-366	de la Grandmasson et al., 2001; Cunha et al., 2002; Janssen and Smits, 2002; Later et al., 2010	0.12-0.17	Muller et al., '21 2009; Carlström
Heart weight/body weight ratio (g/g)	0.004-0.006	de la Grandmasson et al., 2001; Cunha et al., 2002; Later et al., 2010	0.004-0.005	Muller et al., '21 2009; Carlström
HEMODYNAMIC				
Stroke volume (mL)	50-100	Janssen and Smits, 2002; Meijer et al., 2005; Kasper et al., 2008	0.015-0.06	Janssen and Si et al., 2010; Hy
Cardiac output (L/min)	4-8	Janssen and Smits, 2002; Meijas and Hughes, 2004; Meijer et al., 2005; Kasper et al., 2008	0.005-0.03	Janssen and Si Gros et al., 201
Blood pressure (mean arterial pressure, mmHg)	88-100	Mancia et al., 1983; Janssen and Smits, 2002; Barnes et al., 2012; Damgaard et al., 2012	73-125	Kass et al., 199 Smits, 2002; Bi et al., 2012
Blood volume (L)	5-6	Janssen and Smits, 2002; Meijas and Hughes, 2004; Kasper et al., 2008	0.002-0.03	Shang et al., '11 and Hughes, '2
Other parameters:				
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 x 10 ⁶)
Glóbulos blancos				5-10 (n/µl x 10 ³)
Presión arterial				120/75 (mmHg)
Volumen sanguíneo				6-8 (porcentaje peso corporal)
Temperatura rectal				37,5 (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

3. Datos cardiovasculares de *mus musculus*. (Kaese, 2012). (Roca i Acín, 2001)

Se aprecia un volumen sanguíneo de 2-3 mL variable según edad, cepa, sexo, etc. La presión arterial dada en ambas fuentes se encuentra entre los 75 y los 120 mmHg, por lo que impondremos este rango como el rango de trabajo para los circuitos hidráulicos que se diseñarán más adelante.

Para los experimentos, se ha de realizar la cirugía de los ratones para trabajar con sus órganos. Es necesaria una formación sobre este aspecto, tanto teórica como práctica, pues los experimentos posteriores dependen necesariamente de la bondad de la cirugía y la habilidad de quien la realiza. A lo largo de la fase experimental se fue perfeccionando la técnica, de manera que el tiempo total de cirugía, la calidad de esta, el tiempo de canulación (tiempo en el que se introduce una cánula o aguja por la aorta y se comienza a perfundir) va mejorando, lo cual se ve reflejado en la supervivencia del corazón en el medio externo y durante la perfusión retrógrada aórtica aislada, o perfusión de Langendorff.

Para la perfusión de tejido nervioso central es importante conocer el concepto de barrera hematoencefálica. Los capilares del encéfalo son del tipo continuo, lo que significa que solo permite a unas pocas sustancias moverse a través de sus paredes (sustancias disueltas o con un diámetro menor de 70 nm). Además, las células endoteliales de la mayoría de los capilares cerebrales están sellados

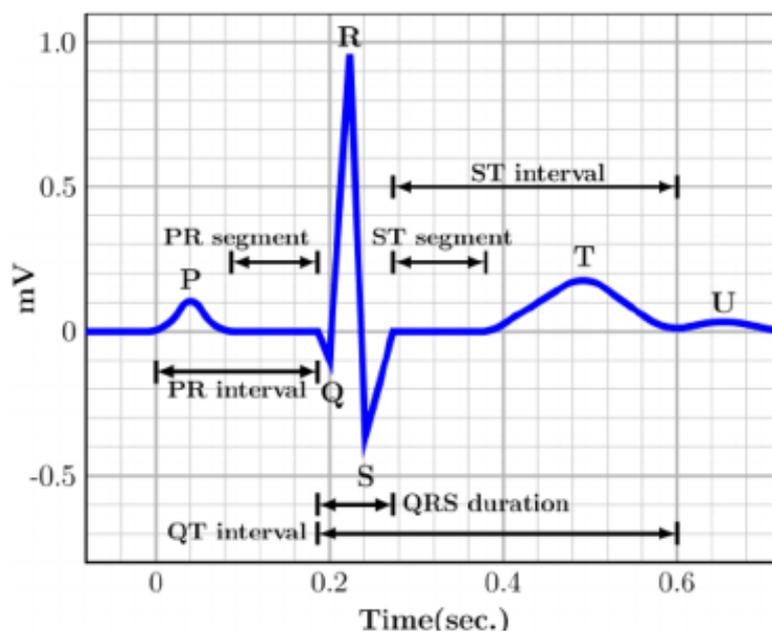
entre sí por uniones estrechas (los astrocitos rodean los capilares con prolongaciones y segregan sustancias químicas que mantienen las características de permeabilidad de las uniones estrechas). Hay áreas del encéfalo donde esta barrera falta, regiones donde existen glándulas endocrinas como el hipotálamo, la glándula pineal y la glándula hipófisis, y el intercambio de sustancias se realiza más libremente en ellas. (Albiol Tortosa, 2019)

La elevada presión osmótica de una solución concentrada en glucosa hace que las células endoteliales de los capilares se contraigan, lo que determina la apertura entre los espacios entre las uniones estrechas y el aumento de permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Tortora & Derrickson, 2006).

1.4 Introducción a la electrocardiografía

Un electrocardiograma (ECG) es un prueba que registra la actividad eléctrica del corazón. Es especialmente útil para detectar arritmias, enfermedades del corazón o episodios agudos de enfermedad coronaria (Sociedad Española de Cardiología). Es por ello de suma utilidad para hacer un análisis de la viabilidad de nuestra criopreservación y recuperación del corazón, al disponer de información cuantitativa sobre el comportamiento del corazón si hubiere actividad, y nos informará sobre el estado de las aurículas y los ventrículos en cada pulsación, así como nos dará datos sobre las coronarias a través de las cuales perfundiremos (tras bloquear la membrana de la aorta, con esta canulada.)

El análisis de la actividad del corazón se hace por segmentación y estudio de las ondas de electrocardiograma, separadas en tramos PQRSTU por su inventor. Se destacan tres zonas principales: onda P, complejo QRS y onda T (Shuo-Tsung, y otros, 2014). La onda P nos ofrece información sobre el estado de las aurículas; el complejo QRS se usa para medir la frecuencia cardíaca con los picos en R y nos informa sobre el estado de los ventrículos en compresión, y la onda T corresponde a la relajación ventricular.



4. Señal ECG (Shuo-Tsung, y otros, 2014)

En lo que prosigue, se analizarán los pulsos individuales en base a la frecuencia cardíaca y el espectro de la señal. Las valoraciones más profundas sobre el estado del corazón deberán ser realizadas por un experto en cardiología.

Para una mayor simplicidad, el análisis cuantitativo acaba aquí. Valoraremos de manera cualitativa la forma de onda en comparación con otras referencias.

2 FASE EXPERIMENTAL

En este capítulo se detallan los experimentos realizados para la criopreservación. Tras una elección del agente crioprotector, se procede a explicar cada uno de los tres experimentos, así como se detallan los equipos utilizados, diseños y cálculos requeridos para su caracterización y uso. Se incluye un protocolo o método experimental para llevar a cabo los experimentos, y finalmente se aclaran algunas incidencias generales.

2.1 Elección del agente crioprotector

Seguiremos una vitrificación de órganos completos, con el método de vitrificación por equilibrio. Esto implica que se perfundirá con crioprotector hasta altas concentraciones, llegando a una temperatura de $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ siguiendo la curva de equilibrio sólido-líquido. Se seguirán tres criterios para la elección del agente crioprotector (en adelante ACP): el tamaño del material biológico, el método de congelación y la penetrabilidad del crioprotector en los tejidos. El primer criterio viene dado, al ser órganos completos. El segundo criterio cae en relación con el primero y a los equipos de laboratorio. La vitrificación ultrarrápida de órganos completos es compleja (Risco, 2018), y por ello nos decantaremos por una *equilibrium vitrification, o liquidus tracking*¹ como se ha indicado. En tercer lugar, la capacidad penetrante crítica a la hora de obtener una rápida y correcta difusión del ACP por las membranas del órgano.

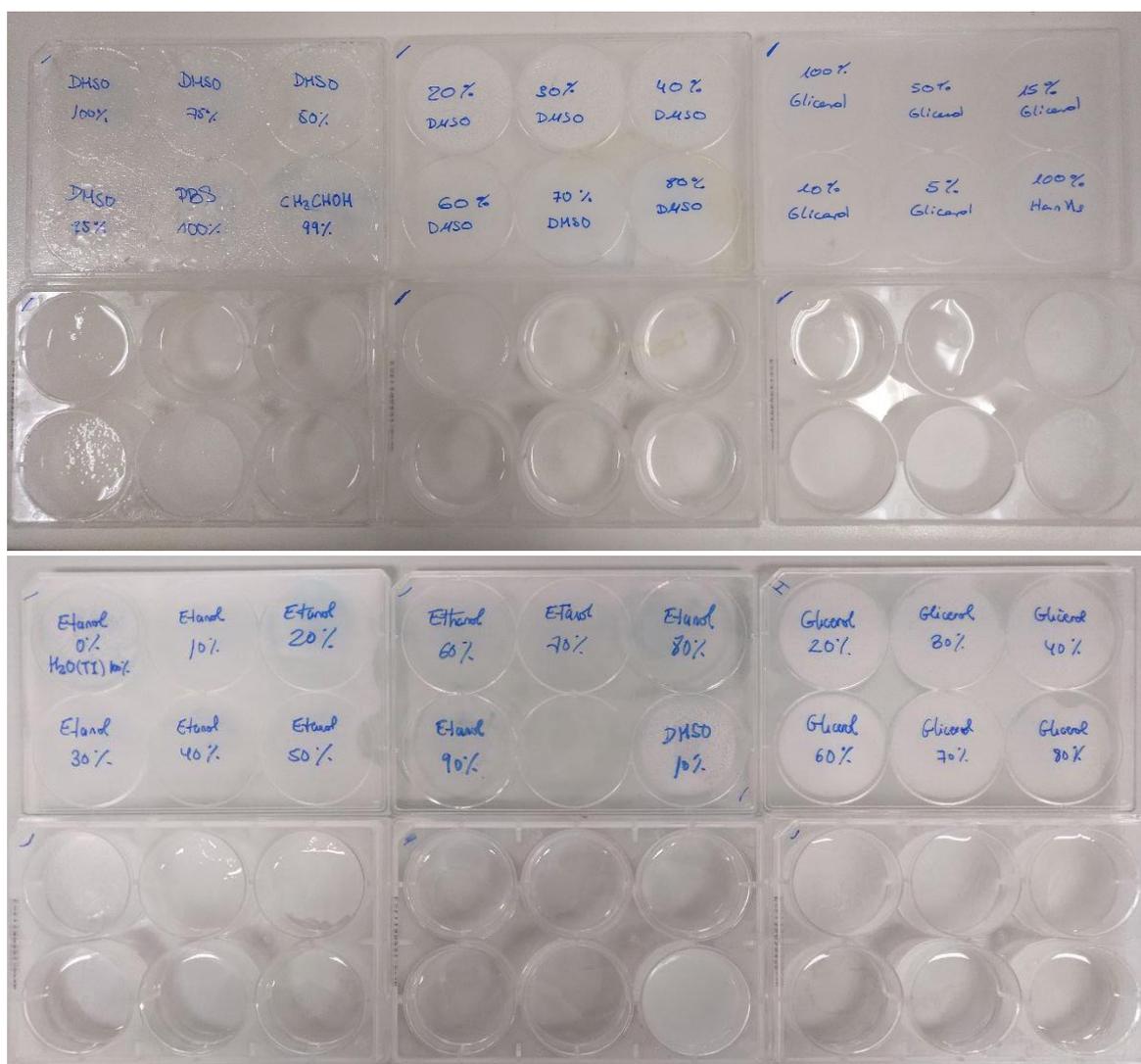
Surgen entonces dos posibles ACPs para nuestro experimento, de carácter penetrante: el dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 propanediol (PROH) y glicerol (Ávila-Portillo, 2006). EL DMSO es un ACP de uso prominente para la vitrificación. Se hará un ligero estudio de sus propiedades en contraste con otro de los agentes, el glicerol.

Tabla 1. Comparativa de ACPs

Propiedades	DMSO	Glicerol
Densidad (kg/m^3)	1100,4	1261
Masa molecular (g/mol)	78,13	92,094
P. fusión ($^{\circ}\text{C}$)	19	18
P. ebullición ($^{\circ}\text{C}$)	189	290
Viscosidad (cP)	1,966	1500
n	1,479	1,473

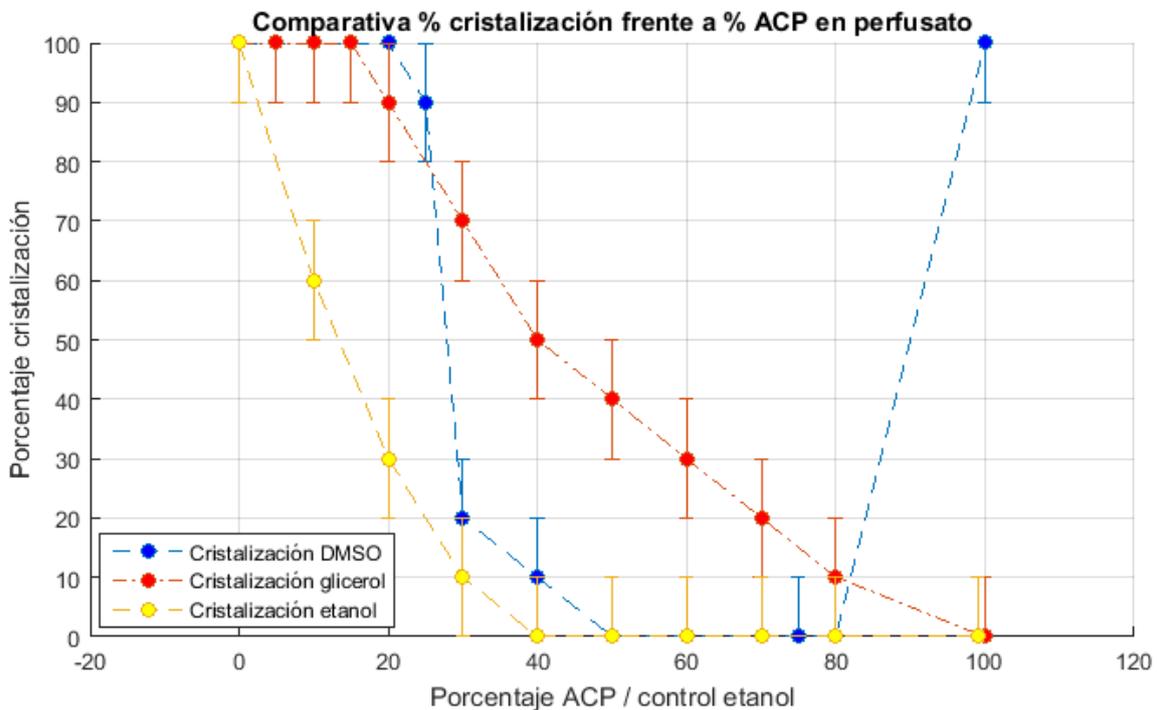
¹ Cuando hablamos de liquidus tracking, nos referimos a la técnica de seguimiento de la curva sólido-líquido para el tejido en cuestión, lo que supone un control extremadamente preciso de temperatura y concentración de crioprotector en cada instante. En la práctica se hará un seguimiento algo más laxo y con unas tolerancias tanto en T como en Molaridad.

Se aprecia que ambas tienen una densidad similar, con el DMSO más cercano al agua. El crioprotector será impulsado por un circuito hidráulico de bombas, cuyos cálculos son realizados tomando como referencia la densidad del agua. La masa molecular del DMSO también es menor, lo que facilita la penetración, además de ser una molécula menos voluminosa (el glicerol consiste en una cadena de 3 carbonos con enlaces hidroxilos en cada uno, mientras que el DMSO es un núcleo de azufre rodeado por dos metilos y un oxígeno). Ambos poseen un punto de fusión similar (en estado puro, pues se comprobará más adelante que su punto de fusión en disolución desciende hasta temperaturas por debajo de los 0 °C. El índice de refracción es similar y distinto a aquel del PBS o Tyrodes HEPES, que usaremos como búfer, y podremos calcular la concentración del ACP en el búfer según el índice de refracción conjunto midiendo con un refractómetro. La viscosidad es muy dispar, favoreciendo al DMSO por ser menos reticente a fluir por los circuitos de perfusión diseñados, con capacidades limitadas. Para determinar mejor cuál es el ACP más favorable, se procede a preparar disoluciones con diferentes concentraciones de DMSO y glicerol en PBS y solución de Hanks, haciéndose una comparativa con 4 pocillos de control conteniendo alcohol etílico en varias disoluciones, PBS puro, Hanks puro y ACP puros. Los resultados tras una exposición a -28 °C durante 24 horas son los siguientes:



5. Comparativa de resistencia a la cristalización de dos ACP y etanol

Es importante conocer el mecanismo de preservación de tejidos con glicerol y que explicaría por qué se hace uso de este ACP pese a observar que cristaliza aún a altas concentraciones en relación con el DMSO. El glicerol es un ACP selectivo, lo que significa que su uso necesariamente fuerza la cristalización del tejido, pero dejando algunas zonas ausentes de cristales. Cuando empiezan a aparecer cristales de hielo (nucleación), el glicerol es desplazado hacia las zonas no cristalizadas, concentrándose en esos ‘huecos’ y manteniendo esa zona libre de cristales. Se puede calcular la ‘porción congelada’ del tejido, y geoméricamente obtener la concentración de glicerol acumulada en los espacios libres, que sobreviven. Es así como se hace la aplicación a tejido nervioso (Suda, Kito, & Adachi, 1966). Aplicado a tejido cardíaco supone la muerte voluntaria de cardiomiocitos y la inactividad general del órgano, incapaz de latir y por tanto quedando inútil.



6. Comparativa que muestra al DMSO como más favorable sobre el glicerol.

El glicerol presenta un porcentaje de cristalización demasiado alto con respecto al DMSO a concentraciones superiores al 20%. Esto es desfavorable, pues forzaría a perfundir más crioprotector para evitar la cristalización a la misma temperatura, siendo esta una sustancia tóxica. El DMSO soluciona mejor el problema del crecimiento de cristales a la temperatura de trabajo. Con todo lo anterior, se escoge el DMSO como agente crioprotector preferido para los experimentos en ambos tejidos.

No obstante, el DMSO es altamente tóxico (al igual que el glicerol) a temperatura ambiente, y según concentración a temperaturas más bajas. Es también un disolvente orgánico e inorgánico, lo que hace difícil trabajar con él en circuitos hidráulicos no resistentes a su ataque. Surgen así incidencias y fugas en los circuitos, reparadas con silicona resistente a DMSO, suponiendo un reemplazamiento de algunas partes del circuito cuando se observan problemas. Se incluye en el apéndice de incidencias un archivo con fotos de cómo el DMSO ataca a los circuitos.

Otro factor determinante se encuentra en la composición química del DMSO. La molécula contiene un átomo de azufre, más fácilmente visible al contraste en una tomografía computerizada. Esto facilitará la valoración de la absorción del agente por parte del órgano.

2.2 Experimento de Langendorff

El corazón es perfundido mediante la canulación de la aorta. Con el buffer de perfusión fluyendo de manera retrógrada por la aorta, opuesto al flujo natural fisiológico, la válvula aórtica se cierra bajo presión. Con la columna de perfusato dentro de la aorta, el sistema vascular coronario arterial se llena a través de dos ostium coronarios (izquierdo y derecho) en los respectivos senos de la raíz aórtica. El buffer de perfusión entonces pasa a través de la cama vascular, antes de ser tomado por las venas coronarias al seno coronario en la aurícula derecha, situada verticalmente con el tramo del septo que conecta con la válvula tricúspide en la pared auricular posterior. En la descripción original, la preparación fue perfundida bajo presión constante [...] pero existe la opción de perfusión mediante flujo constante, que ofrece ventajas sobre protocolo experimental (Bell, Mocanu, & Yellon, 2011)

En la fase inicial, se postuló el método de perfusión por presión constante, fácilmente replicable mediante colocación de una columna de buffer de manera que la presión sea la presión hidrostática del fluido. Se calculó que para una presión superior a 60 mmHg bastaba con situar el depósito a 83 cm sobre la entrada de la cánula. Se pasó a perfusión por flujo constante (programando el caudal), y el cálculo de presiones a la salida para mantener los valores dentro del rango deseado. Esto se consigue mediante el diseño de una aguja de perfusión que cumpla esta función.

2.2.1 Descripción de sistemas

A continuación, se expone el montaje general de los equipos para los experimentos, así como una explicación detallada de estos equipos, su funcionamiento y manejo para los experimentos de perfusión aislada Langendorff de corazón.



7. Montaje para experimento de Langendorff.

2.2.1.1 Cirugía

Para la cirugía no fue necesario el uso de ningún equipo específico o complejo, pues casi en su totalidad se realizó con material fungible que será detallado en una tabla más adelante, incluyéndose tanto los instrumentos de cirugía, como el material de apoyo a esta, inyecciones, reactivos necesarios (anestesia y heparina), etc. Sí pudiera comentarse el apoyo de aparatos como la lupa de laboratorio o la báscula de precisión.

La báscula fue el aparato que permitió conocer el peso del animal, para extracción de valores estadísticos posteriores y análisis de datos. La operación de pesado se realizó una vez que el animal había sido sacrificado, pues en el animal tiende a defecar y orinar con la manipulación, y tras la muerte se produce la relajación de los esfínteres, dejando el tracto digestivo y la vejiga vacías y proporcionando una medida más ajustada con el peso real del animal (dados los pesos tan pequeños que se manejarán, en ningún caso superiores a los 50 gramos, esta variabilidad supone un detalle importante para las medidas).



8. Báscula de precisión - uso durante preparación de reactivos.

La lupa de laboratorio proporcionaba un zoom x10 al objeto observado. Para los primeros ensayos del experimento de Langendorff, en la fase de cirugía, su utilización fue crucial para apoyar en la canulación. La visualización de la aorta bajo la lupa y la introducción de la aguja en esta era una tarea que se veía simplificada gracias al aumento. La lupa disponía de una fuente de luz en el fondo, para poder hacer visualización al contraste de los objetos depositados sobre la placa de estudio. En la práctica, esta funcionalidad sólo se usó durante escasos segundos en los primeros experimentos, pues era también fuente de calor, lo que calentaba la placa de Petri y derretía el hielo, reduciendo el tiempo que el corazón podía sobrevivir al aire libre mientras era canulado.

Con el transcurso de los experimentos y la experiencia, fue dejando de ser necesario su uso, pues la aorta se hacía apreciable a simple vista y se podía canular con sencillez.



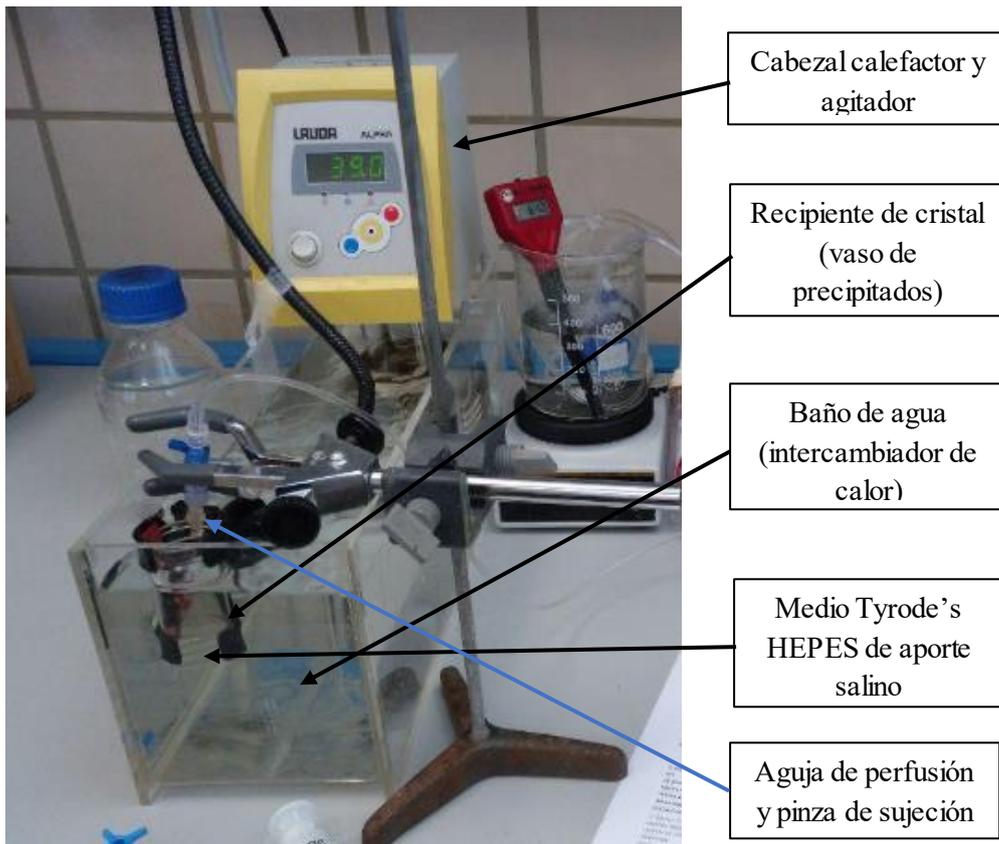
9. Lupa de laboratorio, apoyo a la canulación.

2.2.1.2 Equipo para supervivencia ex-vivo

Se han de garantizar condiciones físicas y bioquímicas similares a las que encuentra el corazón en su entorno de trabajo natural, el cuerpo. Esto es, proporcionar un entorno con la misma temperatura, acidez, concentración salina, cantidad de oxígeno y con un flujo constante de perfusato que simule a la sangre. Se construyó un entorno para el experimento de Langendorff con estas características.

Calentador y agitador

El cabezal de baño caliente creaba las condiciones de temperatura propias del organismo (37°C) a la vez que fijaba un flujo de agua caliente para homogeneizar esta temperatura en todo el baño. Con los botones de selección \uparrow , \downarrow , se elige la temperatura. En la práctica, se comprobó que para el montaje específico se necesitaba una temperatura programada de 38°C, pues el corazón se encontraría sumergido en un buffer Tyrode's HEPES, rodeado por un recipiente de cristal, y en la transferencia de calor se perdían entre uno y dos grados de temperatura.



10. Cabezal creador del medio térmico.

La temperatura del baño es regulada con el propio cabezal, y la temperatura dentro del medio Tyrode's se monitoriza con un termómetro, que nos indica la lectura real del entorno en el que se encuentra el corazón.

Medio Tyrode's HEPES

La solución isotónica llamada Tyrode's es un medio que proporciona soporte vital a órganos mediante la perfusión o baño de los órganos en el mismo. Es semejante al líquido intersticial y también ha sido preparado en el laboratorio y debidamente oxigenado con carbógeno. La solución Tyrode's, además de actuar como amortiguador de pH gracias al bicarbonato, les proporciona energía a los tejidos a causa de que uno de los solutos disueltos más abundantes de la preparación es la glucosa. (Albiol Tortosa, 2019)

La preparación de Tyrodes HEPES se incluye en el anexo de preparación de reactivos. El Tyrode's preparado se compone de 5.844 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.403 g de cloruro potásico (KCl), 0.203 g de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), 0.265 g de cloruro de calcio di hidratado, 2.383 g de tampón HEPES y 4.504 g de glucosa ($C_6H_{12}O_6$). (Albiol Tortosa, 2019)

Calentador y agitador

Como se ha comentado, el medio debe estar oxigenado con carbógeno para garantizar la supervivencia tisular. Es importante, no obstante, que no haya burbujas presentes en el medio (esto se comentará en el circuito hidráulico). Para ello, se recurrió a Air Liquide, que proporcionó al equipo con la bombona de carbógeno, así como el manorreductor y entubado propio para la oxigenación. Ya se disponía de un manorreductor en el laboratorio, pero los acoples no eran los adecuados, y se optó por una solución más segura. En el tratamiento con carbógeno, las bombonas soportan una presión equivalente a más de 150 kg. El manorreductor debía adecuar esto a un rango de salida equivalente de 0 a 5 kg.



11. Superior izquierda: entubado de oxigenación. Inferior izquierda: manorreductor antiguo (izq.) y nuevo (dch.). Derecha: bombona de carbógeno.

La oxigenación de la solución se realizaba mediante la exposición a carbógeno (apertura de manorreductor equivalente a menos de 1 kg) expulsado por un difusor, directamente al recipiente del que se tomaría la solución de Tyrode's.

Para comprobar si se está disolviendo el oxígeno en la solución, se observaba el pH de la solución. Dado que el dióxido de carbono tiene una constante de Henry mayor a la del oxígeno ($3,2 \times 10^{-2}$ frente a $1,3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{atm}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$), cabe esperar que el CO_2 disuelva antes. (Universidad de Granada, n. d.) En condiciones del laboratorio, el volumen de la solución es el mismo y conocido, y el recipiente está abierto a la atmósfera.

La disolución del dióxido de carbono se traduce en la acidificación de la solución, al formar ácido carbónico con las moléculas de agua presentes en medio, y la disociación de estas moléculas produce un aumento de la concentración de iones de Hidrógeno, lo que disminuye el pH. Se comprueba el tiempo máximo para alcanzar la máxima disolución con la estabilización del pH de la solución. Al no poder disolverse más CO_2 , el pH se mantiene constante. Se extendió este tiempo de oxigenación una vez alcanzado el nuevo equilibrio ácido-base de la solución, para propiciar una mayor presencia de oxígeno. Para devolver el pH a un nivel de acidez compatible con el entorno del corazón, se empleó hidróxido de sodio como elevador. Cabe destacar que este proceso no es conveniente repetirlo demasiadas veces, pues el exceso de iones de sodio genera un desequilibrio salino en la solución con respecto al tisular, pudiendo favorecer la deshidratación de los miocitos.



12. Control de pH de la solución de Tyrode's tras oxigenar.

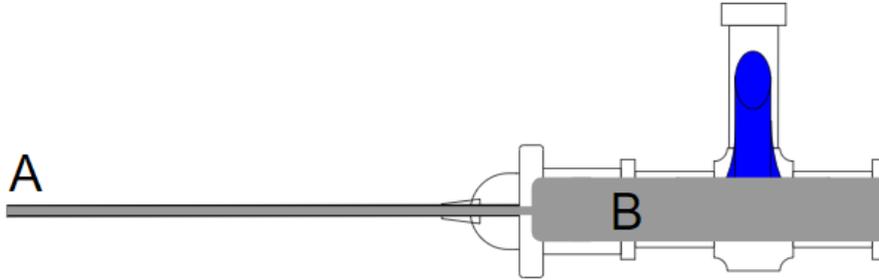
El medio Tyrode's estará en constante circulación mediante un agitador magnético y mosca, tanto durante el proceso de oxigenación como durante la perfusión, para ofrecer el perfusato más homogéneo posible y evitar gradientes salinos, de acidez o de oxigenación al corazón. Su pH se ha de revisar con frecuencia, debiéndose mantener entre 6.5 y 7.5, siendo lo ideal 7.3 según marca la literatura (Bell, Mocanu, & Yellon, 2011). La temperatura no es un factor de excesiva importancia, pues cuando el medio entra en el circuito hidráulico, su temperatura se irá aproximando a la del medio de aislamiento del corazón.

2.2.1.3 Circuito hidráulico

Para la propulsión del perfusato al corazón aislado, se ha de contar con un sistema que garantice presión de salida en el rango de la presión vascular del ratón, y un caudal apropiado al volumen que el corazón puede manejar. Se hace así un estudio de dos bombas presentes en el laboratorio: una bomba peristáltica y una bomba de jeringa HARVARD, propiedad del Dpto. de Fluidos. Se trabajará en las condiciones del circuito hidráulico a utilizar (tubos, longitudes, diámetros y aguja de perfusión). Primero se ha de caracterizar la aguja, pues el estudio de las presiones a la salida de esta es dependiente de su geometría y del caudal que la bomba es capaz de proporcionar.

Estudio de las presiones y caudales del circuito

Caracterizando la aguja, se puede aproximar por la figura que aparece a continuación, con las dimensiones ofrecidas en la tabla.



13. Esquemático de la aguja de perfusión diseñada.

Cuyos valores dimensionales son:

Tabla 2: Dimensiones de la aguja

	Entrada (B)	Salida (A)
Diámetro (m)	0.0045	0.00045
Sección circular (m^2)	1.59E-5	1.59E-7

Debemos elegir un rango de caudales que provoque una presión a la salida inferior a la tensión arterial murina, de 120 mmHg (Roca i Acín, 2001). La geometría de la aguja, siguiendo la ecuación de Bernoulli, determina una relación entre la presión a la entrada y a la salida, que es dependiente del caudal en el punto de trabajo. Al aproximarse la aguja por un tubo de sección constante con un estrechamiento, y otro tramo de sección constante tras este, considerando un fluido poco viscoso y con una densidad similar al agua ($\sim 1000 \frac{kg}{m^3}$), se modela:

$$P_i + \frac{1}{2}\rho v_i^2 + \rho g h_i = cte$$

$$P_{en} + \frac{1}{2}\rho v_{en}^2 + \rho g h_{en} = P_{sal} + \frac{1}{2}\rho v_{sal}^2 + \rho g h_{sal}$$

$$\frac{1}{2}\rho Q^2 \left(\left(\frac{1}{A_{en}} \right)^2 - \left(\frac{1}{A_{sal}} \right)^2 \right) + P_{en} = P_{sal}$$

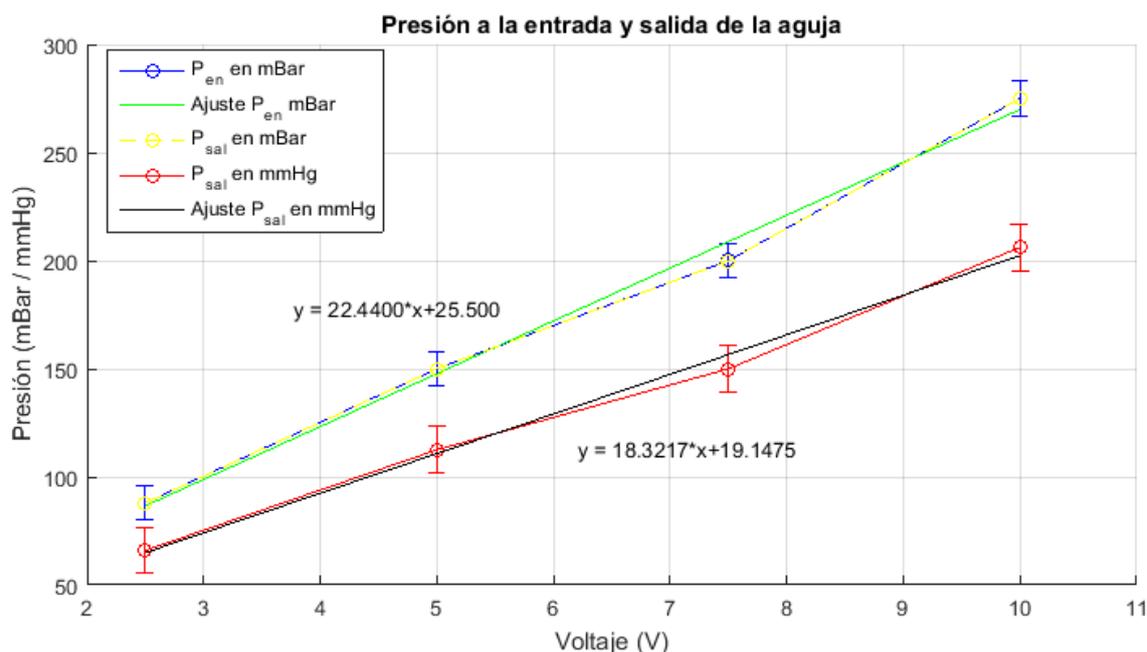
Donde la densidad del fluido es conocida y es la dada arriba. Para los valores de velocidad del fluido antes y después del estrechamiento, se requiere de la ecuación de continuidad, conocido el caudal al que se trabaja:

$$v_{en} * A_{en} = v * A_{sal} = Q_{cte}$$

Donde las secciones A_{en} y A_{sal} son datos conocidos. Este caudal se fijará en varios puntos de operación. Para la caracterización de la aguja se usó la bomba peristáltica, pues era la que estaba a disposición del equipo en el instante de la fase de cálculo. Se fijaron 4 puntos de operación, conocida la razón tensión – caudal de la bomba. Una vez marcado el caudal, se procedió a medir con un manómetro del Dpto. de Mecánica de Fluidos la presión a la entrada del ensanchamiento.

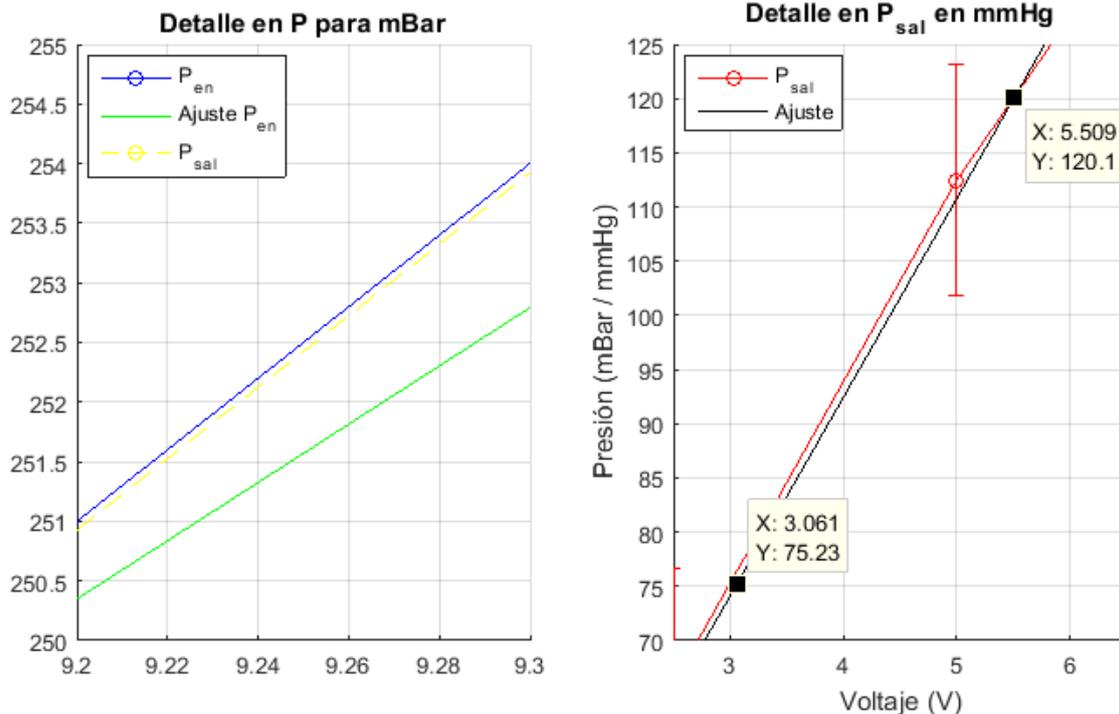
Tabla 3. Resultados del experimento de presión a la entrada vs caudal Q.

Caudal Q (mL/min)	Presión manométrica P ± 8 mBar	v_{en} (m/s)	v_{sal} (m/s)
0.2684	88	2.813E-4	0.028
0.6250	150	6.549E-4	0.065
0.8889	200	9.315E-4	0.093
1.2766	275	1.338E-3	0.134



14. Curvas de presiones a la entrada y la salida de la aguja.

Las curvas se han obtenido tras el paso a unidades del SI (la ecuación de Bernoulli trabaja en pascuales, por lo que deberemos calcular todos nuestros términos para obtener dimensionalmente $\frac{kg}{m \cdot s^2}$, y el cálculo de la presión a la salida de la aguja. Se muestran presiones frente a tensión pues el control que se tiene sobre la bomba peristáltica es en tensión, aunque esto se traduzca en un caudal determinado asociado a dicha tensión. Es de interés destacar dos detalles de las curvas:



15. Detalle de las curvas obtenidas. Izquierda: diferencia entre P_{en} y P_{sal} . Derecha: rango de operación para perfusión.

El primer detalle muestra la pequeñísima diferencia entre la presión a la entrada y la presión a la salida, pero siendo P_{sal} siempre inferior a P_{en} , como dicta el comportamiento de fluidos en un estrechamiento. Esta pequeña diferencia se comprende si se consideran las bajas velocidades a las que circula el fluido por el estrechamiento. Pese a ser la diferencia en la sección de los tubos del orden de 100, y por tanto la diferencia de velocidad del orden de 100, al elevarse al cuadrado valores tan pequeños hacen que apenas se aprecie esta caída de presión. Es de considerarse que la aportación del término de altura, ρgh , es despreciable respecto al valor de P_{en} al encontrarse un extremo elevado 1 cm sobre el otro.

En el segundo detalle se muestra el rango en el que se puede trabajar, proporcionando un voltaje máximo y mínimo para alimentar la bomba peristáltica que genere una presión a la salida en el Intervalo biológico aceptable. Este rango es **3 – 5.5 V**.

Desde el punto de vista del caudal, esto supone un rango entre 0.3 y 0.7 mL/min aproximadamente. Se hará un estudio con una nueva bomba, una bomba de jeringa HARVARD modelo PHD 4400 programable. Esta bomba consiste en un actuador lineal controlado, el cual presiona el pistón de una jeringa (cuyo diámetro ha sido indicado al controlador) para generar un caudal de salida constante.



16. Bomba de jeringa para perfusión Langendorff.

Se hizo la misma caracterización de la aguja, pero esta vez trabajando con los caudales que la nueva bomba es capaz de proporcionar. Para su operación, la secuencia de programación es la que sigue:

1. Presionar el switch de encendido en la parte posterior de la bomba.
2. Presionar el botón Set. En la pantalla aparecerá la pregunta 'Set what?'.
3. Presionar Infuse Rate. En la pantalla aparecerá el caudal programado por el momento. Para modificarlo, seleccionar el caudal en las unidades deseadas (presionar Infuse Rate múltiples veces para cambiar las unidades. En el laboratorio se escogieron mL/min).
4. Una vez elegido el caudal por entrada de teclado numérico, presionar enter. Presionar Run / Stop para iniciar / detener / retomar el programa.

Ante de iniciar el programa, se han de comprobar los bloqueos mecánicos de la jeringa. Esta debe estar firmemente sujeta, con la parte plana del pistón reposando contra el elemento móvil del actuador lineal. La carcasa de la jeringa deberá estar agarrada por la bomba, a fin de evitar deslizamientos, con las protuberancias horizontales bloqueadas en la horquilla.

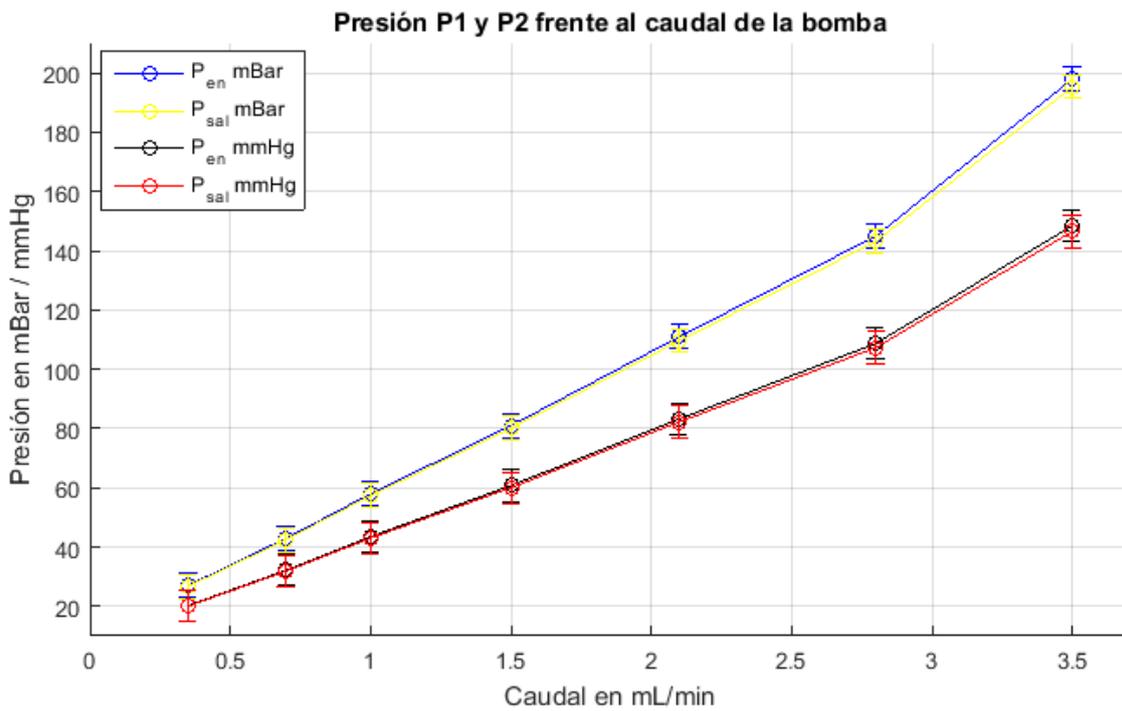
Es muy importante garantizar que la jeringa no se termine durante la perfusión, no sólo desde el punto de vista del experimento, sino desde la seguridad para la bomba. Por ello, se habrá de cambiar con frecuencia la jeringa. Para esta operación se diseñó un circuito hidráulico del que se hablará más adelante.

En el proceso de estudio de la bomba, se comprobó que la aguja que se había estado utilizando previamente tenía un bloqueo geométrico (un estrechamiento en el cuerpo de la aguja, impidiendo al fluido avanzar con normalidad), lo que elevaba la presión de éste. Así, se tomó una nueva aguja de perfusión diseñada y construida de manera idéntica a la anterior, pero sin el bloqueo mecánico de ésta. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 4. Nuevos caudales y presiones

Caudal Q ($\frac{mL}{min}$)	P_{en} (mBar \pm 4 mBar)
0.35	27
0.7	43
1	58
1.5	81
2.1	111
2.8	145
3.5	198

Es importante señalar que la nueva bomba permite trabajar a caudales mucho mayores que la anterior. Se aprecia que las presiones esta vez son menores, una vez eliminado el bloqueo geométrico de la aguja. Se procedió de manera análoga a lo descrito anteriormente. Así, se obtienen los siguientes resultados:

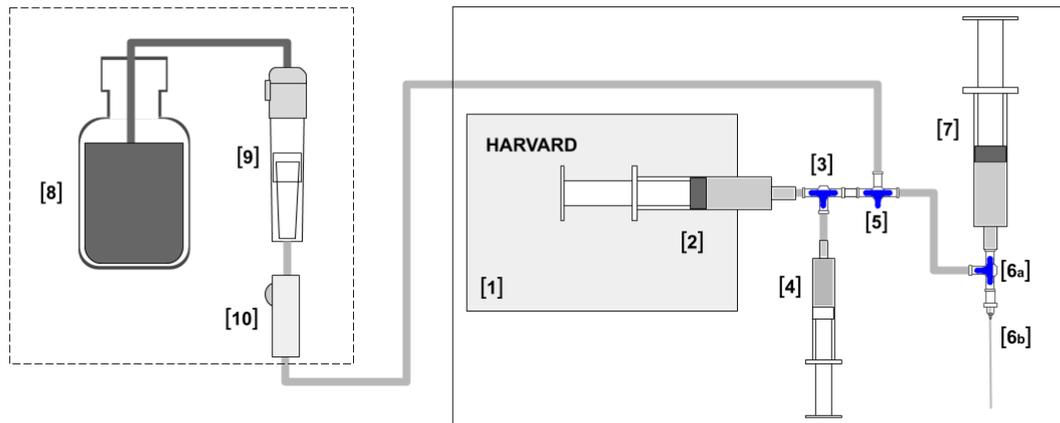


17. Curvas de presiones según caudal. Datos con bomba Harvard.

Esta vez podemos apreciar más diferencia entre las curvas, en parte gracias a una mejor caracterización de la aguja, y también porque a caudales mayores, la velocidad del fluido es mayor y por tanto el término de velocidades de la ecuación de Bernoulli adquiere mayor relevancia frente a las presiones de entrada y salida.

Se puede concluir, por tanto, que la bomba Harvard provee con caudales mayores para el experimento de perfusión. Así, el intervalo de presiones (75 – 120 mmHg) se alcanza con un caudal programado entre 1.9 y 3 mL/min. Teniendo en cuenta que el flujo coronario de un ratón se encuentra confinado en el intervalo 2.0 – 5.5 mL/min (Bell, Mocanu, & Yellon, 2011) se concluye que nos encontramos en el rango ideal de perfusión si se hace uso de la bomba Harvard.

El circuito hidráulico al completo se describe a continuación. Consta de dos etapas: circuito para carga y purga y circuito para la perfusión.



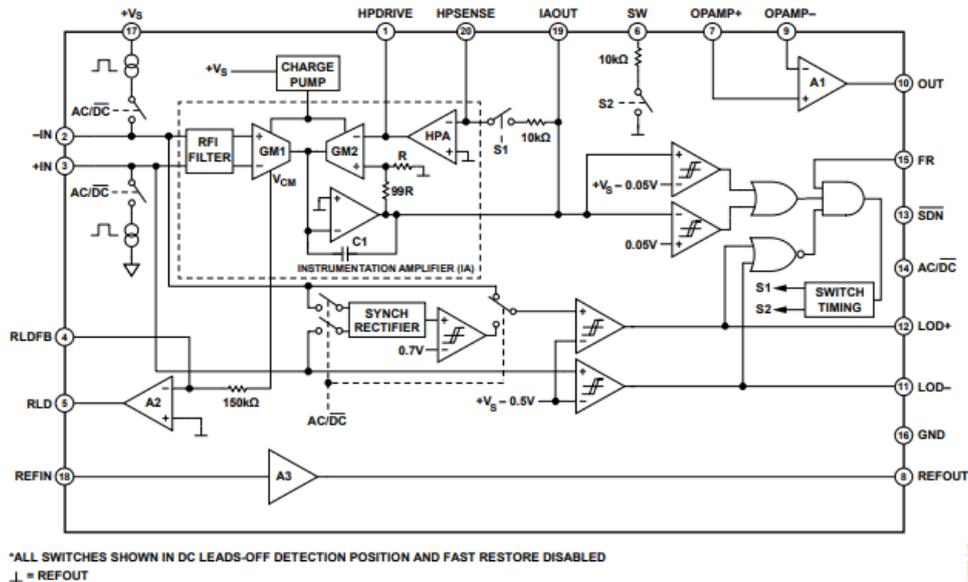
- | | | | |
|------|---|------|---|
| [1] | Bomba de perfusión por jeringa HARVARD PHD 4400 | [7] | Jeringa de emergencia, perfusato frío de canulación |
| [2] | Jeringa con perfusato oxigenado y filtrado | [8] | Depósito de perfusato oxigenado y con burbujas |
| [3] | Luer 1, conexión jeringas [2] y [4] | [9] | Filtro de burbujas |
| [4] | Jeringa de llenado rápido y purga | [10] | Regulador de paso de perfusato filtrado |
| [5] | Luer 2 de carga inicial | | |
| [6a] | Luer 3, conexión de jeringa de emergencia y aguja | — | Circuito 2, carga inicial, etapa 1 |
| [6b] | Aguja de perfusión | - - | Circuito 1, perfusión, etapa 2 |

18. Diagrama del circuito hidráulico para perfusión Langendorff.

Siguiendo la numeración de la figura, la bomba Harvard [1] ejerce presión sobre el pistón de la jeringa principal de perfusión [2]. Esta, cuando la llave de tres vías Luer [3] está en posición de paso principal, perfunde con Tyrode's hasta [6a], donde el rutado de la llave dirige el perfusato hasta la salida de la aguja [6b]. La jeringa [4] es una jeringa de emergencia y precarga. Su función es depurar los conductos de toda posible burbuja de aire, y cebar el conducto principal antes de cada perfusión. La llave [5] se habilita cuando se va a cargar la jeringa principal. Esto se realiza mediante el filtro médico de burbujas [9] si se ha habilitado el bloqueo [10]. El depósito [8] contiene Tyrode's oxigenado, en el que hay posibilidad de presencia de burbujas, y por ello se requiere el filtro [9]. La jeringa [7] es residual de la canulación, y se utiliza para perfundir durante el proceso de programación de la bomba y conexión de los tubos, para no interrumpir la perfusión.

2.2.1.4 Equipo para electrocardiografía

El circuito que se usará para medir la señal eléctrica del corazón está basado en el AD8232 de Analog Devices, un Front End Analógico (AFE) SGL-Lead para ECG (Analog Devices), junto con su adaptación de pines E/S digitales y analógico, alimentación y toma de datos con electrodo.

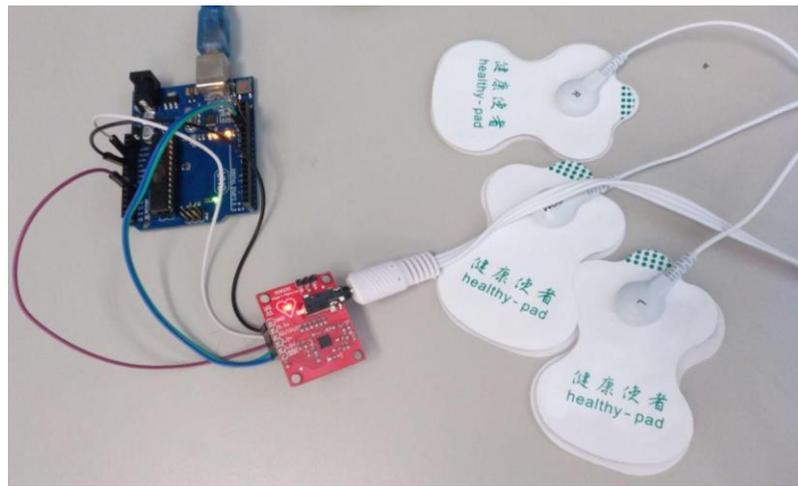


119. Esquemático del AD8232 para medición.

Consta de un amplificador de instrumentación con amplificadores de transconductancia y un prefiltro RFI, además de un OPAMP adicional, un amplificador RLD, búfer de referencia, circuito de recuperación rápida y circuito de detección “leads-off”. (Analog Devices)

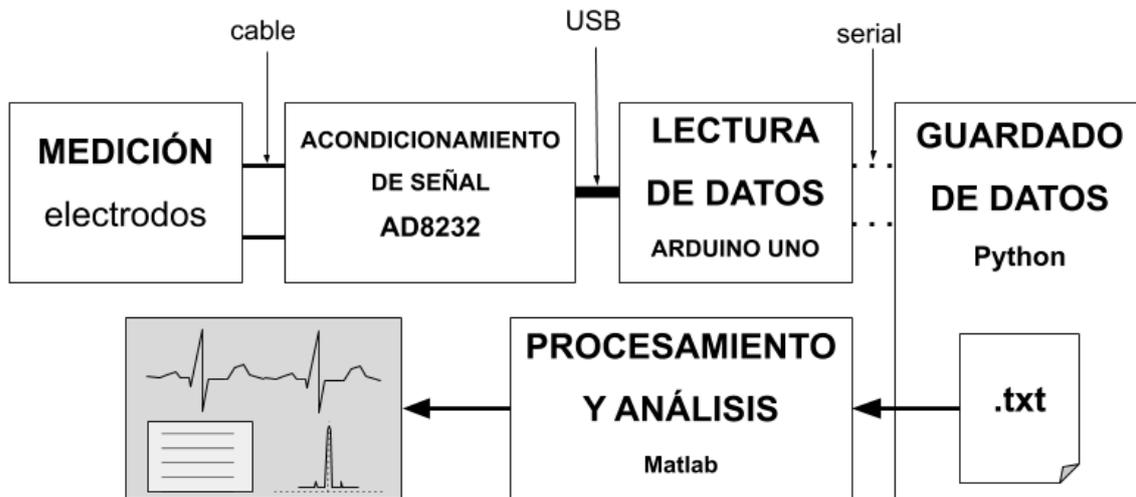
El paquete incluye la placa de medición, tres electrodos (R, L y COM) y diversos pads adhesivos para colocar y acoplar los electrodos.

El electrodo R se coloca bajo el pectoral derecho, L bajo el izquierdo y COM en el lateral derecho del abdomen.



20. Contenido del paquete preparado para medición.

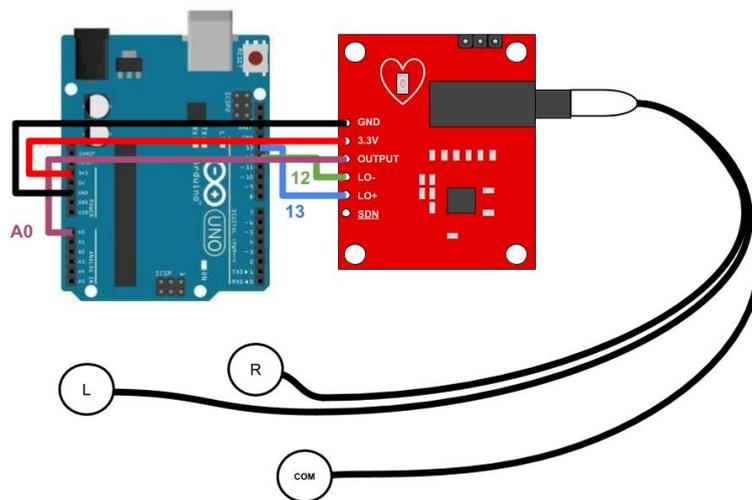
Bloques del experimento ECG



21. Esquema de bloques para el experimento ECG.

Conexión en Arduino y toma de datos

Se conecta el Leads-off + al pin digital 13, y el Leads-off – al pin digital 12. Las lecturas se harán por puerto analógico (A0) y alimentaremos el circuito con 3.3V nivel lógico.



22. Esquema de conexión Arduino UNO y placa ECG.

Los datos se envían a través de comunicación serial por el puerto COM14 en un string que contiene 2 datos y 3 almohadillas para segmentación, lo que lo hará más fácil de cortar posteriormente en otros programas. El primer dato es el instante de tiempo (se crea una variable contador interno que incrementa cada 10 ms) y la segunda con el valor de la señal adquirida y entregada por el AD8232.

Guardado de datos en Python

Puesto que Arduino no dispone de un método de guardado de datos per se, se ha optado por enviar esta información a un programa en Python que interpreta los *string* recibidos por COM14 y los guarda en un fichero de texto. El código se incluye en el ANEXO de códigos, y no es necesario comentar nada más al respecto.

Pruebas con personas

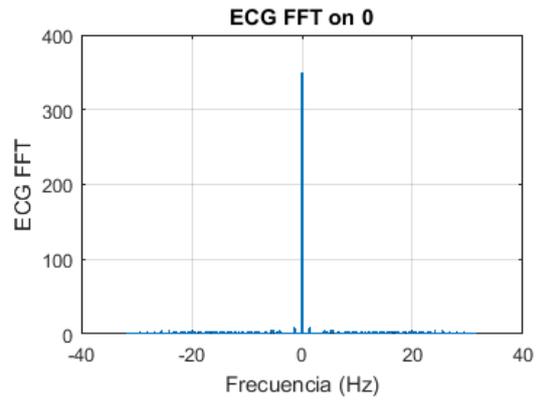
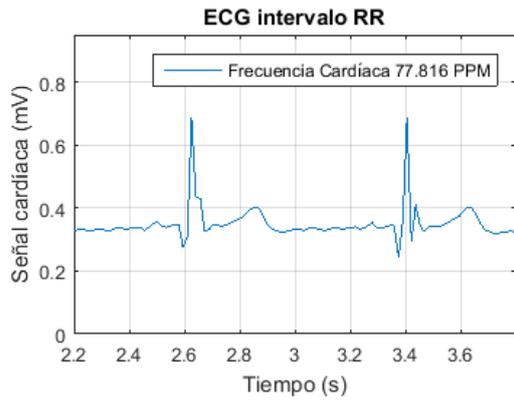
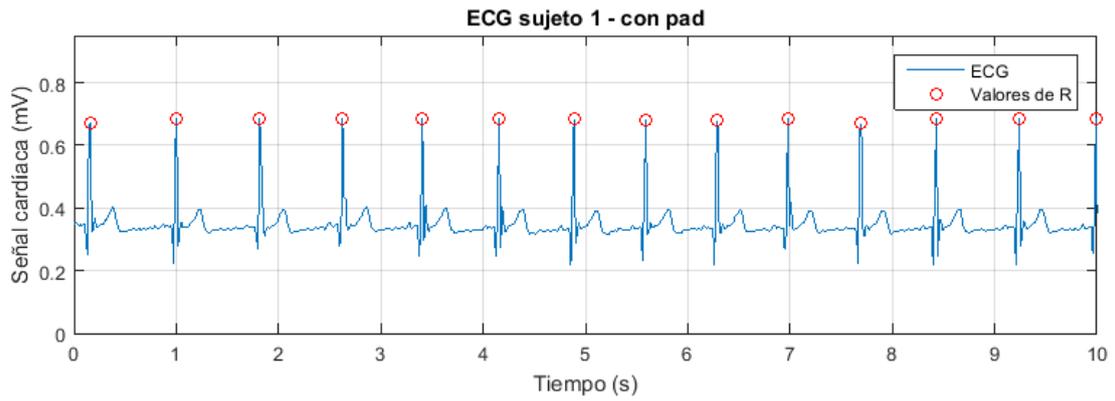
Consideraciones para la toma de medidas

1. **¡Precaución!** Mantener el cable del cargador del portátil desenchufado en todo momento. Estaremos conectados con electrodos a él mediante el Arduino, haciéndonos susceptibles a la tensión de red y esto puede resultar mortal.
2. Usar cables cortos de conexión entre los electrodos y la placa. Usaremos los que vienen por defecto, consideramos que la longitud es adecuada al no superar los 30 cm.
3. Mantenerse inmóvil durante las medidas. Una alternativa es colocar los electrodos bajo los pectorales y el abdomen, pero ha de evitarse cualquier actividad muscular ya que interferiría su señal mioeléctrica con la señal medida del corazón.
4. Colocar los adhesivos sin dejar bordes levantados, en especial si se llevarán bajo la ropa. Queremos un buen contacto entre el pad y la piel, en última instancia de forma directa y sin tejido en medio.
5. Se ha observado una anomalía en los electrodos, y es que el conexionado parece estar invertido. Cuando se colocan los electrodos R y L bajo los pectorales derecho e izquierdo, respectivamente, se obtiene la señal invertida en el eje de abscisas. Esto no se considera normal, pero para obtener las medidas se procede a cambiar los electrodos de orden. Se desconoce qué efecto tendrá esto sobre la señal emitida por un corazón de ratón fuera del cuerpo.

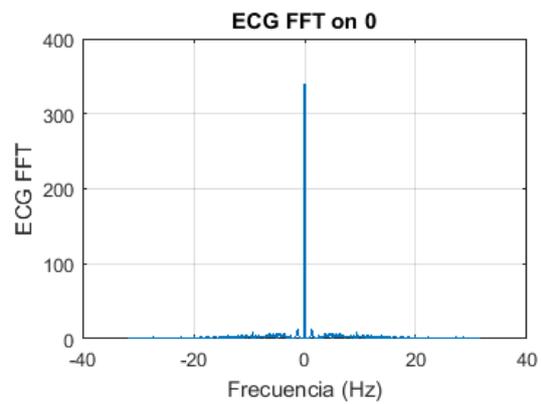
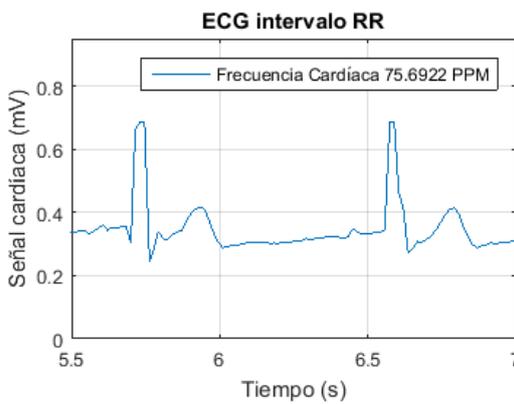
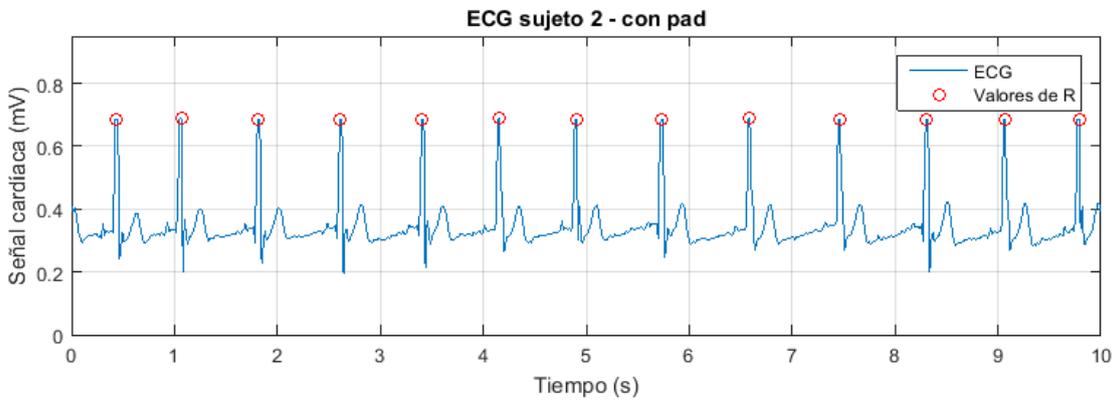
Resultados

Tabla 4. Datos de ECG de pruebas con personas.

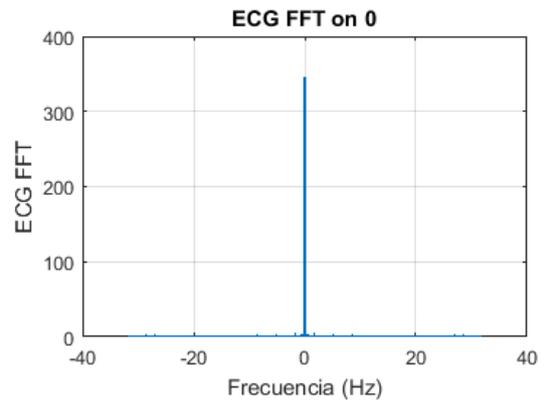
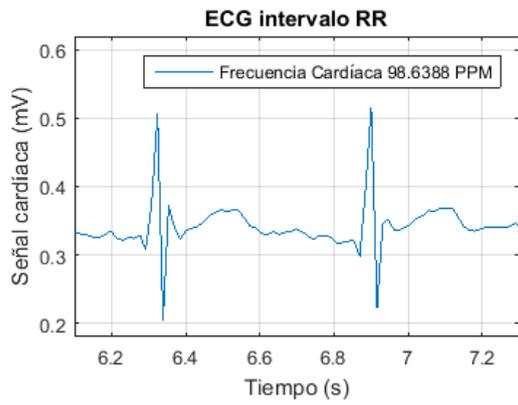
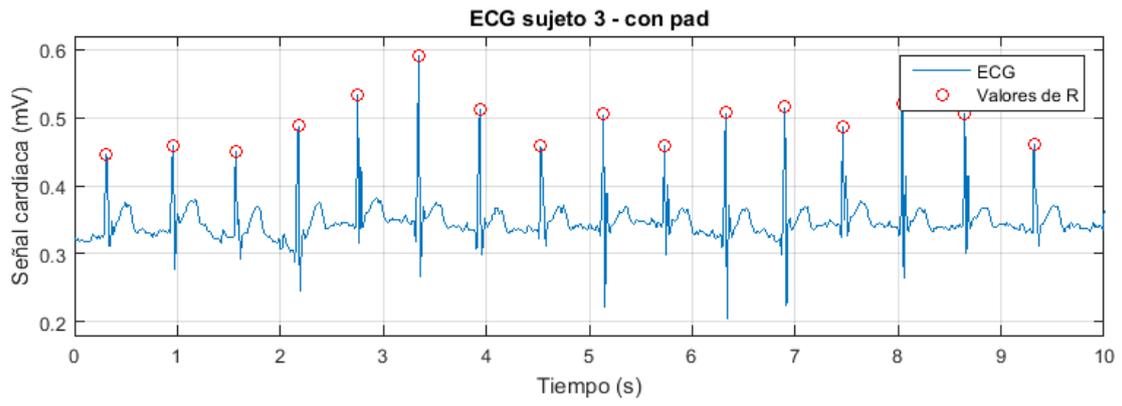
Sujeto	Frecuencia cardíaca (ppm)	Intervalo RR (s)	Magnitud del pico R (mV)
1	77.816	0.771	0.332
2	75.692	0.793	0.341
3	98.639	0.608	0.151
4	67.586	0.888	0.202



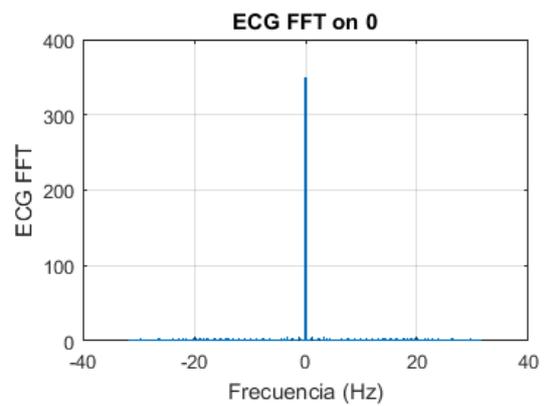
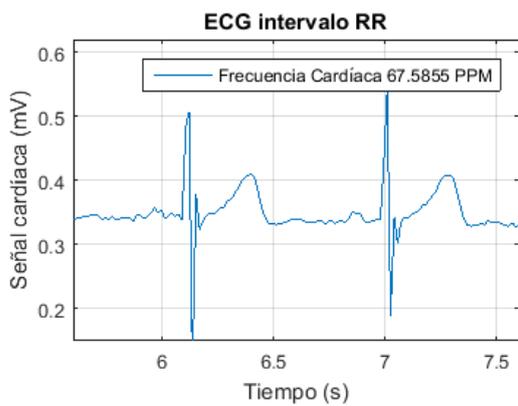
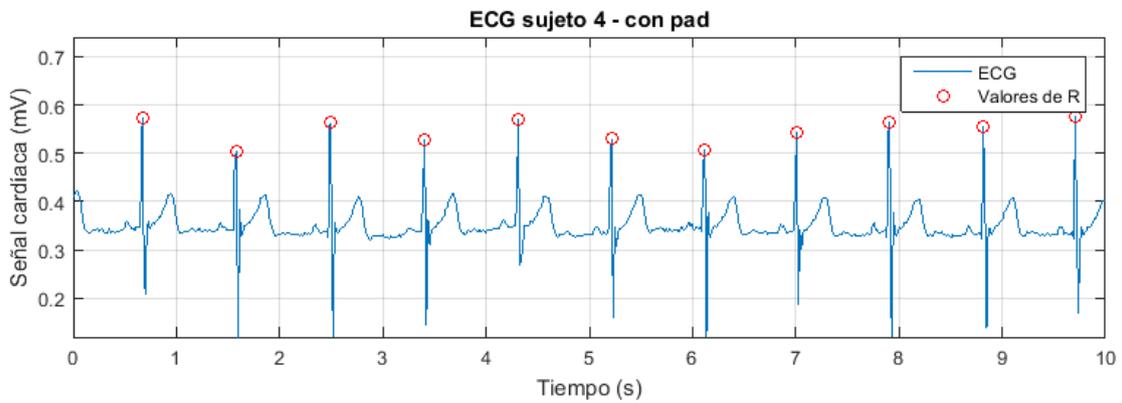
23. ECG y análisis del sujeto 1.



24. ECG y análisis del sujeto 2.



25. ECG y análisis del sujeto 3.



26. ECG y análisis del sujeto 4.

Elaboración de electrodos propios

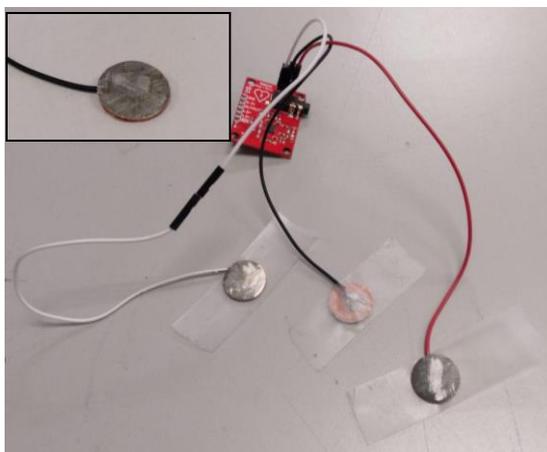
La necesidad de un parche adhesivo dificulta la obtención de ECG en ratones debido su tamaño. Para paliar esto, se procedió a construir unos electrodos adicionales, que se conectarían a los puertos LA, RA y RL de la placa electrónica.

Construcción de los electrodos

Los electrodos se elaboraron con 3 monedas de 1 céntimo² de Euro. Se lijó el recubrimiento de cobre en una cara hasta dejar expuesto el acero, que usaremos como electrodo. Así obtenemos una superficie suave y homogénea para el contacto con la piel.

A la parte trasera (cubierta de cobre) de las monedas, se añadió una generosa gota de estaño para soldar, y se soldaron cables de cobre para placas de prototipado. Estos cables están crimpados en el otro extremo, facilitando la conexión con la placa del AD8232.

Para aislar la cara conductora y las conexiones, se cubrió con cinta adhesiva. Para colocar sobre el cuerpo, una segunda tira de cinta adhesiva. El cable de conexión RL, normalmente usado como tierra o COM cuando hay 3 electrodos, se hizo más largo para poder llegar a la parte abdominal. Se estaño también la zona central de la cara expuesta de los electrodos.



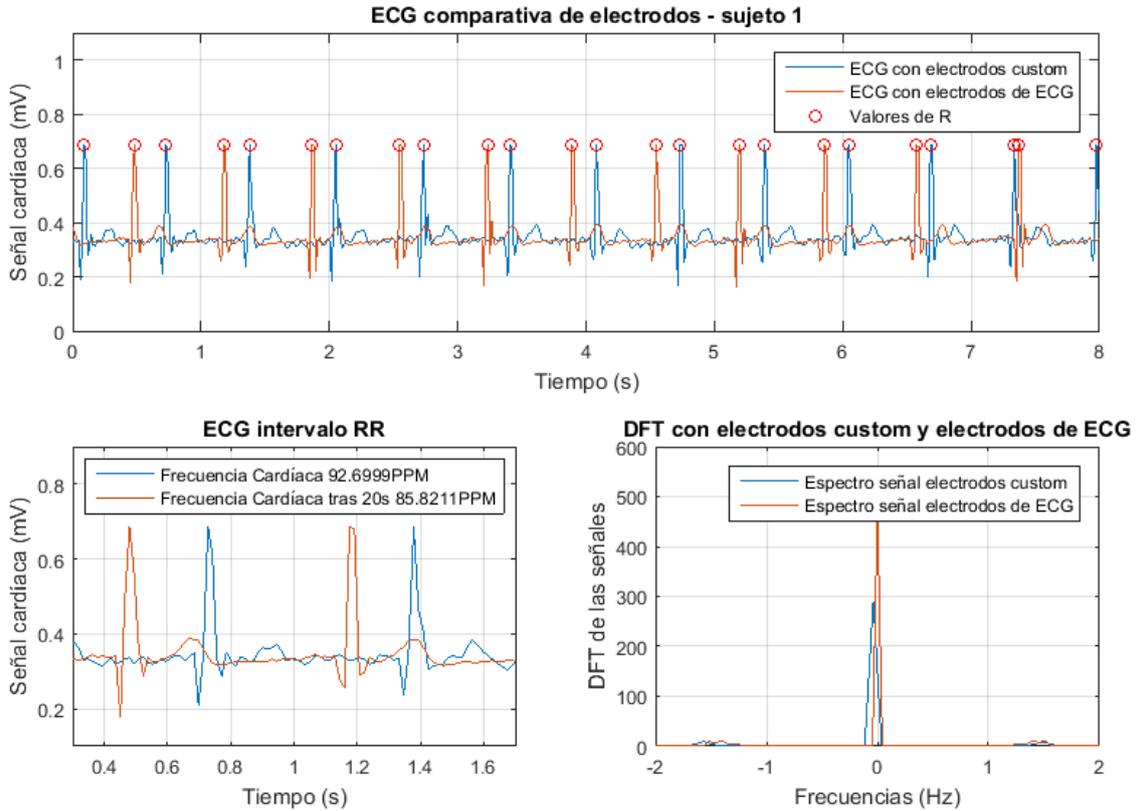
27. Electrodos elaborados en el laboratorio.

Pruebas en personas y comparación con los electrodos de fábrica

Se procedió a hacer una medición comparativa del funcionamiento entre los electrodos elaborados y los que incluía la placa para ECG. Para ello, se tomaron lecturas secuenciales en el mismo sujeto, primero con los electrodos ‘caseros’, y 20 segundos más tarde con los que incluía el kit de AD8232.

² Esta idea fue tomada del canal de YouTube Optivity, en un vídeo subido en 2014. ‘Electrodo penique’.

Nota: La diferencia entre frecuencias cardíacas no es producto de la medición sino del propio sujeto, más nervioso al inicio del experimento y más calmado al final, con respiraciones más profundas y pausadas.



28. Comparativa de dos ECG con diferentes electrodos.

El desfase en el tiempo se debe a que no se iniciaron ambas mediciones en el mismo instante de pulsación, por la complicación que eso requería. Podemos comparar aun así ambas señales. Las variables medidas fueron:

Tabla 5. Datos extraídos del análisis ECG comparativo de electrodos.

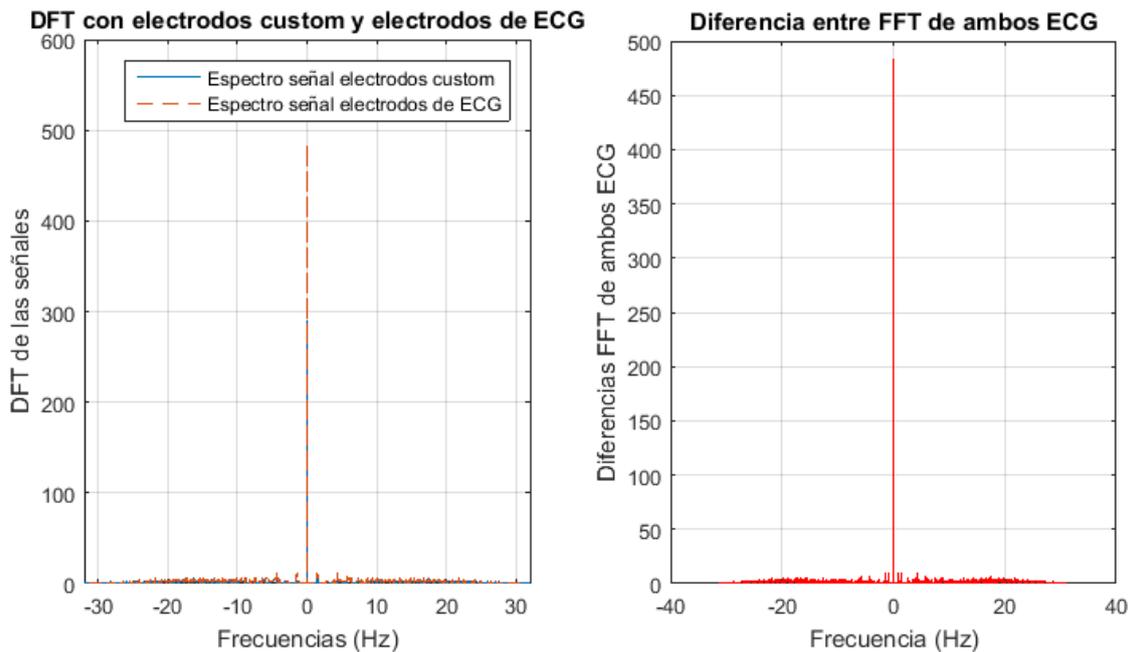
Electrodos	Frecuencia cardíaca (ppm)	Intervalo RR (s)	Magnitud del pico R (mV)
Elect. Elaborados	92.700	0.6472	0.3324
Elect. del kit	85.821	0.699	0.3379

Obviando las dos primeras columnas, afectadas por el estado del sujeto, vemos que la altura del pico R es muy similar, lo que indica que ambos electrodos miden bien las diferencias de potencial. Se pueden observar de forma no demasiado dificultosa las formas de ondas P, completo QRS y T, con cierto rizado o ruido – es de suponer que se debe a que los cables no son idénticos y sus soldaduras tampoco, de ahí que no se elimine con el amplificador diferencial del AD8232.

Si observamos los espectros de ambas señales, podemos ver un zoom en las frecuencias más bajas en la Figura 12. En la Figura 13 se ofrece todo el espectro de frecuencias, así como la diferencia entre ambas señales:

$$abs(abs(fft(ECG_1)) - abs(fft(ECG_2)))$$

Observamos que la señal de los electodos elaborados presenta un pico mucho menor (aproximadamente la mitad) que aquel ofrecido por la señal de los electodos de fábrica.



29. Comparativa de los espectros de ECG con diferentes electodos.

A la izquierda, se aprecia la superposición de ambos espectros. La componente en 0 no es idéntica, sino que se halla desplazada como se podía observar en la Figura 28. Esto provoca que no se eliminen en 0 y en la diferencia aparezcan la una al lado de la otra. Podemos observar unas componentes similares a otras frecuencias, si bien su superposición no es exacta y la diferencia aún deja componentes por encima de los 2.5 Hz.

Hasta aquí el análisis comparativo. Visto esto, los electodos se consideran aptos para realizar mediciones sobre los ratones.

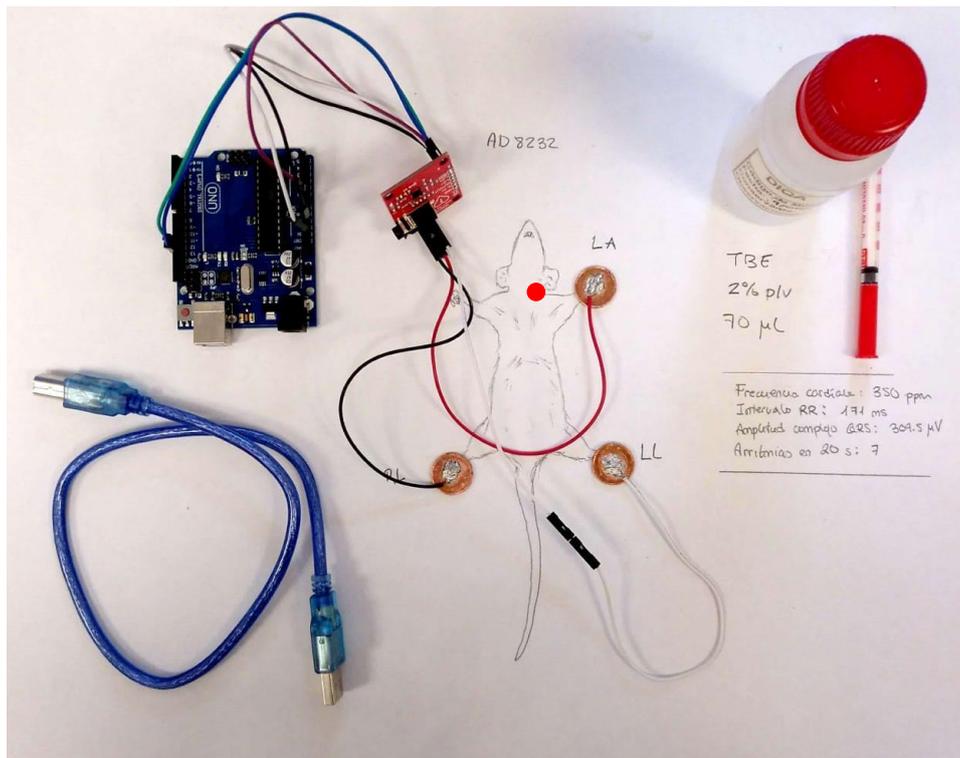
Pruebas con ratones

Obtener el ECG de un ratón vivo y consciente es complicado, siendo lo más común recurrir a técnicas invasivas o medir con ayuda de anestesia. El ratón está en constante movimiento y restringir sus pasos podría dañarle. Dado que no deseábamos poner en riesgo la salud del ratón y evitar el mayor daño posible, se suministró al ratón de prueba una dosis de 70 μL de tribromoetanol (TBE) al 2%.

Tabla 6. Datos del ratón para el experimento 1.

Especie	Identificativo (cepa)	Sexo	Eda
<i>mus musculus</i>	FVB	Hembra	5 semanas

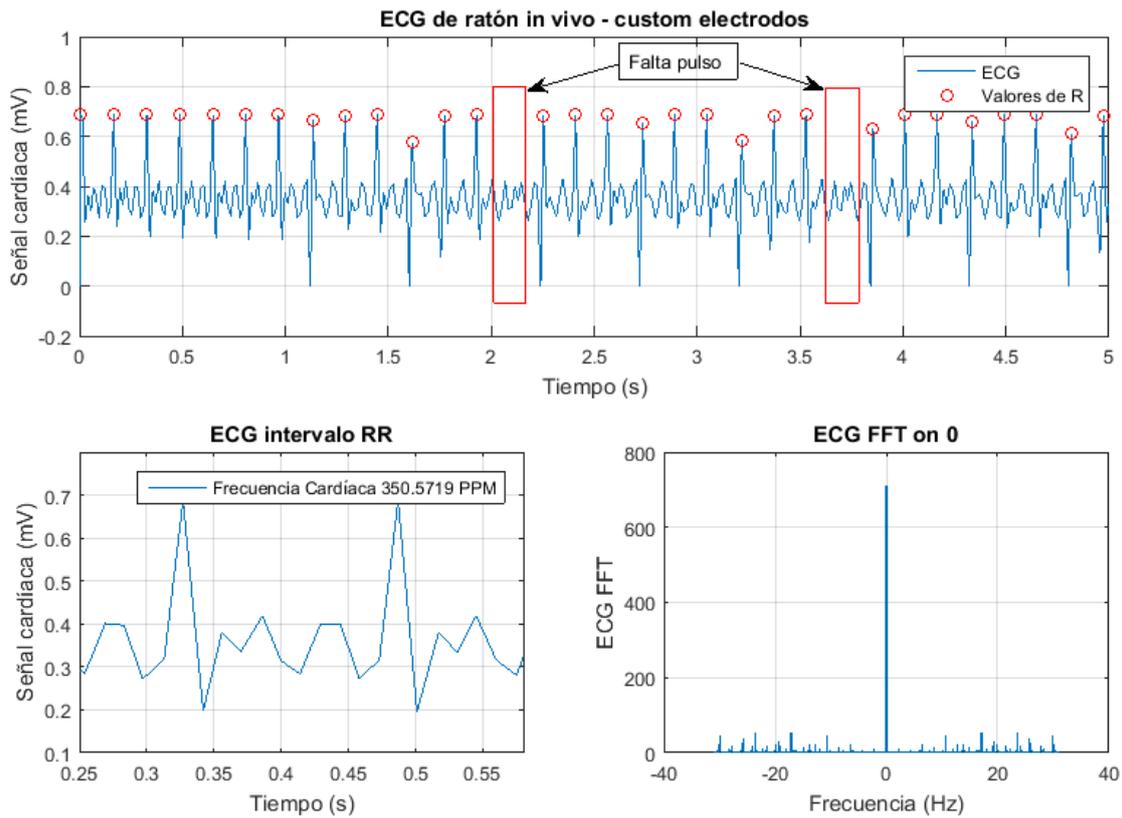
Se colocaron los 3 electrodos (Shupeng, Minmin, Xiumei, & Junyi, 2007) de la siguiente forma: el electrodo RL a la pata trasera izquierda; el electrodo LA a la pata delantera izquierda; el electrodo RA a la pata trasera derecha. Se forma así un triángulo entre las tres patas, con el corazón en la hipotenusa. En la siguiente Figura se ofrece la disposición del experimento.



30. Material y disposición del experimento ECG de ratón.

Es de esperar que el ritmo cardíaco del ratón se reduzca considerablemente una vez que la anestesia haga efecto. La dosis suministrada es suficiente para permitirnos manipular sus patas y colocar cuidadosamente los electrodos, sin que el ratón se encuentre en un sueño profundo o vea su ritmo cardíaco reducido en exceso.

Se recogió una secuencia de 20 segundos de la actividad del corazón. A continuación, se ofrecen los primeros 5 segundos en detalle, en un análisis similar al realizado con las secuencias humanas.



31. Secuencia ECG de FVB anestesiado con TBE.

Se pueden observar las formas de onda no con demasiada dificultad, siendo el completo QRS claramente visible. Esto nos permite calcular la frecuencia cardíaca y la amplitud de dicha onda. Observamos la elevada frecuencia cardíaca, aún bajo los efectos de la anestesia.

En lo que al espectro refiere, observamos componentes de importancia a frecuencias donde antes no estaban presentes. Bien puede ser por la mayor frecuencia de los pulsos de la señal ECG, o por el propio ruido de los nuevos electrodos – aunque es una frecuencia bastante baja para ser ruido (30 Hz es muy baja frecuencia).

Tabla 7. Datos ECG bajo influencia del TBE.

Sujeto	Frecuencia cardíaca (ppm)	Intervalo RR (s)	Magnitud del pico R (mV)
Ratón FVB	350.572	0.171	0.309

Segunda prueba

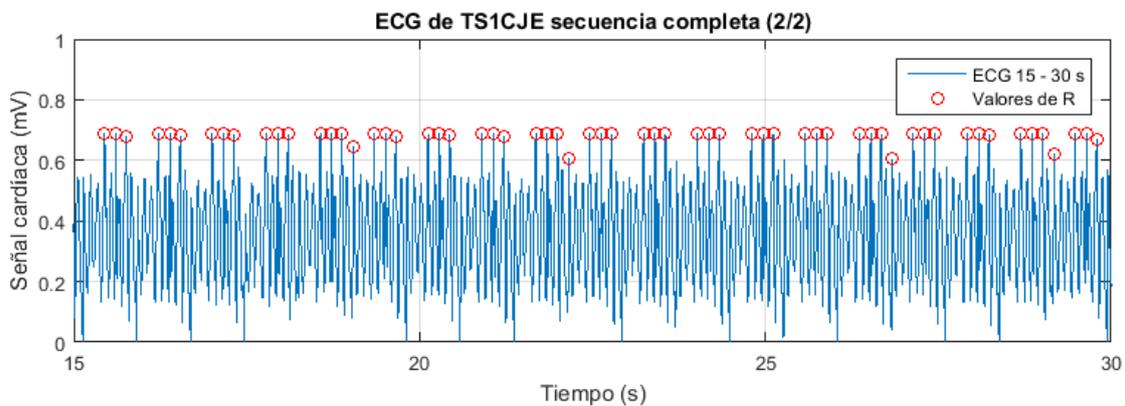
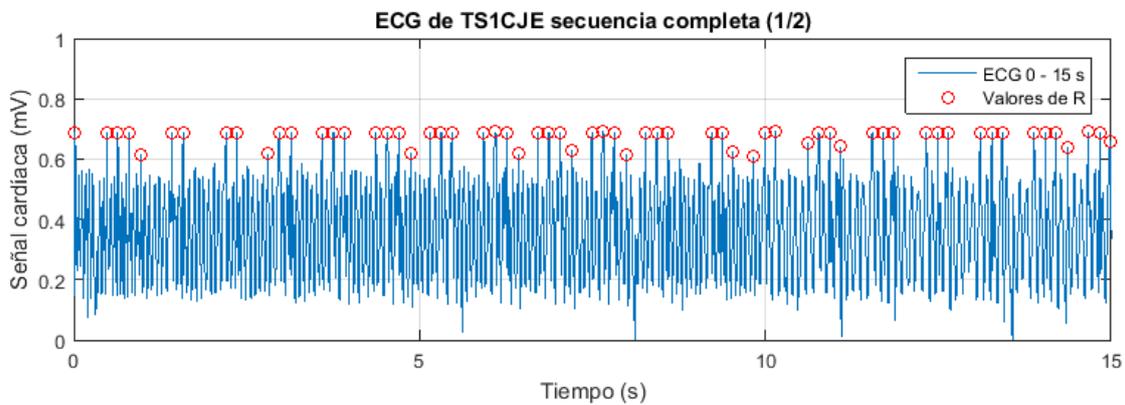
Se realizó otro análisis con un ratón cepa TS1CJE, con síndrome de Down. Los datos son los siguientes:

Tabla 7. Datos del ratón para el experimento 2.

Especie	Identificativo (cepa)	Sexo	Eda
<i>mus musculus</i>	TS1CJE	Macho	11 meses

Anotaciones:

- Se administró Tribromoetanol al 2% como anestésico en varias dosis. Este ratón tenía un peso superior en 14 gramos al que se realizó el ECG previamente, lo que supone un aumento de peso en un 54%. Se aumentó la dosis de anestesia a $120 \mu\text{L}$. No obstante, esto no resultó suficiente, y se requirieron múltiples administraciones hasta un volumen total de $400 \mu\text{L}$ para poder manipular la patas del ratón sin demasiada dificultad, pese a que aún estaba consciente y moviéndose con regularidad.
- Se registró un alto ruido en los electrodos. Las conexiones fueron las mismas que las empleadas con el ratón FVB. No obstante, la altura de los picos del completo QRS es suficiente para diferenciarlos del resto de la señal. No son apreciables el resto de las ondas típicas de ECG. Se considerarán mejoras para esto.
- Se observó que los latidos eran inconstantes y se encontraban en trenes de tres pulsos seguidos, lo cual se puede deber a dos cosas. 1) O bien el ruido de los electrodos y el tiempo de muestreo es insuficiente para obtener puntos claros que marquen el completo QRS, o bien el ratón mostraba un pulso inconstante debido a 2.a) los efectos de la anestesia o 2.b) alguna cardiopatía derivada de su síndrome de Down.

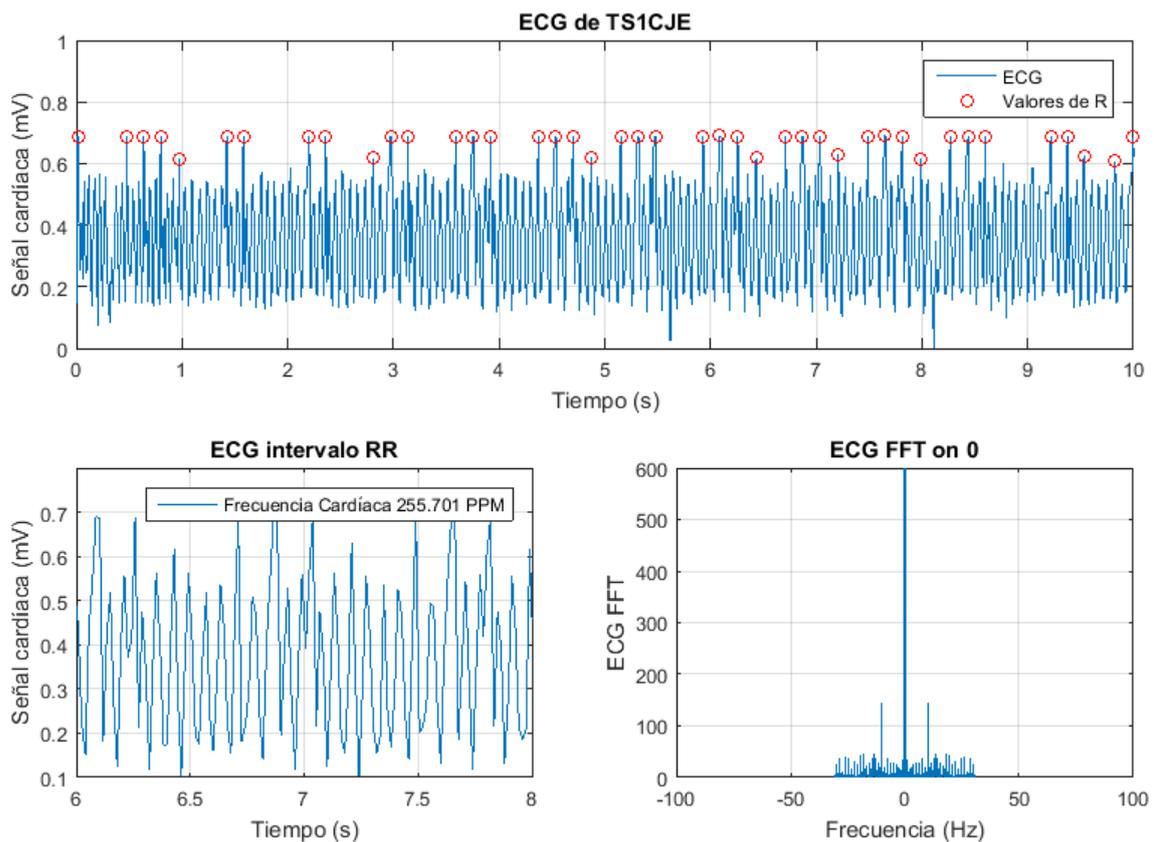


32. Secuencia completa del ECG de TS1CJE.

Se comprueba la frecuencia de muestreo del sistema utilizado. El número de muestras de la secuencia es de 3000. La duración, en segundos, es de 30. Esto nos deja un total de 100 muestras por segundo. Si la frecuencia cardíaca de un ratón en estado activo puede llegar a las 800 PPM, esto nos deja con $\left(\frac{800}{60}\right) = 14 \text{ PPM}$.

Trazando comparativas, la duración aproximada de un intervalo RR en humanos según los datos extraídos en apartados anteriores es de 0.65 segundos. El complejo QRS tiene una duración media de 0.1 segundos (University of Nottingham). Esto supone un 15% de la duración total de cada tren PQRSTU. Extrapolando estos datos al ratón, con 14 PPM (1 pulsación cada 0.07 segundos) tenemos que el completo QRS completo tiene una duración de 0.01 segundos. Esto es justo con la ventana de muestreo usada. Concluimos, entonces, que:

1. No poseemos un sistema que muestree a frecuencias suficientemente altas como para visualizar los complejos QRS de ratones con la frecuencia cardíaca acelerada.
2. Que, a frecuencias menores, podemos estar perdiendo información, y así es. Optaremos entonces por calcular la frecuencia cardíaca con un nuevo método, que se describirá más adelante.



33. ECG de TS1CJE tras anestesiarse.

En el espectro se puede observar una componente a 10.42 Hz de frecuencia. Esto nos supondría una frecuencia cardíaca, si fuere por relación de la señal, de a $10.42 * 60 = 625.2 \text{ PPM}$, lo que se

halla bastante cerca de la frecuencia cardíaca típica de *mus musculus*, como se puede encontrar en artículos.

Para calcular la frecuencia cardíaca se tomaron dos vías:

- La natural usada para todos los ECG hasta ahora, que consiste en calcular los instantes de tiempo en que se producen los picos de R, calcular el periodo medio entre picos R (intervalo RR), y calcular la frecuencia cardíaca media a partir de estos datos.
- La vía alternativa que consiste en calcular el mínimo intervalo RR, considerando pulso inconstante, y obtener así una frecuencia cardíaca máxima. En este caso concreto se optó por este método, pues los trenes de pulsos QRS separados de forma equidistante en el tiempo nos indican que la frecuencia cardíaca sería mucho mayor a la obtenida en la media.

Esto es:

Tabla 8. PPM según cálculo

Dosis total de anestesia	PPM media	PPM máxima
160 μ L TBE al 2%	255.701	405.405

Tercera prueba

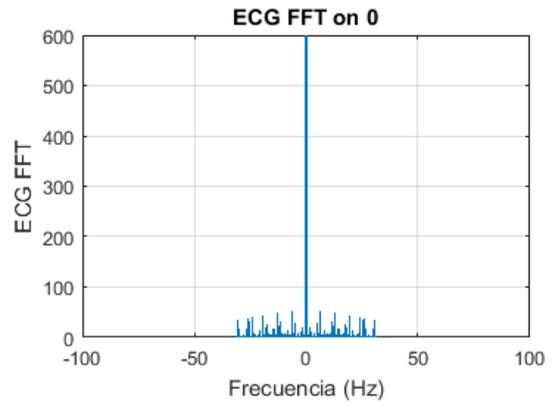
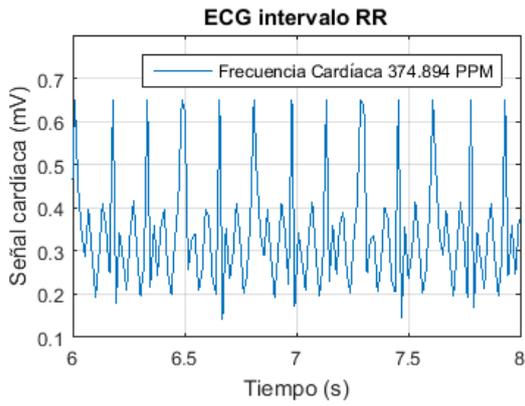
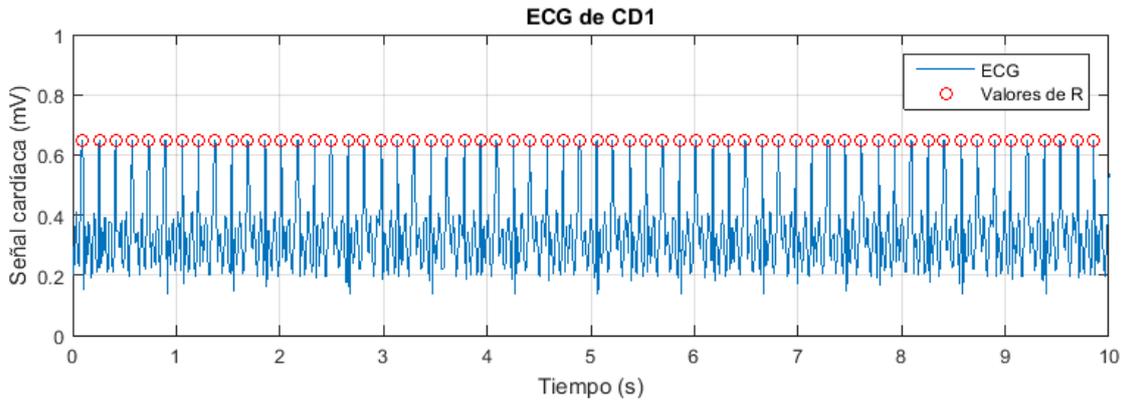
Tabla 9. Datos del ratón para el experimento 3.

Especie	Identificativo (cepa)	Sexo	Eda
<i>mus musculus</i>	CD-1	Macho	8 meses

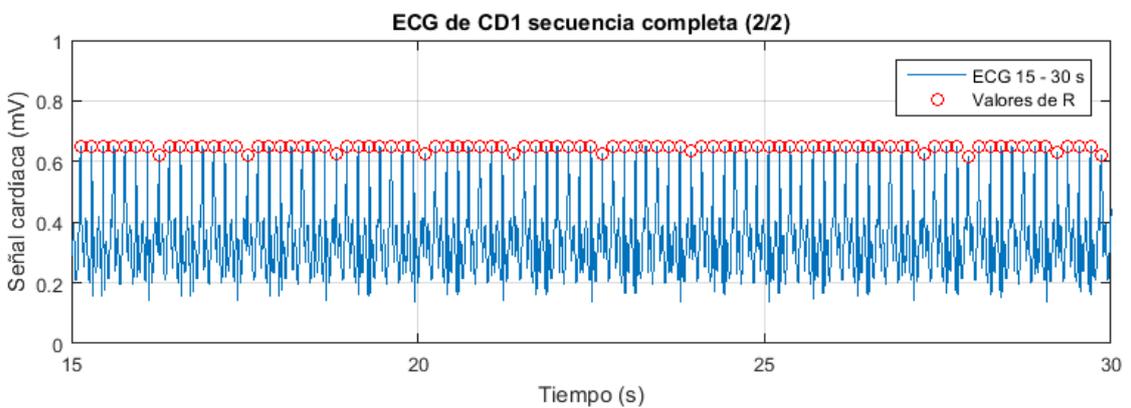
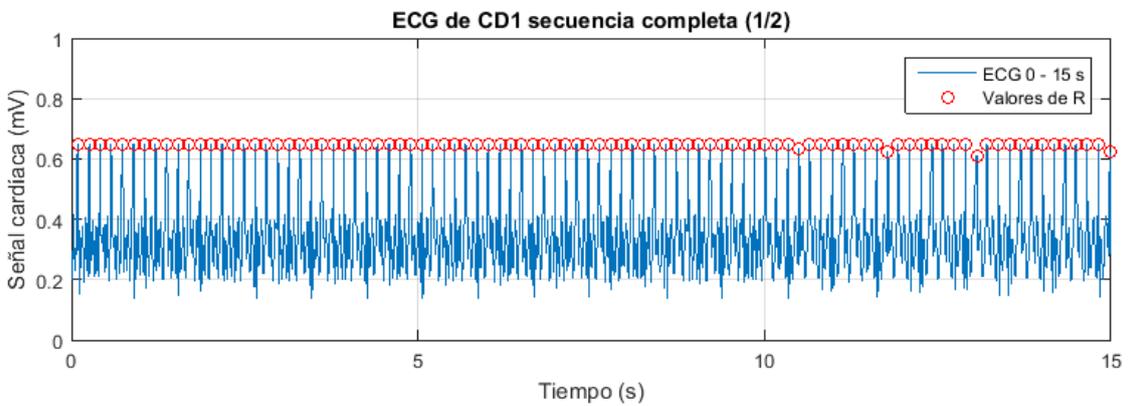
Los resultados obtenidos tras anestesiarse con 100 μ L de TBE fueron los siguientes:

Tabla 10. Datos ECG bajo influencia del TBE.

Sujeto	Frecuencia cardíaca (ppm)	Intervalo RR (s)	Magnitud del pico R (mV)
Ratón CD-1	374.891	0.16	0.307



34. ECG de CD-1 tras anestesiación (100 μ L).



35. Secuencia completa ECG de CD-1.

Estableciendo una comparativa, como se ofrece en Ho et al., *Heart Rate and Electrocardiography Monitoring in Mice*, se puede ver la frecuencia cardíaca según la anestesia utilizada:

Tabla 11. Comparativa de frecuencia cardíaca y anestesia utilizada. (Ho et al., 2011)

Anestesia	Avertin	Ketamina / Xilacina	Pentobarbital	Isoflurano
PPM	411 ± 17	159 ± 11.8	377 ± 11	457 ± 17
Fuente	Yan et al., 2007	Erhardt et al., 1984	Yang et al., 1999	Stypmann, 2007

Se observa que la dosis alrededor de 100 uL de TBE al 2% administrada se obtuvieron latidos en la centena de los 300 ppm. Se puede comparar con el Pentobarbital, aunque es necesario más testeo para hacer una comparativa sólida.

Se valida el equipo de ECG para uso murino como capaz de tomar lecturas de la frecuencia cardíaca de un ratón in-vivo. Los resultados obtenidos con éste en el experimento de Langendorff se detallarán en el capítulo de Resultados, donde la medición ex-vivo es más crítica y complicada, y necesariamente requerirá de los electrodos elaborados propios.

2.2.2 Procedimiento experimental

Objeciones y consideraciones previas

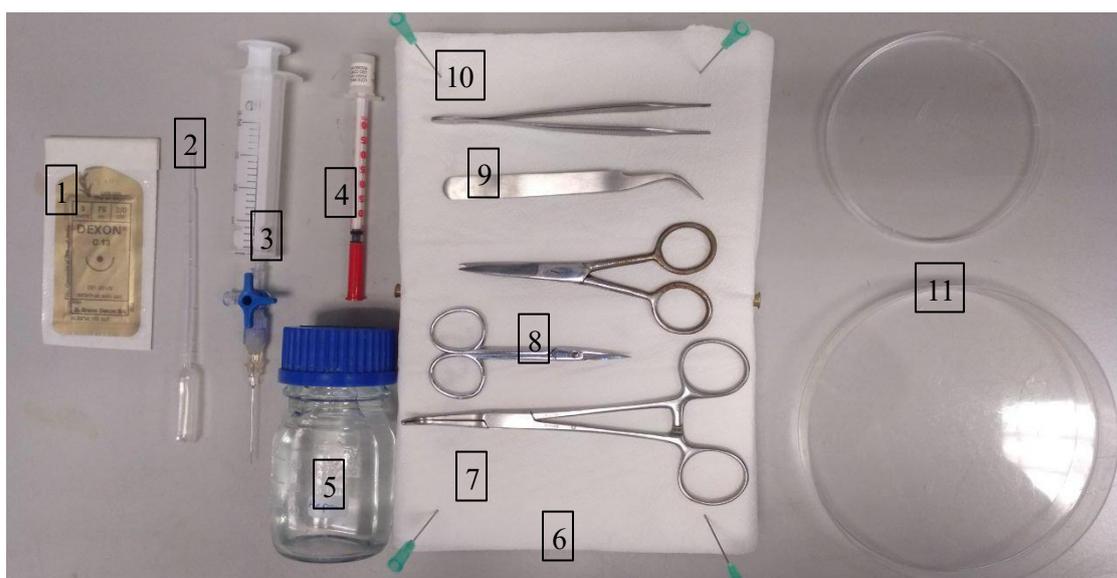
- Al trabajar con animales, se han de tener en cuenta ciertas precauciones y buenas praxis, tanto para el investigador / estudiante como para el propio animal. A modo de recopilación y desde la experiencia, se ofrecen algunas indicaciones genéricas:
 - Trabajar con el animal únicamente cuando se dispone de todo el material, y se garantiza que se podrá seguir el protocolo sin desviaciones sustanciales.
 - Es importante asegurar que el animal sufre lo menos posible. Evitar múltiples inyecciones de anestesia o heparina, manejar con delicadeza y asegurarse de que el animal no está consciente cuando se realicen las intervenciones quirúrgicas necesarias. Nunca operar a un animal que no esté bajo los efectos completos de la anestesia. Comprobar los reflejos del animal antes de proseguir.
 - El método de sacrificio es el autorizado por el Comité Ético, siendo dislocación para animales de menos de 150 gramos, y por anestesia para todos. Para el experimento de Langendorff se elegirá el método de dislocación al no alterar el funcionamiento del corazón.

Tabla 12. Materiales para el Experimento 1.

Equipos	Material	Reactivos
Oxigenador	Material quirúrgico: agujas de sujeción, agujas de insulina, hilo de sutura, pinzas de punta curva, fórceps curvos, tijeras de punta recta, papel absorbente	Hidróxido de sodio para regular el pH de la solución de Tyrodes post-oxigenación
Agitador con mosca	Pinzas de sujeción verticales para tubos del perfusor	Tyrode's HEPES para la perfusión
Medidor de pH	Corcho como plataforma de cirugía	Oxigenador - carbógeno
Báscula de precisión	Circuito hidráulico de perfusión: tubos con conexionado Luer, llave de tres salidas (2), tubo de carga al depósito de Tyrodes	Agua destilada para el depósito del BioCool
Cabezal de baño caliente	Bomba peristáltica / jeringa	Etanol 95%
	Aguja de perfusión con conexionado Luer llave de tres vías y jeringa de 20 mL de capacidad	Heparina

2.2.2.1 Cirugía de mus musculus

1. Administrar heparina por vía intravenosa para prevenir trombos durante la cirugía. La dosis de heparina se ha calculado en el apartado Dosis de Heparina. Al administrar, se usarán agujas de insulina en equivalencia 40UI – 1 mL, de manera que al ratón se inyectará una dosis equivalente a un volumen de 8UI o superior, según el peso del animal. Se habrá de esperar entre 30 minutos (tiempo de referencia para el CNIC) y 1 hora (tiempo de referencia para CITIUS)



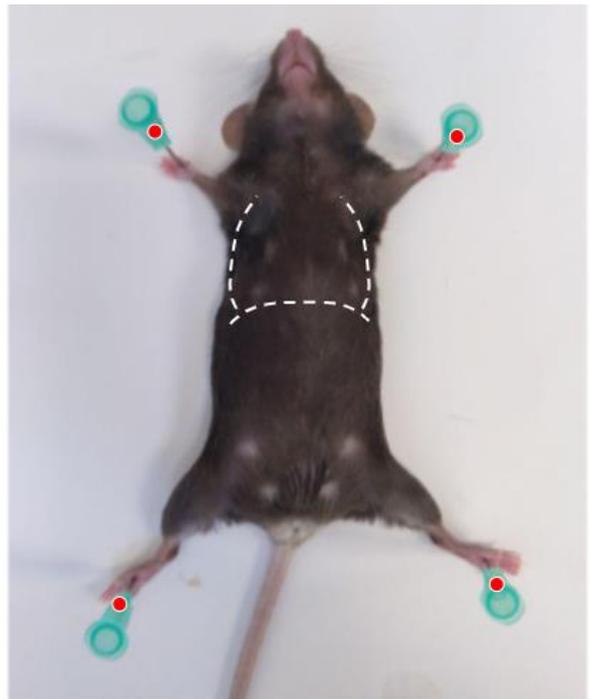
36. Material de cirugía requerido.

1. Hilo de sutura	2. Pipeta Pasteur para lavado	3. Jeringa de carga de Tyrodes y aguja de perfusión	4. Aguja de insulina con jeringa
5. Heparina (dilución)	6. Tabla de corcho para cirugía – con papel	7. Pinzas de sujeción	8. Tijeras de punta recta y punta curva
9. Pinzas de punta curva y fina	10. Agujas / alfileres para sujeción del ratón	11. Placas de Petri (portahielos + superficie de trabajo)	

- Cubrir la placa de Petri más ancha – o una bandeja amplia – con hielo picado, para formar una cama sobre la que descansa la placa de Petri más pequeña.
- Verter unos 10 mL de Tyrodes HEPES en la placa de Petri pequeña. Este será el medio en el que vivirá el corazón durante la canulación.
- Sacrificar al ratón por dislocación de las vértebras cervicales. Esto debe ser realizado por una persona autorizada.³

¡Atención! Se recomienda que los pasos 9 – 18 y 22 los realicen dos personas.

- Pesar al ejemplar en la báscula, asegurando que la totalidad del rabo se encuentra sobre la báscula y no reposando en el exterior.
- Nota: para conocer el sexo del espécimen, basta con revisar la parte inferior del abdomen en busca de las mamas, situadas dos a dos de forma simétrica. En machos se aprecia un saco escrotal definido y no se aprecian las mamas.
- Cubrir con papel absorbente una placa de corcho para colocar al ratón sobre él.
- Sujetar al ratón al corcho con cuatro agujas, perforando los manos y los pies y estirando las extremidades para dejar accesible el tórax.⁴
- Con papel y alcohol, lavar la zona torácica y bajo las axilas.
- Sujetar la piel que cubre el esternón con las pinzas de punta roma y tirar, y 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 realizar dos cortes sobre la caja torácica, a ambos lados del corte del punto 13, dejando expuesto así el corazón y los pulmones.
- Levantar el corazón y seccionar los vasos sanguíneos que conectan a los pulmones. Llenar la cavidad con papel absorbente si la sangre dificulta la visión.

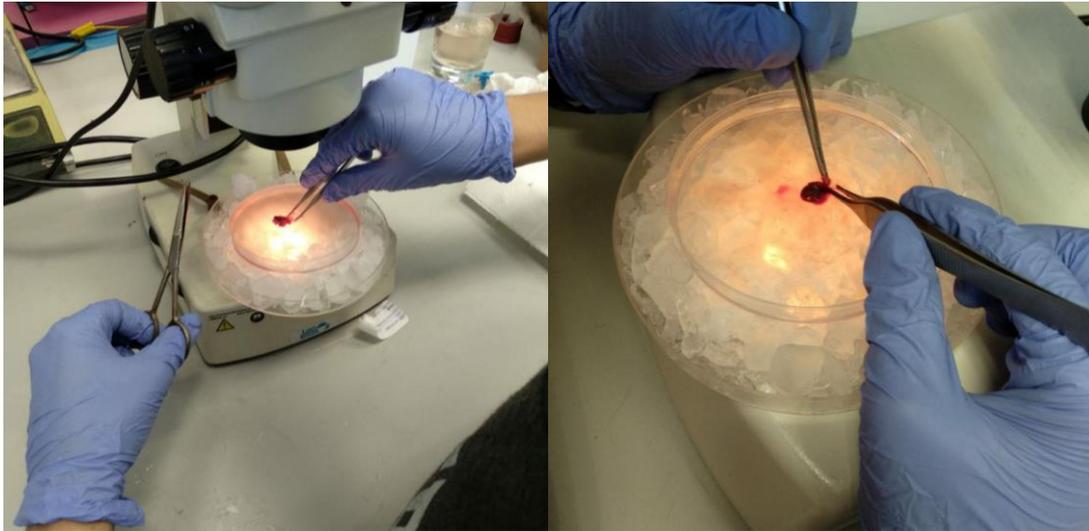


37. Disposición del ratón para cirugía.

³ Este paso lo debe realizar un profesional autorizado para trabajo de laboratorio con animales.

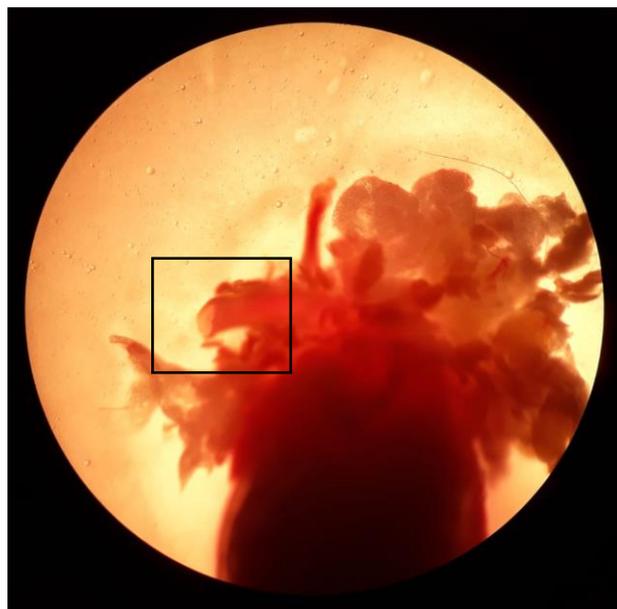
² Los pasos 11, 12, 13 y 14 se observan mejor en la Figura 1.

13. Visualizar la aorta en este paso facilitará el trabajo de más adelante. Es más sencillo si se sigue la columna vertebral, encontrándose así el tramo descendente de la arterial
14. Sujetar el corazón con las pinzas y cortar los vasos sanguíneos a una distancia de más de 2 mm de la parte superior de las aurículas.
15. Colocar el corazón sobre la placa de Petri, sumergido en Tyrodes HEPES. Si no se han perforado las paredes del corazón y se ha operado rápido, debería verse el corazón latir a un ritmo bajo – se tomó la secuencia y se dispone de un vídeo.



38. Limpieza de los vasos sanguíneos y retirada del tejido adiposo.

16. Deshacerse del tejido adiposo y grasa que pueda entorpecer el acceso a la aorta. Si fuera necesario, colocar la placa de Petri (junto con la bandeja de hielo) en un microscopio para localizar la aorta. Es recomendable ser rápido y no dejarlo demasiado tiempo bajo el microscopio, pues la bombilla bajo él calienta la placa y podría evitar la muerte del corazón.



39. Visualización de la aorta (superior izquierda del corazón)

2.2.2.2 Canulación de la aorta

17. Realizar un lazo con hilo de sutura, y colocar próximo a la aorta.
18. Con la aguja que se vaya a usar para perfusión, atravesar el tapón del compartimento de congelación para el BioCool.
19. Tomar la aguja y canular la aorta con cuidado, evitando perforar el conducto o las paredes del corazón (se usarán agujas sin punta o limadas).
20. Con la aguja canulada y el corazón sujeto, tirar de los extremos del hilo de sutura con suavidad. El lazo ha de sujetar la aorta y la aguja dentro de ella.

¡Atención! El corazón ha de estar en todo momento sobre hielo.

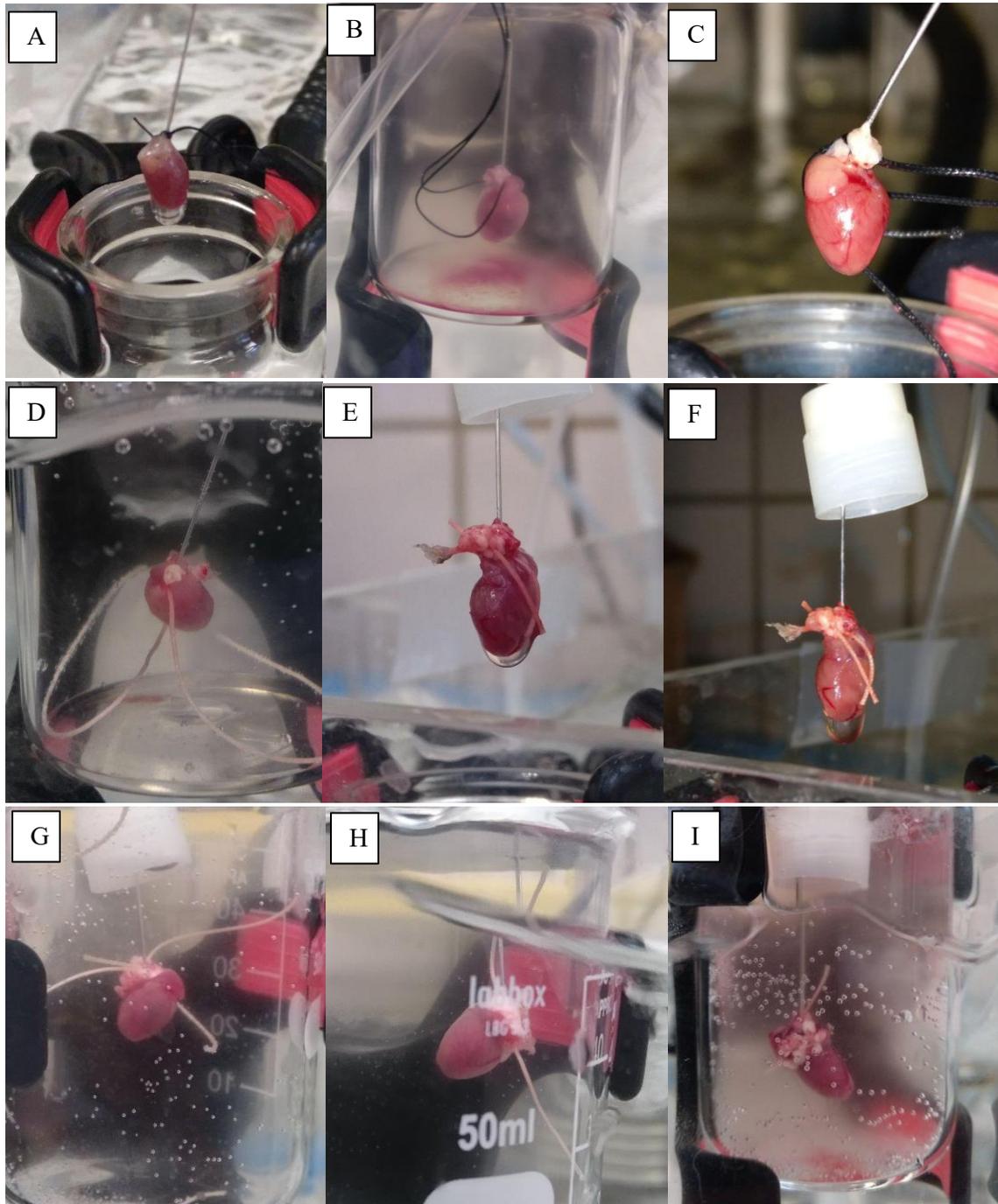
2.2.2.3 Perfusión retrógrada aórtica de Langendorff

Se recomienda hacer el experimento de Langendorff con los corazones de los ratones recién operados, para comprobar que no se dañó el tejido y que somos capaces de controlar las variables del experimento antes de vitrificar. La correcta exanguinación del ratón es importante para facilitar la perfusión de crioprotector.

1. Llenar el baño de agua donde se realizará el experimento de Langendorff. Dejar unos 4 cm de margen hasta el borde, pues el cabezal del baño impulsa el agua en recirculación con fuerza contra las paredes y podría salpicar.
2. **Opcional.** Cubrir la zona de trabajo con papel absorbente.
3. Encender el baño y ajustar a una temperatura de 37°C. Comprobar, si se desea, la temperatura de éste con un termopar o una sonda.
4. Colocar un vaso de precipitado de 1L con Tyrodes HEPES (pH ajustado a 7.4) y oxigenado. Introducir un tubo de plástico en el vaso hasta escasos cm del fondo. Conectar el otro extremo a un filtro de burbujas de hospital para bolsas de suero.
5. Programar la bomba de jeringa para un caudal de 2.3 mL/min y conectar la salida a la aguja..
6. Introducir un recipiente de cristal pequeño con Tyrodes HEPES dentro del baño caliente (con el borde sobre la superficie del agua) y sujetar en esa posición.
7. Dejar el sistema reposar, manteniendo el tubo bloqueado para evitar un escape indeseado de Tyrodes HEPES. La oxigenación de la solución tomará un tiempo.⁵
8. Purgar el conducto de perfusión con Tyrodes HEPES extraído del vaso de precipitado. Se estima que la aguja de perfusión ya fue purgada antes de la canulación. Rellenar lo necesario hasta formar dos meniscos cóncavos, y hacer la unión de tubos en estas condiciones.
9. Purgar el tubo del manómetro y conectar con Luer cerca de la aguja de perfusión para mantener controlada la presión. Esta no debe ser en ningún momento superior a 120 mmHg.
10. Con el corazón conectado al tubo y dentro del recipiente, desbloquear el paso de líquido por el tubo. Se ha completado el experimento de Langendorff. Esperar hasta observar latidos en el corazón, que se deberían producir a los pocos segundos.
11. Si se desea instrumentar el corazón, tomar dos electrodos fabricados en el laboratorio con cables y agujas, y clavar en el ventrículo izquierdo y aurícula izquierda del corazón para

⁵ Al no gasear con carbógeno, desconocemos el tiempo necesario para este tipo de gaseado. Se estiman unos 20 minutos, tiempo en el cual el CO₂ de la solución se ha disuelto al completo y con margen, y ha acidificado así el Tyrodes.

observar la actividad eléctrica del corazón con un circuito de adquisición y acondicionamiento de la señal.



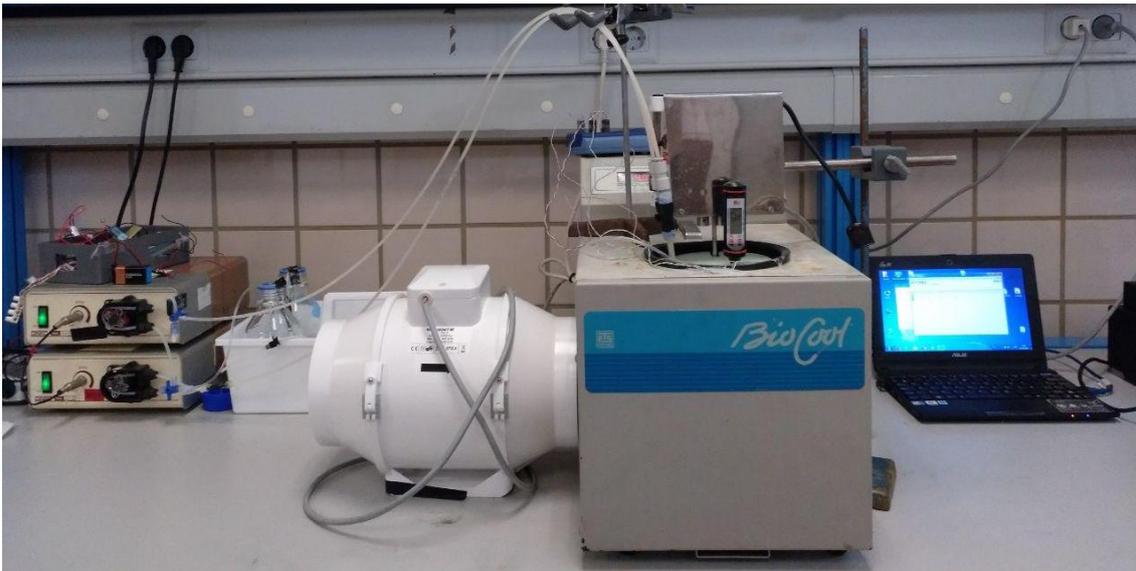
40. Fotogramas de corazones durante el experimento de Langendorff. Por orden: A: 02-05-2019, B: 06-05-2019, C: 18-05-2019, D: 14-06-2019, E: 17-06-2019, F: 17-06-2019 (2), G: 02-07-2019, H: 03-07-2019, I: 19-07-2019.

2.3 Equilibrium vitrification de corazón

Con el experimento de Fahy como referencia, se desea ensayar el equilibrium vitrification para corazón de ratón. Los tiempos de las curvas se reducirán dado el tamaño inferior del corazón del ratón al de riñón de conejo que usó el investigador en principio. Se basará en el control y seguimiento de dichas curvas por parte de un sistema de perfusión y un sistema de temperatura para cargar el tejido con crioprotector antes del almacenamiento a menor temperatura.

2.3.1 Descripción de sistemas

A continuación, se expone el montaje general de los equipos para los experimentos, así como una explicación detallada de estos equipos, su funcionamiento y manejo para los experimentos de vitrificación de equilibrio para corazón. En el caso de tejido nervioso central, el montaje general es el mismo que para corazón, con la salvedad de que hay algún elemento diferente necesario para hacer una perfusión distinta.



41. Equipo completo para experimento de equilibrium vitrification de corazón.

2.3.1.1 BioCool

El BioCool de FTS Systems es un congelador de rampa controlado para experimentos de congelación o recalentamiento de muestras biológicas. Su funcionamiento viene dado por la existencia de un control tipo PID aplicado a una entrada en rampa, de la cual se conoce el punto de inicio, fin y pendiente de dicha rampa. El objetivo es conseguir que el depósito o cámara de congelación siga dicha rampa de temperatura en el tiempo marcado. Además, se puede establecer un tiempo de espera al finalizar la rampa, facilitando así el seguimiento de la curva propuesta por Fahy.

El BioCool dispone, además de la cámara de congelación y el refrigerador, de una resistencia calefactora que será usada en control por corriente para elevar la temperatura del BioCool lo necesario para hacer el seguimiento de la rampa. Siendo este el control de una resistencia calefactora se puede modelar por un sistema de primer orden (en la práctica, un sistema de orden superior con diferentes valores de tau, aproximable por un primer orden con tiempo de subida suma de las tau del sistema). Así, la teoría de control nos indica que la forma de la salida será también una rampa, con un tramo ascendente del transitorio no lineal, y posteriormente una respuesta lineal. Se comprueba este comportamiento más adelante con la monitorización de la temperatura de la cámara al introducir diversas rampas.

Los parámetros del controlador son conocidos y vienen dados en el manual de instrucciones (se recomienda su lectura antes de la operación del aparato). Para los rangos de temperaturas en los que se trabajará, estos valores para la constante proporcional, tiempo integral y tiempo derivativo son suficientes (entre +20 °C y -20 °C se recomiendan rampas no superiores a los 3 °C/min, y en el caso experimental la rampa de mayor valor es de 2.33 °C/min).

Para el funcionamiento del BioCool es necesario garantizar dos cosas, más allá de la programación de las rampas: condiciones isotermas dentro del depósito, y la no cristalización de su contenido. Lo primero se consigue agitando el fluido dentro del depósito y manteniendo aislada la superficie para evitar la mayor transferencia de calor posible con el ambiente. Para lo segundo basta con usar metanol (según el manual) o etanol como fluido del depósito, al tener un bajo punto de fusión.

Debido a que el BioCool que se usó en el laboratorio se encontraba defectuoso (a nivel de “hardware”), fueron necesarias algunas modificaciones para garantizar el funcionamiento normal del aparato. Entre ellas se encuentra la adición de un agitador de varilla con aspas a la parte superior, para así mantener el fluido en circulación y las condiciones isotermas que esperamos. No obstante, esto añadía la problemática de que el propio agitador disipaba calor en exceso, obligando a aislar aún más cuidadosamente la superficie del depósito. Otra modificación fue la incorporación de ventiladores externos para reemplazar al no funcional ventilador interno del BioCool. Así, podíamos disipar el calor excesivo generado por la resistencia calefactora, que elevaba la temperatura de la cámara de forma indeseada.

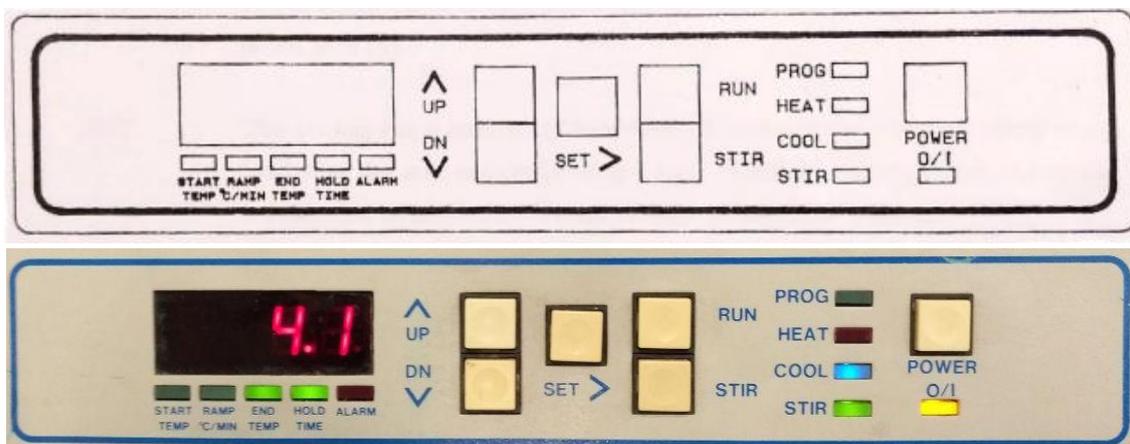


42. Modificaciones al BioCool. Izquierda: ventilador. Centro y derecha: agitador externo.

El cableado de los ventiladores se realizó en el laboratorio y se considera innecesario mostrar en esta memoria, pues consistió en tres sencillos empalmes para alimentación bifásica.

Programación del BioCool

Para programar una rampa, se han de introducir una serie de valores de manera ordenada, prestando atención a los indicadores luminosos conforme se van seleccionando los parámetros. A continuación, se explica la botonera y la secuencia para la programación.



43. Botonera y panel de programación del congelador. Arriba: según aparece en el manual de instrucciones. Abajo, color: imagen del panel en el periodo de espera al acabar una rampa.

Tabla 13. Equivalencias de botones e indicadores.

Botón / Indicador	Descripción
POWER	Botón de encendido del aparato. El indicador O/I marca su estado.
SET	Botón de selección general. Sirve como botón de “aceptar”.
UP	Para aumentar el valor que aparece en pantalla ($^{\circ}\text{C}$, $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, min)
DN	Para disminuir el valor que aparece en pantalla ($^{\circ}\text{C}$, $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, min)
RUN	Marca el inicio, pausa o reanudación de un programa ya introducido.
STIR	Habilita el agitador (en nuestro caso, innecesario)
PROG	Indicador que marca si se está en modo programación.
HEAT	Indicador sobre el estado de la resistencia calefactora (on, off)
COOL	Indicador sobre el estado del congelador interno.
STIR	Indicador sobre el estado del agitador (se puede obviar)
START TEMP	Quando se está en modo programación, marca que se está operando con la temperatura de comienzo de la rampa. También indica, cuando se ha empezado un programa nuevo, si se encuentra en este estadio de la rampa.
RAMP $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Quando se está en modo programación, marca la pendiente de la rampa que se habrá de seguir. También indica, cuando se ha empezado un programa nuevo, si se encuentra en este estadio de la rampa.

END TEMP	Cuando se está en modo programación, marca que se está operando con la temperatura de final de la rampa. También indica, cuando se ha empezado un programa nuevo, si se encuentra en este estadio de la rampa.
HOLD TIME	Cuando se está en modo programación, marca que se está operando con el tiempo de “aguante” a la temperatura de final de la rampa. También indica, cuando se ha empezado un programa nuevo, si se encuentra en este estadio de la rampa.

Para programar cualquier rampa con los valores por defecto del PID, se habrá de proceder de la siguiente manera:

1. Encender el BioCool presionando el botón **POWER**.
2. Si hubiera un programa anterior en funcionamiento (esto se comprueba porque se encendería alguno de los indicadores luminosos bajo la pantalla), mantener pulsado **RUN** hasta que desaparezca el indicador.
3. Mantener pulsado **SET** hasta que se encienda el indicador **PROG** de la derecha. Esto señala que se está en modo programación de rampa.
4. Aparecerá iluminado el indicador **START TEMP** bajo la pantalla. Con los botones **UP** y **DN**, seleccionar la temperatura de inicio de la rampa.

NOTA: Si el BioCool no está a la temperatura de inicio al arrancar (es lo más frecuente), por ejemplo, al arrancar por primera vez estando a temperatura ambiente, habrá de programarse una primera rampa que lleve desde la temperatura actual hasta la primera deseada, siguiendo las restricciones de pendiente de la rampa explicadas más arriba.

5. Pulsar **SET** para grabar la temperatura de inicio.
6. Aparecerá iluminado el indicador **RAMP °C/min** bajo la pantalla. Con los botones **UP** y **DN**, seleccionar la pendiente de la rampa entre ambas temperaturas inicial y final.
7. Pulsar **SET** para grabar la pendiente de la rampa.
8. Aparecerá iluminado el indicador **END TEMP** bajo la pantalla. Con los botones **UP** y **DN**, seleccionar la temperatura de fin de la rampa.
9. Pulsar **SET** para grabar la temperatura de fin.
10. Aparecerá iluminado el indicador **HOLD TIME** bajo la pantalla. Con los botones **UP** y **DN**, seleccionar la temperatura de fin de la rampa.
11. Pulsar **SET** para grabar el tiempo de hold tras acabar la rampa.
12. Aparecerá iluminado el indicador **ALRM** bajo la pantalla. Esto nos indica si queremos un aviso sonoro cuando el programa esté listo para empezar y al acabar. Con los botones **UP** y **DN**, se elige el estado de la alarma (1 para ON, 0 para OFF).
13. Se apagará el indicador **PROG**, y pulsando el botón **RUN** se dará comienzo al programa. Esto se comprueba con el encendido del indicador **START TEMP**.
14. Una vez que haya llegado a este punto, pulsar **RUN** de nuevo para iniciar la rampa. Al término de esta, si se eligió una alarma, el aparato avisará cuando se consuma el tiempo de hold. Se puede seguir el estado de la rampa con los indicadores luminosos bajo la pantalla.

2.3.1.2 Perfusor controlado en rampa de concentración

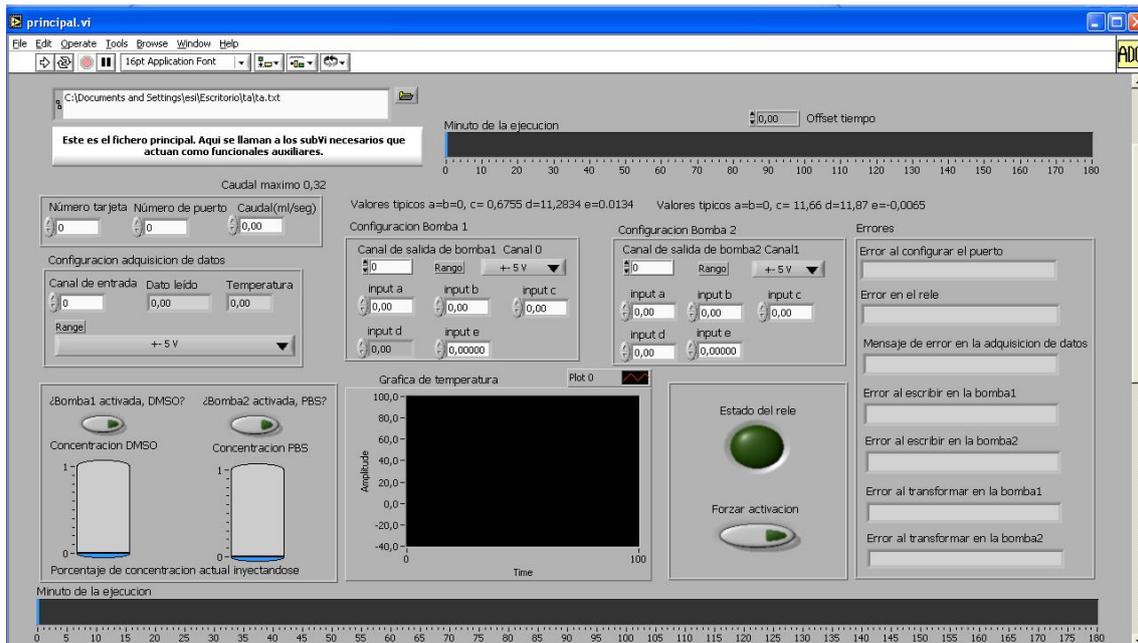
Este aparato es el Trabajo Fin de Máster de Álvaro Pérez Aguilar, y será el apoyo fundamental para los experimentos de vitrificación de equilibrio. Una explicación más detallada se puede encontrar en el propio documento (Pérez Aguilar, 2018) Con él, se puede conseguir una concentración a la salida del sistema hidráulico que siga un perfil lineal a trozos. Lo primero que se hubo de realizar, dada la unicidad del sistema, es una copia de seguridad e instalación del software requerido (LabVIEW y software de la tarjeta de adquisición) en uno o varios ordenadores nuevos. El procedimiento se muestra en los anexos.



44. Equipo de perfusión por control de concentración.

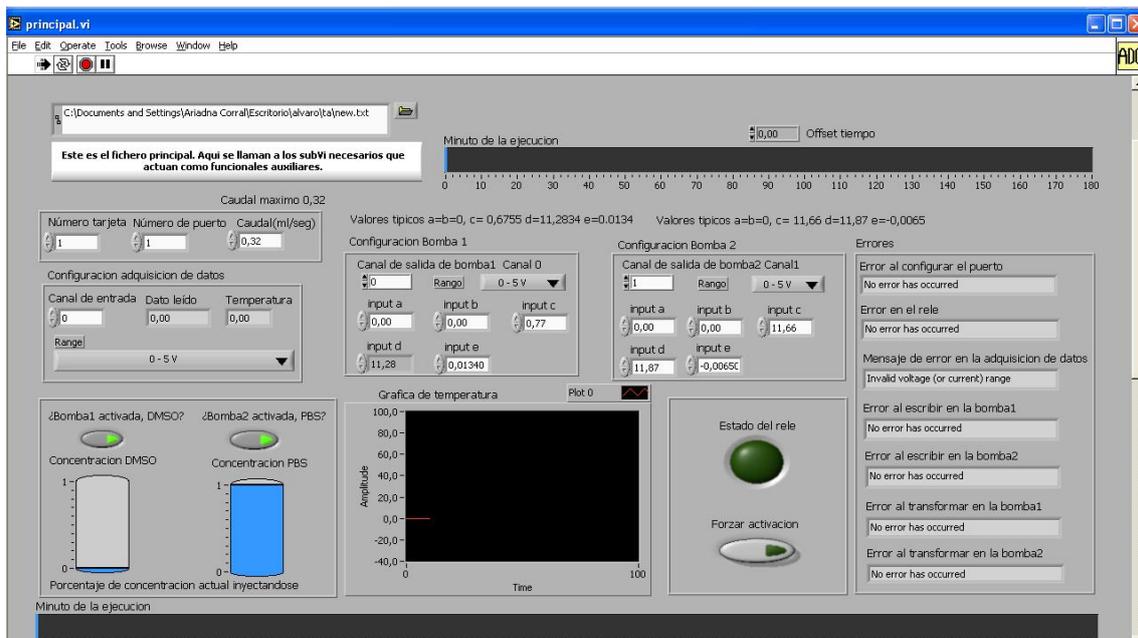
Software

El sistema consta de tres partes diferenciadas. La primera es el software y programa de seguimiento de los perfiles de concentración. Mediante LabVIEW, el responsable del proyecto diseñó un sistema de seguimiento de perfiles lineales a trozos en concentración. Esto se conseguía con varios subprogramas de apoyo a un programa principal, que da tensión a dos bombas peristálticas para que, en función de la alimentación, la unión de ambas bombas provea una concentración de crioprotector u otra. Se accedió al código para modificar algunos parámetros, entre los cuales se encuentran los valores de concentración a la salida y los tiempos que marcan los intervalos del perfil de concentraciones. Se modificó para que fuera un seguimiento de DMSO en dilución en un programa de duración de 1 hora, lo que supone una reducción de casi dos tercios del tiempo empleado por Fahy para el riñón del conejo, dada la diferencia de tamaño con el corazón de un ratón (no superior al centímetro de diámetro y altura)



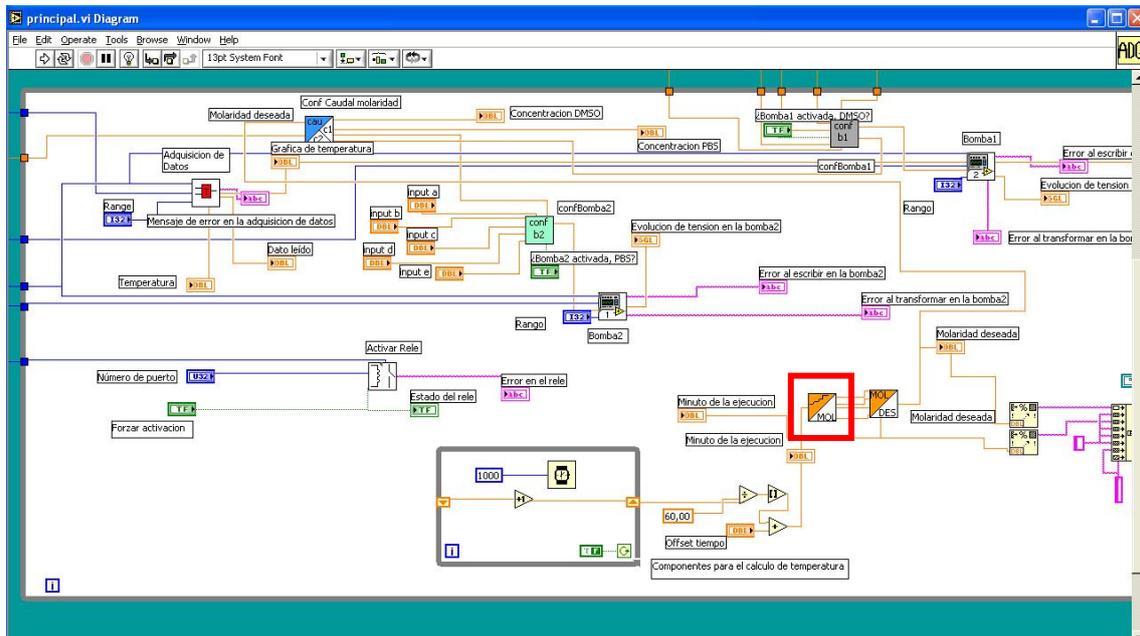
45. Panel frontal de *principal.vi* para la perfusión.

Esta es la pantalla que se ve por defecto cuando se arranca el programa *principal.vi*, que une todos los nodos y subprogramas vinculados a la perfusión. Se han de introducir los valores deseados en los campos vacíos, desde el puerto y número de la tarjeta de adquisición hasta los coeficientes de las funciones polinómicas de las bombas y el voltaje de operación. En esta pantalla se puede hacer un seguimiento del minuto de operación del programa, así como del porcentaje de cada bomba que está en uso, la concentración (ideal) de la salida, y el voltaje suministrado a cada bomba peristáltica por separado. En la fase final de los experimentos se modificó el software para que incorporara los valores necesarios en dichos campos.



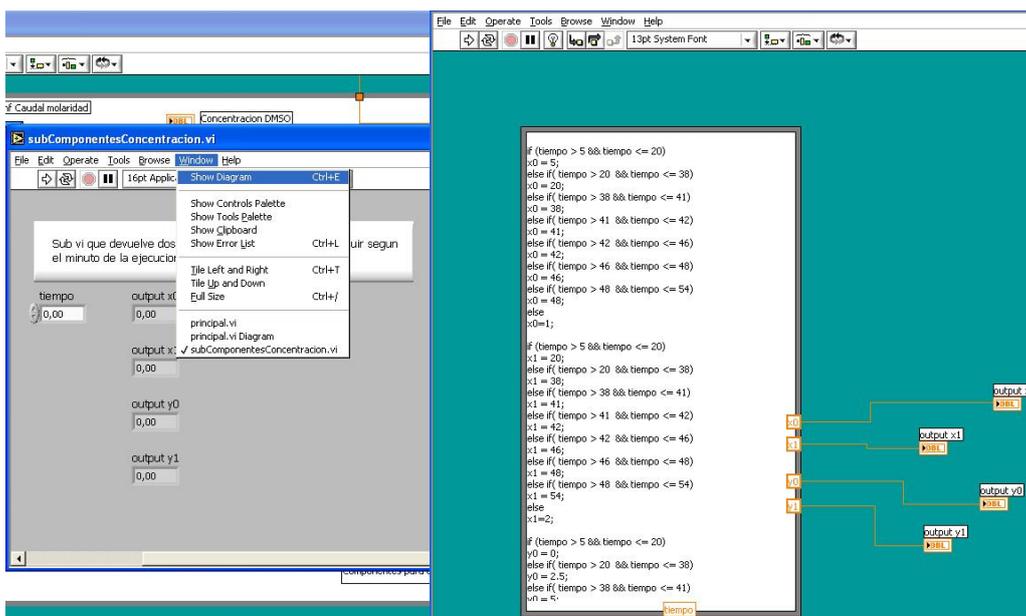
46. Panel frontal durante la perfusión.

Revisando el diagrama (Window – show diagram), se puede visualizar el conexionado de los elementos y nodos del programa completo.



47. Diagram de principal.vi

Para modificar el perfil de la curva de concentración, así como los valores de concentración (molar) de DMSO siendo perfundida en el extremo del perfusor, se habrá de acceder al bloque subComponentesConcentracion.vi, señalado en un recuadro rojo en la imagen superior. Se tiene así control sobre el perfil, descrito en forma de bloque de condicionales if- else en código C.



48. subComponentesConcentracion.vi para modificar el perfil de la curva de concentración.

DAQ y PCB

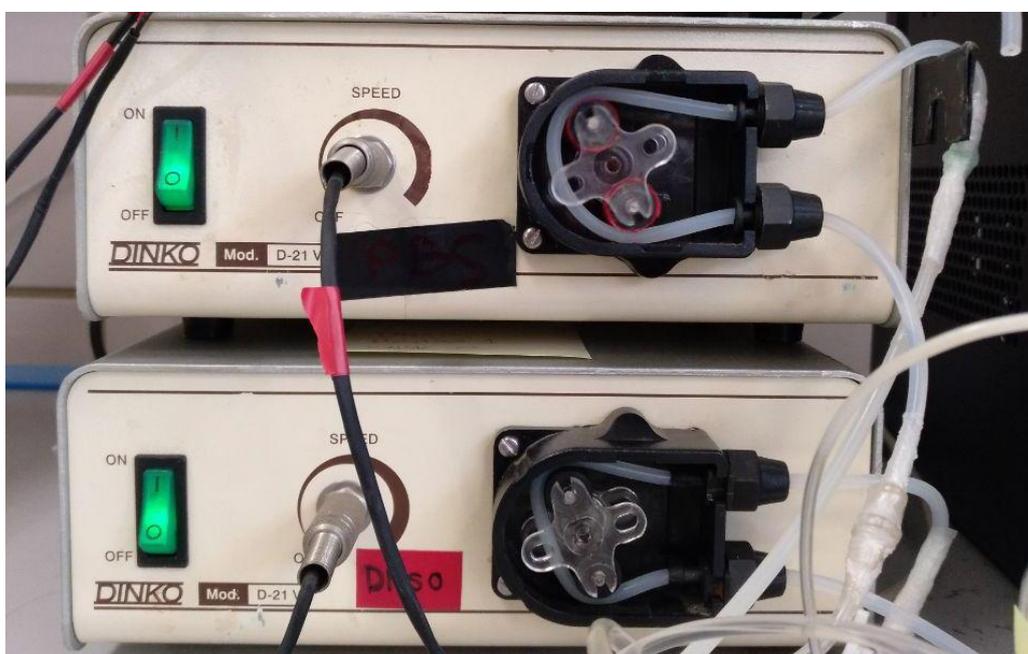
La segunda parte que conforma el sistema es el bloque de electrónica y adquisición de datos. Álvaro diseñó una PCB para el rutado de señales de alimentación para las bombas y para toma de datos de temperatura (parte finalmente no funcional del proyecto).

La PCB contiene el ruado de los cables de tensión de las bombas; es decir, la salida de la tarjeta de adquisición que controla la alimentación de las bombas peristálticas, tierras comunes, etc.. En su forma más completa, constaba de un circuito de conmutación para control de temperatura basado en transistor, relé, y LED indicador de estado, con sus respectivas resistencias de pull-up.

La tarjeta de adquisición de datos es una PMD-1208LS, con protocolo de comunicación serie mediante USB al ordenador. Es compatible con Windows XP, sistema operativo en el que trabajaremos dada la versión de LabVIEW que se utilizará (6.1). El pinout consiste en 8 salidas analógicas, 2 salidas de 10 bits, y 16 puertos digitales configurables como entrada o salida, así como un contador interno de eventos de 4 bytes. La placa está conectada al ordenador y es suministrada una tensión de 5V.

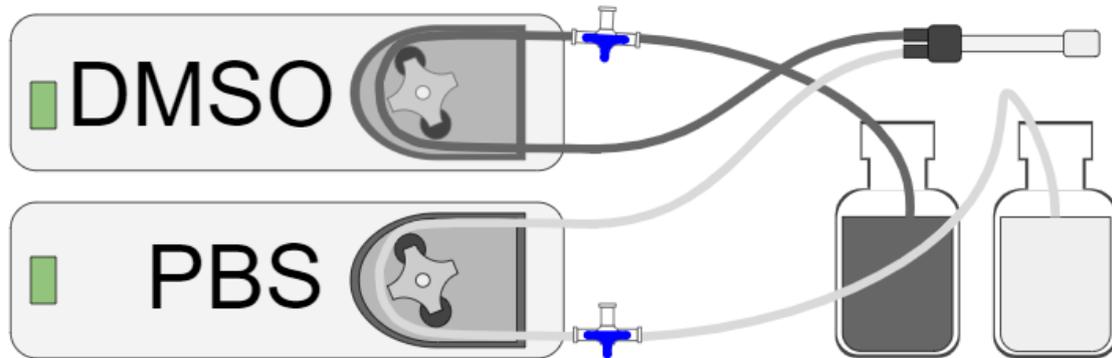
Sistema hidráulico

El sistema hidráulico consta de dos depósitos de solución, uno conteniendo PBS y otro conteniendo DMSO ambos con la mayor pureza posible, dos bombas peristálticas y el consecuente entramado de tubos que conducen de los depósitos a las bombas, y de éstas al perfusor.



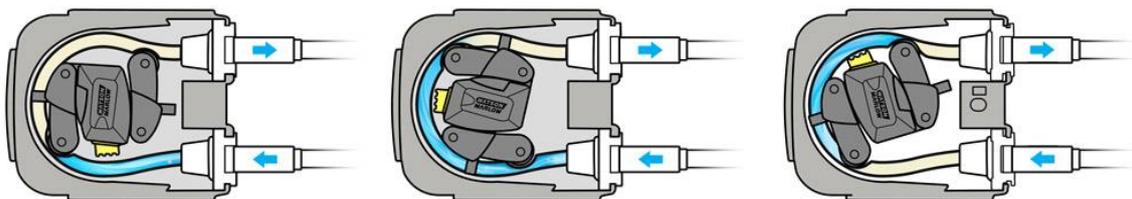
49. Bombas peristálticas de DINKO para la perfusión. Se alimentan con un conector tipo JACK.

El perfusor se compone de una unión T terminada en un roscado Luer para acople de las agujas de perfusión. También se dispone de llave de tres vías entre la entrada a la bomba peristáltica y el depósito, para facilitar la purga de los tubos y el recambio de los depósitos si hay riesgo de que se vacíen.



50. Sistema hidráulico de perfusión de crioprotector.

Las bombas peristálticas funcionan por propulsión compartimentada del fluido. Esto es, un rodillo comprime un tubo deformable (generalmente silicona) de un diámetro dado, contra la pared interior del compresor, generando así un bloqueo físico para el fluido, que sólo puede avanzar en la dirección no bloqueada. Es compartimentada, porque la presencia de dos o más rodillos delimita el volumen de fluido que se suministra en la rotación. A efectos prácticos, es como si se dispusiera de un conducto lleno de líquido, y se comprimiera con las manos de forma secuencial y hacia delante para impulsar dicho fluido. Son bombas muy útiles pues no necesitan altas revoluciones para impulsar el fluido, no tienen contacto directo con la sustancia (lo cual es ideal para aplicaciones biológicas), se puede modificar el caudal suministrado no sólo con la velocidad de revolución sino también con las propiedades geométricas del tubo interior, y además generan un flujo no turbulento en el entubado dadas las bajas revoluciones del rotor.



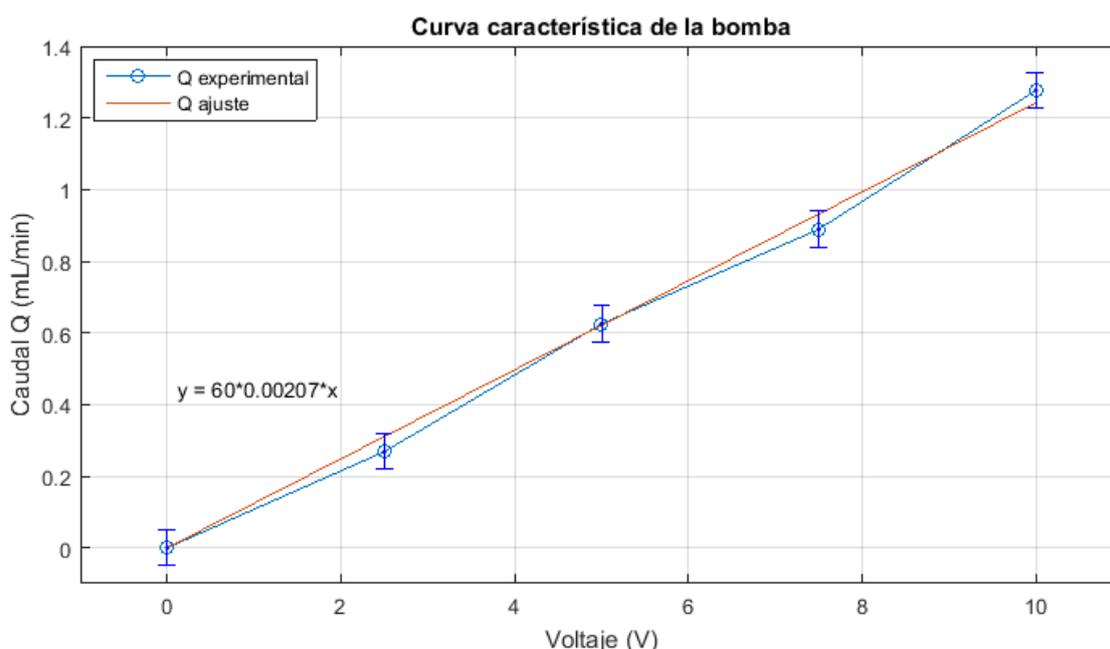
51. Watson-Marlow - cómo funcionan las bombas peristálticas.

Se hizo una caracterización de las bombas peristálticas. Haciendo uso del mismo sistema de perfusión, se calculó el caudal a la salida en función de la tensión aplicada a las bombas. Para ello, se midió el goteo del perfusor dada una tensión determinada, obteniéndose el volumen al final de un intervalo. Esto se consiguió con una fuente de alimentación externa, de 0 a 24V. En la práctica, la bomba peristáltica no aprecia diferencia en revoluciones ante 12 o 24V, viéndose su velocidad máxima capada antes de llegar a este valor. Además, la bomba, como ocurre con todos los motores de revolución alimentados por corriente, posee una zona muerta inicial hasta los 0.3 V aproximadamente.

Tabla 14. Valores experimentales con la bomba peristáltica.

Voltaje (V)	Volumen (mL)	Tiemp	Caudal (mL/s)	Caudal (mL/min)
1.1	2	30'	0.001111	0.06666
2.5	2	7' 27''	0.004474	0.26844
5.0	1	1' 36''	0.010417	0.62502
7.5	2	2' 15''	0.014815	0.88890
10.0	2	1' 34''	0.021277	1.27662

Dado que las bombas trabajarán, según la máxima proporcionada por el software de Álvaro, a 5V, hemos de esperar un caudal máximo de 0.63 mL/min cuando se realice la perfusión, lo que equivale aproximadamente a 10-12 gotas de perfusato en ese tiempo. La curva de valores de caudal frente al voltaje suministrado se ofrece en la siguiente imagen como característica estática de la bomba peristáltica. Los errores equivalen a la presencia de una gota de más o una gota de menos en la medición.



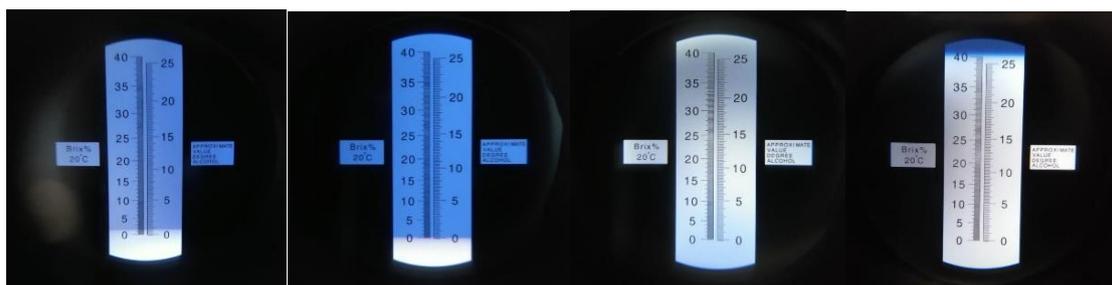
52. Característica estática de la bomba peristáltica y ajuste.

Para tener un correcto funcionamiento de las bombas durante la perfusión, es necesario cebar los tubos como se indicará posteriormente en el protocolo. Para esto, ha de usarse la salida de la fuente de alimentación a la máxima tensión suministrable, para así tener un cebado rápido y sin burbujas de ambos tubos. Esto se hace para evitar el largo tiempo de espera para la carga natural de ambos tubos. Si se deseara cargar los tubos con el propio programa, la perfusión sería deficiente al suministrar un gran volumen de aire inicial al corazón, destruyendo toda su funcionalidad, y prolongando el tiempo de llegada del perfusato hasta la aorta. En mediciones experimentales, se comprobó que el conducto de PBS tardaba del orden de 11 minutos en estar cargado al completo tras el inicio del programa, mientras que el tubo de DMSO, cuya bomba no supera la zona muerta hasta el minuto 13 (a efectos

de la perfusión, es tan baja la concentración en el intervalo inicial que se puede despreciar la influencia de esta zona muerta) y tarda un total de 27 minutos en cargar el tubo al completo, dada la baja tensión con la que trabaja esta bomba hasta bien avanzado el proceso de perfusión. Esto se traduce en unos inaceptables 40 minutos en ausencia de perfusión, y lo que es peor, con entrada constante de aire en las arterias coronarias del corazón. Como caso excepcional, puede cebarse el tramo que une las bombas con los depósitos haciendo uso de una jeringuilla, cuidando muy bien de no dejar burbujas en la unión.

Validación del perfusor: concentración de salida

Para validar el perfusor, es necesario garantizar que la concentración de DMSO a la salida del sistema se corresponde con los valores deseados; esto es, que se sigue el perfil teórico de Fahy correctamente. Para ello, se midió dicha concentración en instantes discretos del tiempo a lo largo del proceso. La forma de medir fue mediante un refractómetro óptico, capaz de indicar el porcentaje de soluto en estado sólido frente a la masa total de la disolución que se está midiendo. Para obtener el valor de molaridad a partir de los datos que proporciona el refractómetro, es necesario establecer una conversión.



53. Medición del Brix % de (por orden de izquierda a derecha): PBS, H₂O TII, DMSO 99.5%, DMSO 50% en PBS.

Lo primero es establecer una equivalencia entre porcentaje de DMSO (puro al 99.5%, su molaridad es de 12.77 mol/L) Para ello, se hicieron diluciones de DMSO en PBS puro, en creciente concentración, a intervalos de 10, y se midió el Brix % (es el valor que ofrece el refractómetro, masa sólida del soluto / masa total de la disolución). También se midió PBS puro y Agua Type I para tener referencias, como aparece en la figura superior. Las medidas se realizan siempre con 3 gotas de reactivo.



54. Proceso de medición comparativa Brix% frente a molaridad del DMSO.

Por limitaciones físicas, el refractómetro sólo mide hasta un 40% en Brix. No obstante, el DMSO da valores mucho más altos con altas concentraciones, por lo que para medidas de concentración de DMSO mayores se habrá de hacer una dilución de 1/5 en PBS (figuras superiores). El valor resultante en Brix se multiplicará por 5, con su correspondiente aumento del error. Asimismo, se asume una horquilla de error sistemática propia de la presencia misma de PBS en la muestra medida. Por ello, se añadirá un error de 2 % en Brix a las medidas, pues es el valor del PBS al medir.

Tabla 15. Valores Brix % y molaridad de las disoluciones medidas en el refractómetro.

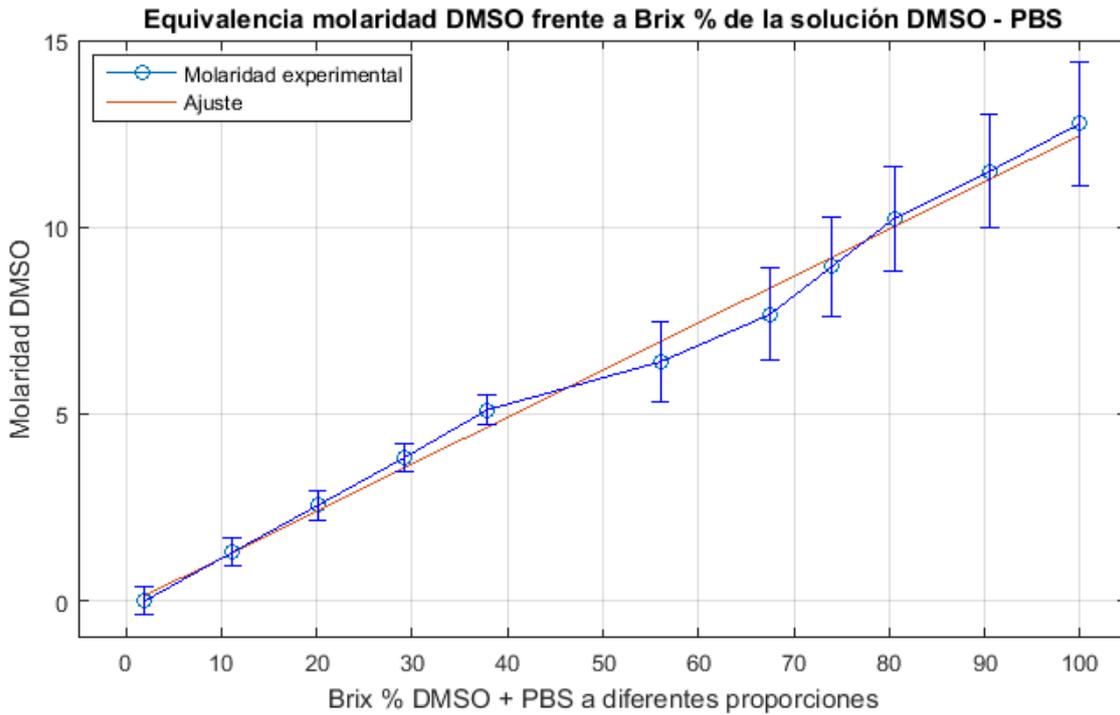
% DMSO	Volumen DMSO (mL)	Volumen PBS (mL)	Brix %	Molaridad DMSO (mol/L)
0	0	2	2	0
10	0.2	1.8	11.2	1.3
20	0.4	1.6	20.1	2.55
30	0.6	1.4	29.2	3.83
40	0.8	1.2	37.9	5.11
50	1	1	56	6.39
60	1.2	0.8	67.5	7.66
70	1.4	0.6	74	8.94
80	1.6	0.4	80.5	10.22
90	1.8	0.2	90.5	11.49
100	2	0	100	12.77

La molaridad se calculó de la siguiente manera:

$$M_{DMSO} \left(\frac{mol}{L} \right) = volumen_{DMSO} (mL) \times 1000 \frac{mL}{1 L} \times \frac{10^3 g DMSO}{10^3 mL DMSO} \times \frac{1 mol DMSO}{78.13 g DMSO}$$

Haciendo uso de la masa molecular del DMSO.

La relación entre Brix % y molaridad de DMSO se puede apreciar en la siguiente figura. Nótese la mayor magnitud de los errores equivalentes a las medidas de Brix superiores al 40%.



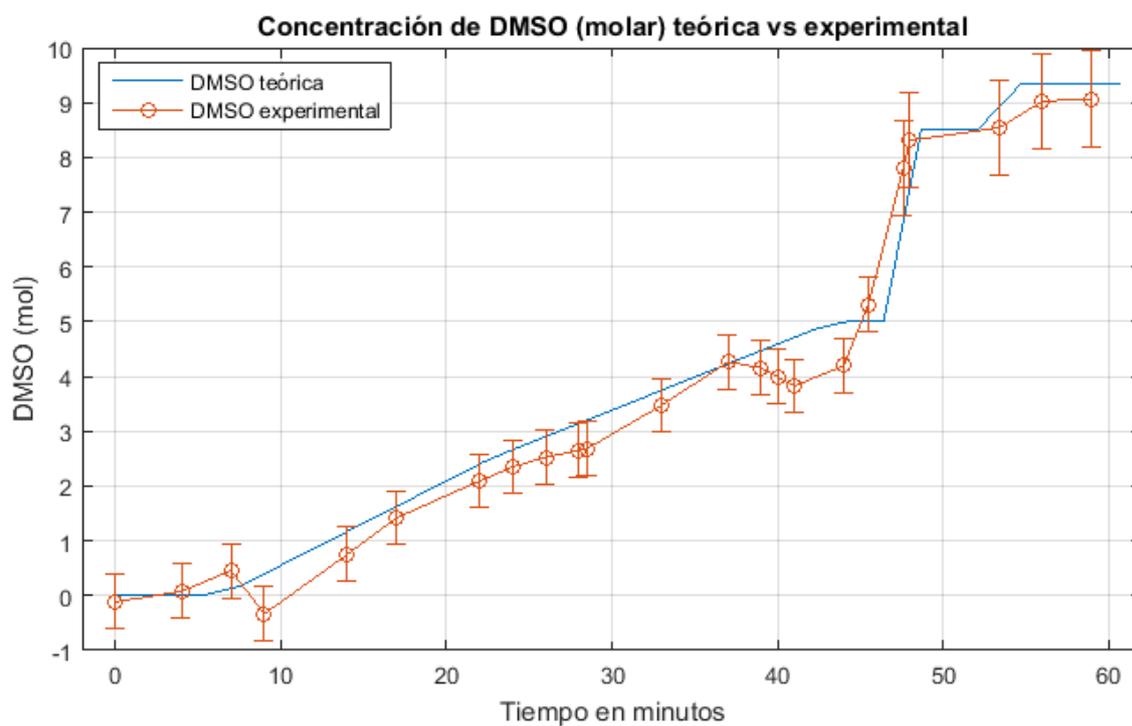
55. Relación entre la medida del refractómetro y la molaridad del DMSO de las disoluciones.

A continuación, se midieron los valores a la salida del perfusor durante el transcurso del programa. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 16. Resultados de la medida del perfusor: DMSO. Errores en la figura posterior.

Instante de perfusión t	Brix %	Molaridad DMSO (mol/L)
0	2	0.1338
3	2	0.1338
5	2	0.1338
10	2	0.1338
13	2	0.1338
18	17	2.0208
20	17	2.0208
22	18	2.1466
24	19	2.2724
24.5	22	2.6498
29	26	3.1530
33	29	3.5304
35	31	3.7820

36	31	3.7820
37	36	4.4110
40	36	4.4110
41.5	35	4.2825
43.6	64.5	7.9963
44	70	8.6882
49.4	68	8.4366
52	73	9.0656
55	73	9.0656



56. Comparativa de concentración de DMSO a la salida frente a la teórica.

Se da por concluido el estudio del perfusor. Los valores experimentales obtenidos son lo suficientemente cercanos a los teóricos para poder validar el perfusor.

2.3.1.3 Reactivos

PBS

El PBS o Tampón Fosfato Salino (*Buffer Phosphate Saline*) es un amortiguador de pH comúnmente empleado en investigación biológica. Se trata de una solución acuosa y salina, con una concentración iónica semejante a la del líquido extracelular y neutro para las células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal (Albiol Tortosa, 2019).

Se ha utilizado como portador de ACP durante la curva de enfriamiento con su correspondiente oxigenación. Su preparación se detalla en el anexo de preparación de reactivos. El PBS preparado se compone de 8.06 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.22 g de cloruro de potasio (KCl), 1.15 g de fosfato disódico (Na_2HPO_4) y 0.20 g de fosfato dipotásico (KH_2PO_4) (Albiol Tortosa, 2019).

DMSO

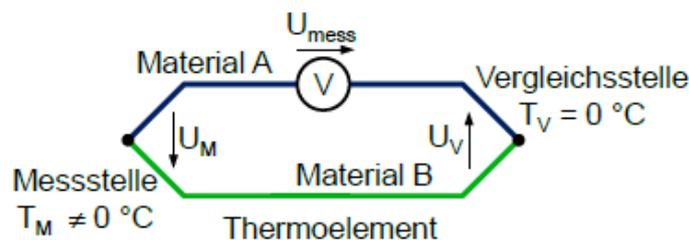
Tal como se explicó en el apartado de *elección de ACP*, el dimetilsulfóxido es el crioprotector elegido para los experimentos, por sus cualidades físicas, químicas y de visión. No es necesaria preparación pues se utiliza al 99.5% de pureza tomado directamente del recipiente.

2.3.1.4 PicoLog y termopares

Así como se hace un seguimiento de concentración, es importante conocer la temperatura del sistema en todo momento para poder hacer un seguimiento efectivo de las curvas de Fahy. Para esto, junto con el BioCool, se usarán transductores para toma de datos de temperatura.

Principio del termopar y forma de medición

Los transductores elegidos son termopares, basados en el efecto Seebeck como principio de funcionamiento. Este efecto implica que, cuando dos cables de diferente material conductor se unen en los extremos y se exponen a diferentes temperaturas en estos extremos (generalmente una T de medición, y otra de comparación o referencia) se genera una diferencia de potencial en el extremo de medición entre ambos cables. Esta diferencia puede ser medida con un voltímetro, y es proporcional a la resta de las temperaturas de medición y comparación. (Maas, 2018)



57. Thermoelement – Temperaturmessung (Termoelemento, medición de temperatura)

Lo ideal es que la temperatura del lado de comparación (Vergleichsstelle en la figura) sea cero, pues de otro modo se encontraría aquí una gran fuente de error. Es usual mitigar este error con termopares de circuito seccionado, haciendo pasar forzosamente los hilos por un punto intermedio con un líquido a 0°C . No obstante, se optó por una solución por calibración que se detallará más adelante.

Hay diversos tipos de termopar, y en la práctica se usarán termopares de dos tipos: T y K. El termopar tipo K tiene un rango de medición más amplio que el termopar tipo T (de -200°C hasta 1250°C para el tipo K, y de -250°C a 350°C para el tipo T). No obstante, el error estándar de las medidas para el tipo K es de un máximo de 2.2°C , siendo el del tipo T menor, con tan sólo 1°C . Para la medición de temperatura, se usará un array de 3 termopares para obtener dos temperaturas. Un termopar tipo T y otro tipo K serán introducidos en la cámara de congelación del BioCool. Se seguirá la temperatura en este medio, prestando atención a las fluctuaciones de temperatura y al valor absoluto de estas. Así se podrá apreciar si hay excesiva variación con las mediciones de uno u otro. Cabe señalar que los extremos de medición de ambos termopares se encontrarán prácticamente midiendo el mismo punto del espacio del depósito. Un tercer termopar, tipo T, se introducirá en el criovial para medir la temperatura de éste. Es importante tener al otro termopar tipo T como referencia externa, y un tercer termopar de distinto tipo para corroborar que no hay errores grandes en la medida de los otros dos.

Adquisición de los datos

Las lecturas de los termopares se realizarán por medio de un Data Logger para termopares, modelo TC-08 de Pico Technology. Este aparato, junto con el software PicoLog instalado en un ordenador portátil, permite visualizar en tiempo real las medidas de los termopares enviadas por comunicación serie. Es posible dibujar gráficas de la temperatura, y se pueden obtener los datos en una tabla, mostrando los instantes de tiempo y los canales de medición.

Antes de medir se ha de calibrar cada canal para la adquisición de datos, al no disponer de un punto de referencia de temperatura a 0°C como se detalló. PicoLog aporta un asistente de calibración basado en una ecuación lineal, midiéndose de ella dos puntos. Para esto, en la ventana del asistente (consultar el manual de usuario disponible online en https://www.lambdaphoto.co.uk/pdfs/Picotech/LAMBDA_PicoLogSelfHelpGuide.pdf) se han de introducir cuatro valores en forma de matriz 2×2 , correspondientes a dos medidas de temperatura escogidas para calibrar).

$$\begin{array}{cc} aa & bb \\ cc & dd \end{array}$$

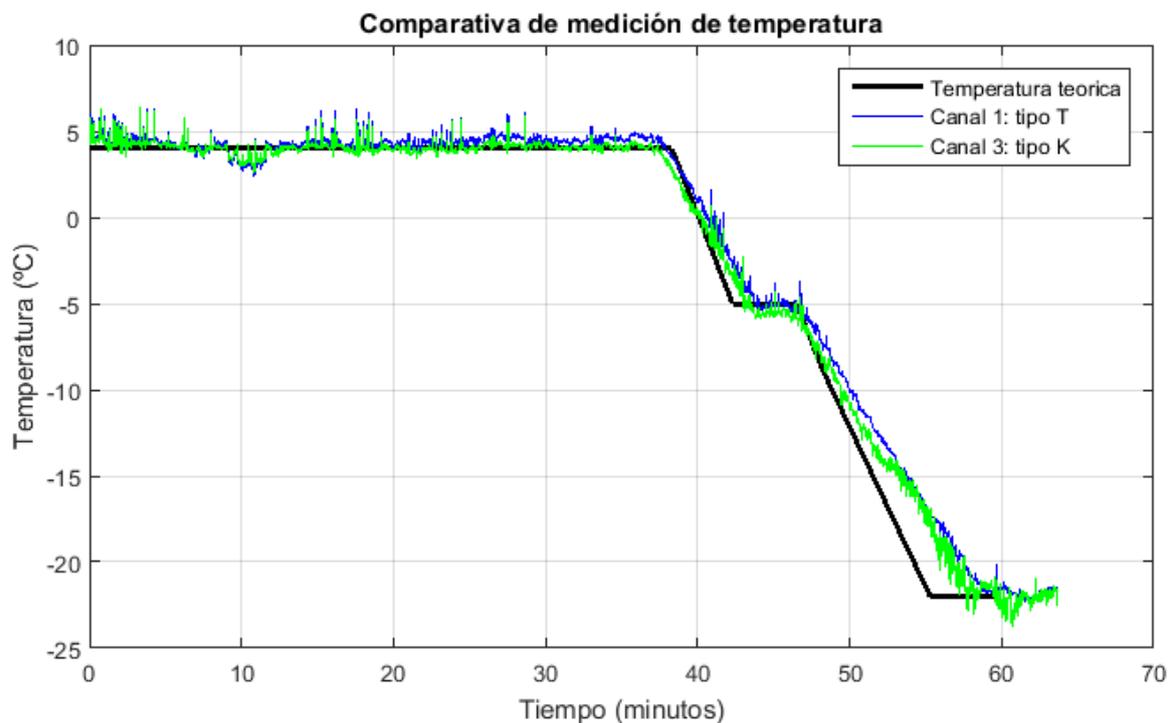
donde:

- aa = la lectura indicada en la primera temperatura,
- bb = lectura real en la primera temperatura,
- cc = lectura indicada en la segunda temperatura,
- dd = lectura real en la segunda temperatura

Los valores bb y dd fueron los marcados por una RTD de platino de alta precisión, y los valores aa y cc fueron los ofrecidos por la lectura del termopar en sendas temperaturas. Las temperaturas de calibración escogidas fueron -20°C y 20°C , para disponer de dos puntos lo suficientemente alejados y que cubrieran casi todo el rango de temperaturas en el que se trabajará en el experimento de criopreservación. Esto se realizó para cada canal, dándose por finalizado el proceso de calibración cuando todos ellos ofrecían una medida con una diferencia no superior al medio grado entre ellos, y no superior al grado con respecto a la RTD de platino.

Para iniciar la toma de datos experimental, se ha de programar el formato de adquisición, tamaño del archivo total de lectura, frecuencia de muestreo y nombre del archivo (por supuesto, habiendo añadido previamente los canales que se usarán para medir y habiéndose hecho la respectiva calibración). Para esto, hay que acceder a *Archivo -> Datos nuevos*. Se desplegará una ventana con varias opciones, en las que habrá que marcar el tiempo entre lecturas (en el caso propio se escogió 1 segundo, dada la duración del experimento y la baja tasa de variabilidad de las lecturas), el número de muestras totales del archivo (por seguridad, del orden de 10 veces el número de muestras que esperamos tomar) teniendo en cuenta la duración del experimento (un mínimo de 60 minutos a 1 muestra por segundo, corresponde a un total de 3600 muestras como mínimo).

Se procede a tomar las lecturas con los termopares. Se programó un perfil de temperaturas como el que se habrá de seguir para el experimento de criopreservación.



58. Seguimiento de temperatura en la cámara de criopreservación.

Se puede apreciar en general un seguimiento favorable, también dependiente de varios factores: el tiempo consumido en la programación entre una rampa y otra, la medida de temperatura del BioCool que es la que el programa toma como referencia para los inicios y finales de las rampas (y que experimentalmente se comprobó que pueden llegar a discrepar con los termopares en más de medio grado), la dificultad del BioCool para hacer una rampa de alta pendiente a bajas temperaturas dada la necesidad de apoyo refrigerador externo (por eso las rampas son más lentas) y los propios errores de los termopares. Con todo esto, se puede dar aun así por válido el seguimiento de la curva de temperatura teórica.

2.3.2 Procedimiento experimental

Objeciones y consideraciones previas

- La solución de PBS no es adecuada como solución artificial sustituyente del plasma sanguíneo, porque es un buffer para evitar el shock osmótico, pero no posee los nutrientes, proteínas y oxigenación adecuados para mantener los tejidos del animal vivos. (Albiol Tortosa, 2019)
- Durante la perfusión de crioprotector, es fundamental que el programa de concentraciones y el de temperaturas estén coordinados. Un desajuste de pocos minutos puede significar un gran error de perfusión. Por ello, se recomienda practicar numerosas veces con la programación del BioCool, sus rampas y sus tiempos de espera, para conocer con qué velocidad se puede responder a los requerimientos de las curvas de concentración. Ha de recordarse que el programa de perfusión sigue unas curvas específicas (Fahy, 2009) en función del tiempo transcurrido, y que la temperatura y concentración de crioprotector están correladas.
 - Las curvas obtenidas por Fahy son para un riñón de conejo. Nosotros trabajaremos con órganos de ratón, más pequeños, por lo que esperamos una difusión más rápida del crioprotector y podemos permitirnos reducir la duración del programa. Se propone un primer acercamiento de 1h total de perfusión.

Tabla 17. Materiales para el Experimento 2.

Equipos	Material	Reactivos
Equipo de perfusión completo – bombas, tarjeta de adquisición, PCB	Termopares tipo T (2) y tipo K (1)	DMSO (dimetilsulfóxido) al 99.5%
BioCool	Corcho aislante para el depósito del BioCool	PBS (Phosphate buffer Saline)
Ventiladores para la refrigeración externa del BioCool	Pinzas de sujeción verticales para tubos del perfusor	Oxigenador - carbógeno
Agitador de aspas del BioCool	Acople de perfusor a aguja de perfusión Luer (hembra-hembra)	Agua destilada para el depósito del BioCool
Portátil con software PicoLog	Crioviales de preservación	
TC-08 Data Logger para termopares	Cántara con $N_2(l)$ para preservación	
Refractómetro	Guantes de protección contra $N_2(l)$	
Medidor de pH		

2.3.2.1 Preparación de equipos, material e instalaciones

BioCooly perfusor

21. Llenar el depósito del BioCool con etanol y agua (1 parte de etanol, 2 partes de agua) hasta cubrir las aletas metálicas que sobresalen a unos 2 cm del borde.
22. Preparar soluciones de perfusión – búfer salino y crioprotector. Es conveniente disponer de dos vasos de precipitado etiquetados que sirvan como depósitos para ambas soluciones.⁶
23. Purgar los conductos de las bombas para evitar bolsas de aire, que podrían reventar la pared arterial y la membrana que cierra la aorta. Esto se realizará conectando una fuente de alimentación a la entrada de la bomba, y aplicando una tensión en bornas de 12V para mover el rotor de la peristáltica lo más rápido posible y así cebar los tubos.
24. Se ha de garantizar que la electrónica que gestiona la perfusión está adecuadamente alimentada. Las fuentes de tensión – baterías – han de estar ambas utilizables.
 - a. Se recomienda medir con un refractómetro la salida del perfusor, hasta comprobar que, una vez terminado el cebado, la salida da alrededor de un 2% al encender el programa, lo que corresponde a PBS puro. Esto se hace para evitar restos de DMSO en el conexionado que pudieran intoxicar al órgano durante los primeros instantes de la perfusión.
25. Montar el agitador con aspas sobre el BioCool, de forma que la varilla y las aspas se encuentren sumergidos unos 10 cm.



59. Izquierda: Equipo de criopreservación listo para el funcionamiento. Derecha: criovial preparado para la vitrificación.

⁶ Las soluciones se describirán de forma detallada en el apartado Anexos.

PicoLog

26. Configurar una adquisición de datos de tamaño 50.000 muestras, a un ritmo de 1 muestra por segundo. El programa no debería exceder las 4.500 muestras, pero se añade ese margen por posibles errores y repeticiones.
27. Colocar los termopares tipo T y K de la siguiente manera: un tipo T y el tipo K dentro del BioCool, a modo de referencia externa, y el otro termopar tipo T (en el caso experimental, el que corresponde al canal 2) de forma que mida la temperatura dentro del criovial durante la perfusión. Esto se consigue insertando el termopar por el conducto de drenaje diseñado y elaborado para los cierres de los crioviales.

2.3.2.2 Preparación de la perfusión y conexión al perfusor

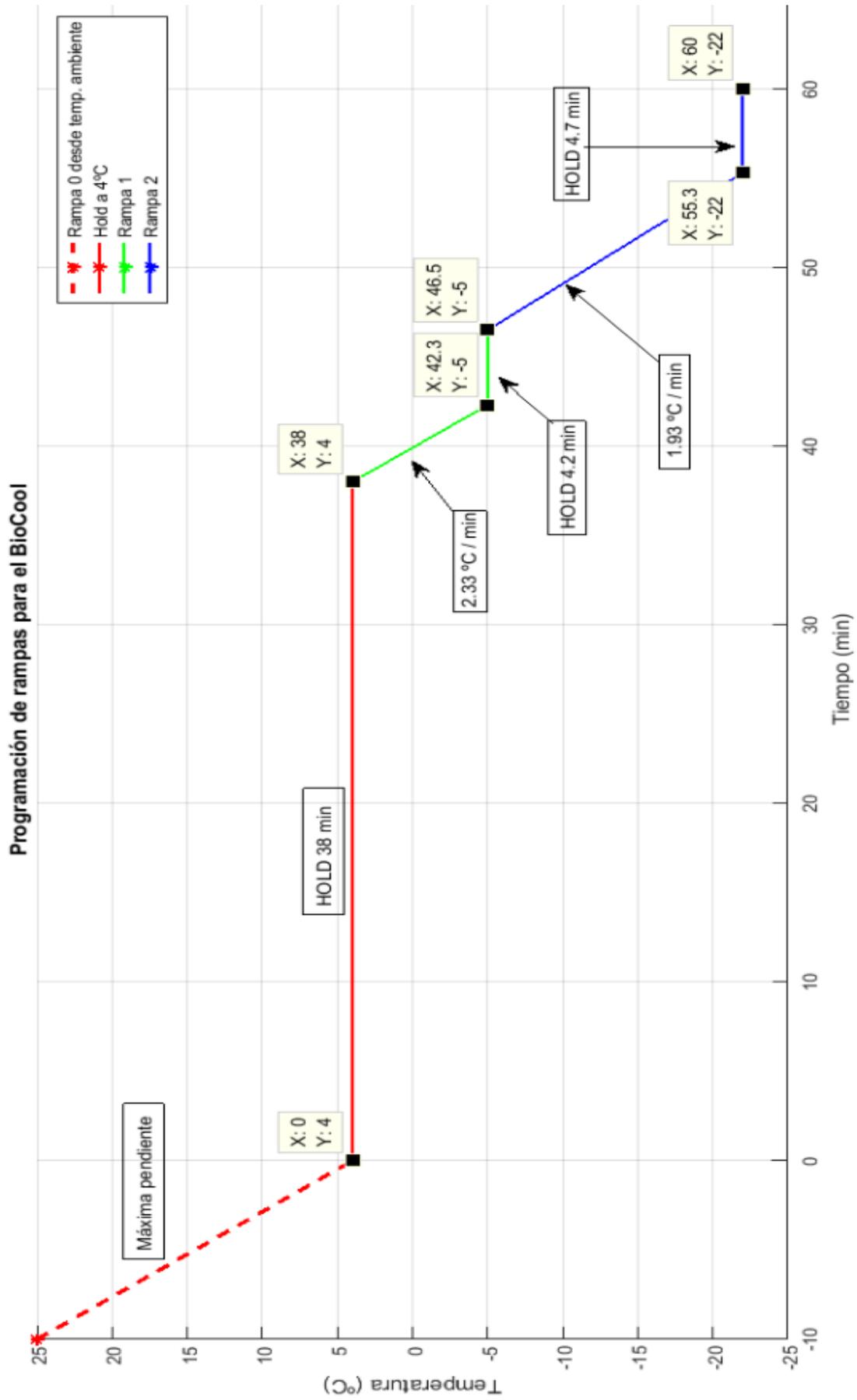
28. Encender el agitador con aspas para crear un movimiento uniforme del contenido del depósito del BioCool.
29. Encender el BioCool y programar la primera rampa, llamada Rampa 0. Consultar la Figura 3 para los parámetros de todas las rampas. También se encuentran los valores genéricos en la Tabla 2.

¡Aviso! Es recomendable usar un cronómetro para coordinar los aparatos.

30. Con la jeringuilla de carga, rellenar los extremos de la conexión del perfusor y de la parte anterior de la aguja (a la cual el corazón se ha canulado) hasta que el menisco de PBS esté convexo, y unir evitando la formación de bolsas de aire.
31. Rellenar el contenedor de criopreservación con PBS, e introducir el corazón canulado en él, asegurándose que se encuentra a la mitad de la profundidad de éste. Colocar la salida de drenaje del contenedor sobre un recipiente.⁷
32. Preparativos del programa de perfusión: con el PC arrancado y LabView abierto, ejecutando el programa *principal.vi*, introducir los datos de las bombas y de la tarjeta de adquisición en la interfaz.
33. Cuando el programa del BioCool llegue a 4°C, se dará comienzo a la perfusión. Introducir el contenedor con el corazón en el depósito del BioCool, sumergido a unos 5 cm, y sujetar con un agarre vertical.
34. Cubrir la superficie del depósito con corcho o algún material aislante, con el fin de evitar gradientes de temperatura de más de 2 grados entre el fondo y la superficie del depósito.
35. Seguir atentamente el programa de perfusión, y realizar la programación pertinente en función del instante de ejecución en que nos encontremos.

Recomendación. Mantener los ventiladores encendidos en los tramos por debajo de los -5°C . No se recomienda encender el ventilador lateral (observar Figura 4) antes, pues el congelador podría enfriar demasiado rápido.

⁷ Para medir la absorción de DMSO, usar el goteo de salida del drenaje y medir índice de refracción.



60. Parámetros de programación de rampas para el BioCool.

Tabla 18. Valores para programación de las rampas de temperatura.

Programas	$T_{inicial}$ (°C)	Rampa (°C/min)	T_{final} (°C)	Hold (min)
Rampa 0	Ambiente	1	5	38
Rampa 1	4	2.3	-5	4.2
Rampa 2	-5	1.9	-22	4.7

36. El uso de ventiladores externos es crítico para el experimento, pues el propio ventilador interno del aparato no está en funcionamiento. Para las dos primeras rampas, es necesario trabajar con el extractor que saque hacia fuera todo el calor generado por la resistencia calefactora del BioCool. Para la tercera rampa, un segundo ventilador de apoyo será suficiente para alcanzar las temperaturas.

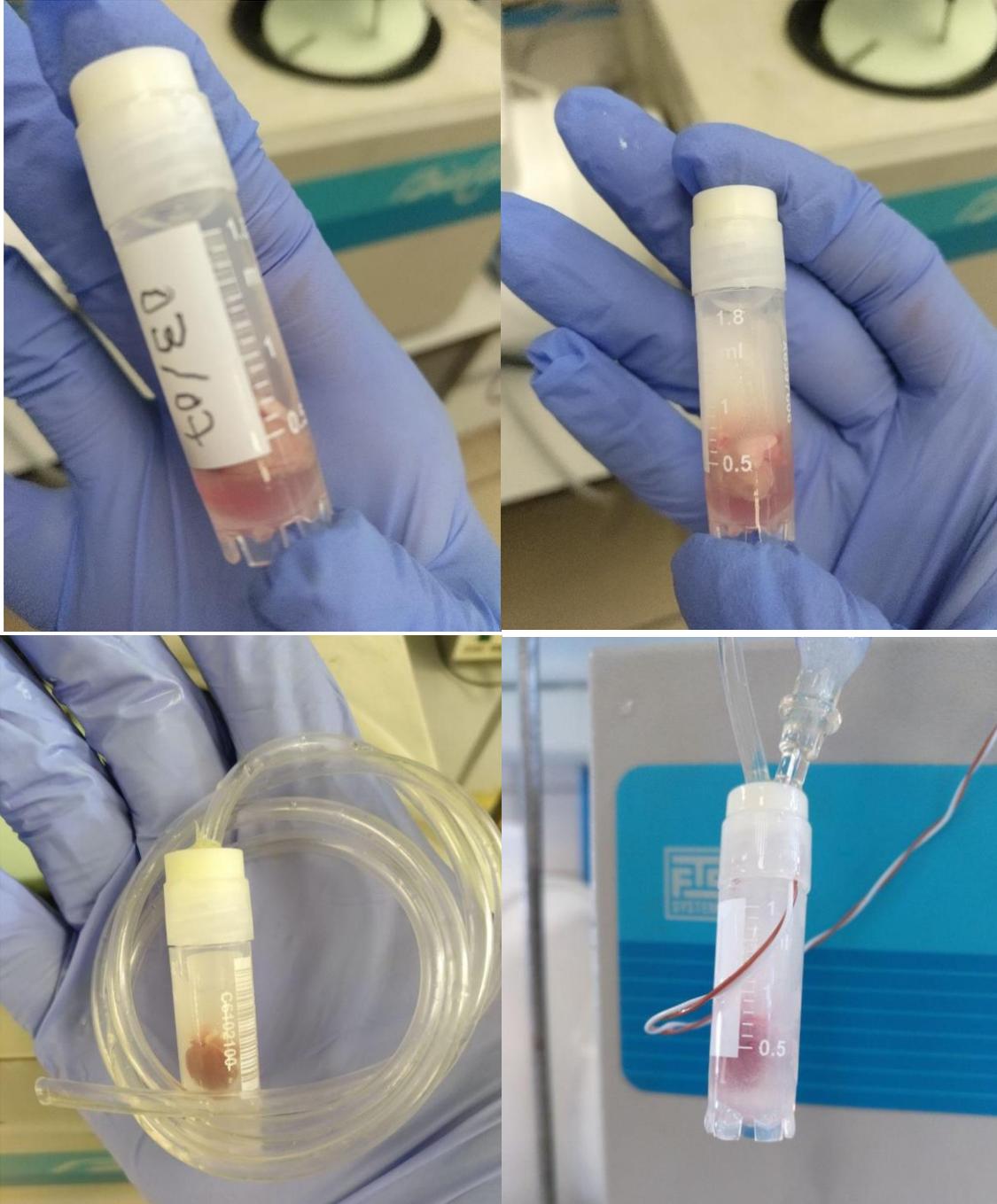


61. Disposición de los ventiladores de apoyo al BioCool.

37. Una vez finalizada la perfusión, apagar todos los aparatos – especialmente el perfusor. Se debe extraer con sumo cuidado la muestra del criovial, y realizar tres tareas:
- Si se va a almacenar en nitrógeno líquido:
 - Medir el % Brix dentro del criovial y fuera del corazón
 - Vaciar al completo el criovial
 - Introducir el corazón en él, desconectado de la aguja, y cerrar con un nuevo cierre sin perforar
 - Si se va a almacenar en congelador a -27°C
 - Medir el %Brix dentro el criovial. La cantidad de DMSO retenida dentro del corazón será la diferencia entre la máxima concentración perfundida y la cantidad medida fuera del corazón.
 - Administrar tanto DMSO como sea necesario para igualar la concentración de DMSO dentro y fuera del corazón y evitar gradientes grandes.

- iii. Almacenar cerrado en el mismo criovial dispuesto en un rack dentro del congelador.

Nota Fechar todos los crioviales e indicar el tipo de órgano si no es fácilmente reconocible para su posterior análisis.



62. Resultado del equilibrium vitrification al término de la perfusión.

2.4 Equilibrium vitrification de tejido nervioso central

Con el experimento de Fahy como referencia, se desea ensayar el equilibrium vitrification para tejido nervioso central de ratón. Los tiempos de las curvas se reducirán dado el tamaño inferior del órgano del ratón al de riñón de conejo que usó el investigador en principio. Se basará en el control y seguimiento de dichas curvas por parte de un sistema de perfusión y un sistema de temperatura para cargar el tejido con crioprotector antes del almacenamiento a menor temperatura. Este órgano implica algunas complicaciones para el experimento 2.

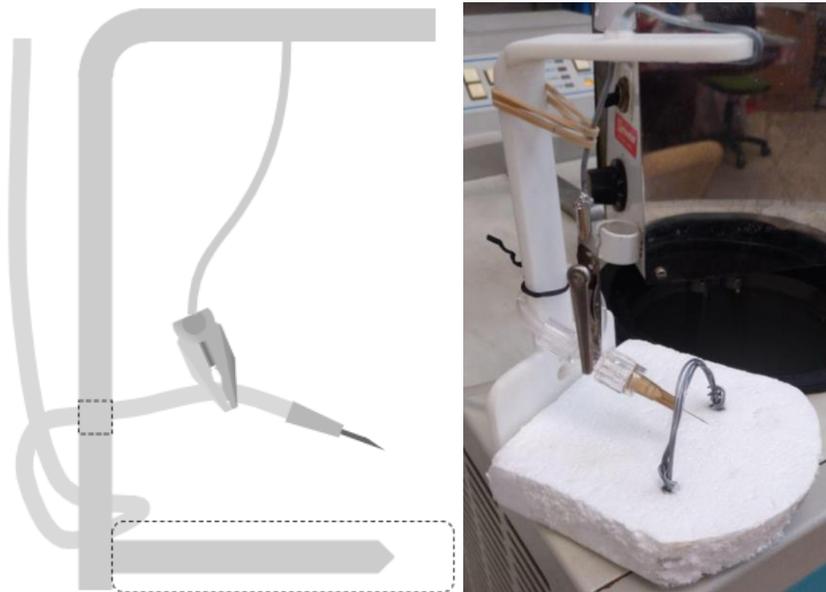
2.4.1 Descripción de sistemas

El experimento de vitrificación de equilibrio del tejido nervioso requiere de los mismos equipos que el de corazón, con la salvedad de que no se ha de aislar el corazón, sino que se perfunde el órgano completo. El único elemento adicional que se requiere para este experimento es el soporte de perfusión. No se describirán de nuevo los equipos y sistemas ya explicados en apartados anteriores.

Soporte de perfusión

El soporte fue diseñado y construido como se explica en el anexo dedicado a esta sección. La necesidad de mantener inmóvil el cuerpo del ratón durante la perfusión empujó a diseñar y construir este elemento de apoyo al experimento. Tras la esquematización del problema y el boceto, se alcanzó una forma genérica funcional que cumpliera con todas las funcionalidades requeridas:

- Disponer de un modo de sujeción del corcho al cual se sujeta el ratón tras la anestesia.
- Disponer de un modo de inmersión en la cámara del BioCool, así como de extracción.
- Disponer de un modo de sujeción de la aguja de perfusión pinchada.
- Disponer de un modo de sujeción mecánica del tubo de perfusión para evitar tirones.
- Caber en la cámara del BioCool con todos los elementos necesarios para el experimento.



63. Izquierda: idea genérica del soporte. Derecha: soporte construido y utilizado en los experimentos.

El asa superior permite la inmersión y extracción de la cámara del BioCool, a la vez que sirve de tope para mantener sumergido todo el soporte durante el experimento, al estar topando con el agitador (la flotabilidad del corcho era una problemática). El orificio en la base del cuello del soporte permitía la introducción e inmovilización del tubo de perfusión. Los dientes de sujeción se introducían en el corcho para dejarlo consolidado con el soporte. Su forma final era de cruz para garantizar firmeza en dos direcciones principales. Se acopló un alambre rígido, el cual fue soldado a una pinza tipo cocodrilo, para proporcionar sujeción y manejo a la aguja de perfusión. Este alambre se encontraba sujeto al asa con un agarre de silicona perforado y sujeto con resina Epoxi.

El arco de alambre que se aprecia en la imagen anterior a la derecha sirve de protección para la caja torácica del corazón frente a colisiones, y a su vez de punto de sujeción para un termopar para poder tomar medidas de temperatura intracraneales.

Se demuestra una vez más la alta valía de las tecnologías de impresión 3D en conjunto con el CAD para aplicaciones de bioingeniería y biomédicas, proveyendo de soluciones a medida a los problemas propuestos.

2.4.2 Procedimiento experimental

Tabla 19. Material para el Experimento 3.

Equipos	Material	Reactivos
Equipo de perfusión completo – bombas, tarjeta de adquisición, PCB	Termopares tipo T (2) y tipo K (1)	DMSO (dimetilsulfóxido) al 99.5%
BioCool	Corcho aislante para el depósito del BioCool	PBS (Phosphate buffer Saline)
Ventiladores para la refrigeración externa del BioCool	Pinzas de sujeción verticales para tubos del perfusor	Oxigenador - carbógeno
Agitador de aspas del BioCool	Acople de perfusor a aguja de perfusión Luer (hembra-hembra)	Agua destilada para el depósito del BioCool
Portátil con software PicoLog	Crioviales de preservación	Agua Type II para lavado
TC-08 Data Logger para termopares	Cántara con $N_2(l)$ para preservación	
Refractómetro	Guantes de protección contra $N_2(l)$	
Medidor de pH	Material de cirugía Jeringa de exanguinación Soporte de perfusión	

Nota: Los equipos para este experimento son idénticos a los utilizados para el apartado de equilibrium vitrification de corazón, por lo que el protocolo será similar con algunas salvedades. No se dispondrá de criovial, pues la perfusión es a cuerpo completo.

Nota: Este protocolo cuenta con una parte de cirugía necesaria para la perfusión con DMSO hasta el tejido nervioso craneal, por vía vascular.

2.4.2.1 Preparación de equipos, material e instalaciones

BioCool y Perfusor

1. Llenar el depósito del BioCool con etanol y agua (1 parte de etanol, 2 partes de agua) hasta cubrir las aletas metálicas que sobresalen a unos 2 cm del borde.
2. Preparar soluciones de perfusión – búfer salino y crioprotector. Es conveniente disponer de dos vasos de precipitado etiquetados que sirvan como depósitos para ambas soluciones.⁸
3. Purgar los conductos de las bombas para evitar bolsas de aire, que podrían reventar la pared arterial y la membrana que cierra la aorta. Esto se realizará conectando una fuente de alimentación a la entrada de la bomba, y aplicando una tensión en bornas de 12V para mover el rotor de la peristáltica lo más rápido posible y así cebar los tubos.
4. Se ha de garantizar que la electrónica que gestiona la perfusión está adecuadamente alimentada. Las fuentes de tensión – baterías – han de estar ambas utilizables.
 - a. Se recomienda medir con un refractómetro la salida del perfusor, hasta comprobar que, una vez terminado el cebado, la salida da alrededor de un 2% al encender el programa, lo que corresponde a PBS puro. Esto se hace para evitar restos de DMSO en el conexionado que pudieran intoxicar al órgano durante los primeros instantes de la perfusión.
5. Montar el agitador con aspas sobre el BioCool, de forma que la varilla y las aspas se encuentren sumergidos unos 10 cm.

PicoLog

6. Configurar una adquisición de datos de tamaño 50.000 muestras, a un ritmo de 1 muestra por segundo. El programa no debería exceder las 4.500 muestras, pero se añade ese margen por posibles errores y repeticiones.
7. Colocar los termopares tipo T y K de la siguiente manera: un tipo T y el tipo K dentro del BioCool, a modo de referencia externa, y el otro termopar tipo T (en el caso experimental, el que corresponde al canal2) de forma que mida la temperatura del cráneo durante la perfusión. Esto se consigue insertando el termopar por la boca del ratón hasta establecer contacto con el hueso sfenoides, el punto más cercano entre la cavidad bucal y la base del lóbulo frontal del córtex.

⁸ Las soluciones se describirán de forma detallada en el apartado Anexos.

Cirugía previa

8. Administrar la dosis de heparina calculada (se puede encontrar en el anexo de cálculo de la dosis de heparina) y esperar entre 30 minutos y 1 hora (CNIC, CITIUS).
9. Transcurrido ese tiempo, administrar la dosis de anestesia (TBE al 2%) requerida para el cese funcional de la actividad general orgánica. En la práctica esto supone una dosis de 400 – 700 μL .
10. Con la pérdida general de los reflejos, se puede proceder a practicar la cirugía. Los pasos iniciales son similares a la cirugía para el experimento de Langendorff.
11. Sujetar el cuerpo del ratón por las extremidades a la placa de cirugía. No será necesario cubrir la superficie con papel.
12. Hacer una incisión horizontal bajo el pecho, a la altura del diafragma y bajo las costillas, Sujetar la piel con unas pinzas para asegurar el corte.
13. Hacer dos incisiones verticales desde ambos extremos de la incisión inicial, y en dirección a las clavículas.
14. Romper el diafragma con un corte horizontal. Facilita el trabajo posterior si se levanta el grupo óseo compuesto por esternón y costillas por la parte delantera, y se elimina con un corte horizontal en la unión con el resto del cuerpo. Esto deja expuesto y accesible el corazón. Se deberá visualizar el órgano con latidos pausados.
15. Trasladar el cuerpo del ratón con el corazón ya expuesto y latiendo a la placa de criopreservación. Esta se encuentra ya acoplada al soporte de perfusión. Asegurar las extremidades a la placa de manera que el corazón quede lo más cerca posible de la aguja.
16. Con el corazón pinchado en el ventrículo izquierdo por la aguja, y con el complejo inmobilizado, conectar la jeringa de exanguinación llena de PBS o Tyrode's al tubo de perfusión que lleva a la aguja.

Nota: El siguiente paso se deberá realizar dentro de una bandeja profunda, preferiblemente con el soporte de perfusión y el corcho reposando sobre una rejilla metálica.

17. Realizar un corte en la aurícula derecha del corazón, para drenar la sangre y el fluido de exanguinación. Exanguinar al ratón perfundiendo lentamente, pero a ritmo constante con la aguja. Se deberá apreciar el drenado de la sangre, así como la decoloración de pulmones, corazón e hígado, que pasará de un color beige intenso a amarillo.

2.4.2.2 Preparación de la perfusión y conexión al perfusor

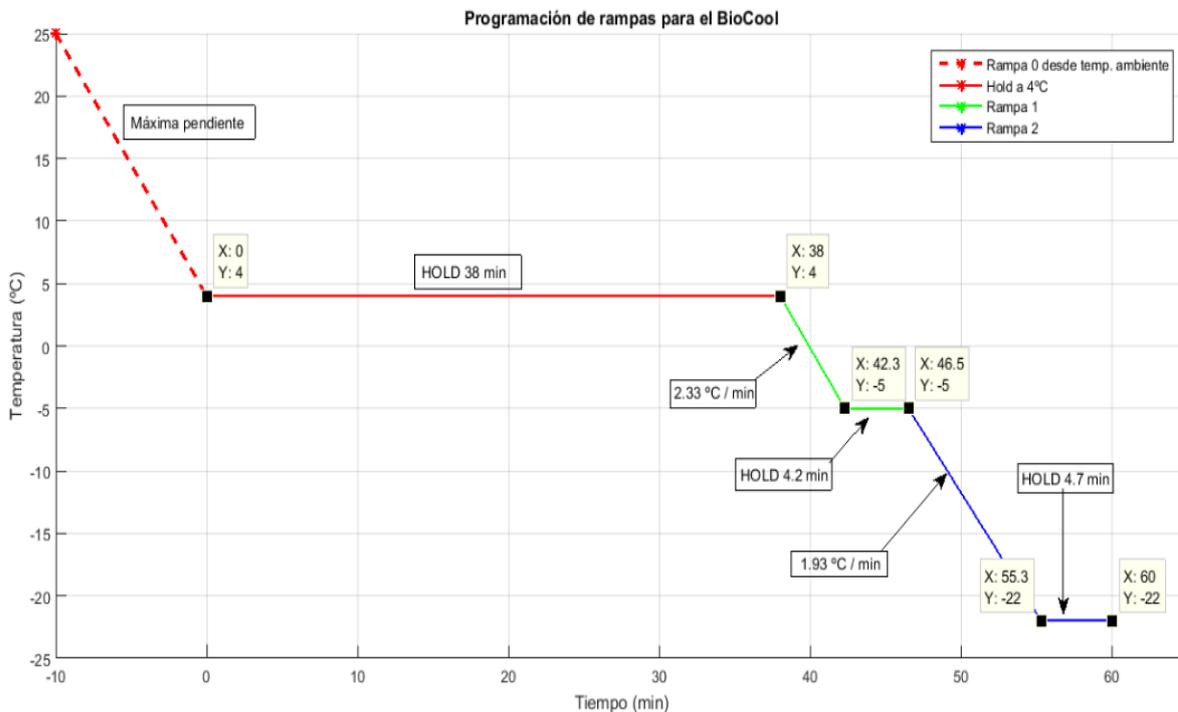
18. Encender el agitador con aspas para crear un movimiento uniforme del contenido del depósito del BioCool.
19. Encender el BioCool y programar la primera rampa, llamada Rampa 0. Consultar la figura siguiente para los parámetros de todas las rampas. También se encuentran los valores genéricos en la tabla que lo sigue.

¡Aviso! Es recomendable usar un cronómetro para coordinar los aparatos.

20. Con la jeringuilla de carga, rellenar los extremos de la conexión del perfusor y de la parte anterior de la aguja de perfusión hasta que el menisco de PBS esté convexo, y unir evitando la formación de bolsas de aire.
21. Preparativos del programa de perfusión: con el PC arrancado y LabView abierto, ejecutando el programa *principal.vi*, introducir los datos de las bombas y de la tarjeta de adquisición en la interfaz.
22. Introducir el termopar del canal 2 en el cuerpo del ratón como se ha indicado.
23. Cuando el programa del BioCool llegue a 4°C, se dará comienzo a la perfusión. Introducir el soporte de perfusión con el cuerpo del ratón en el depósito del BioCool, sumergido a unos 15 cm, y sujetar con un agarre vertical. Dar comienzo a la toma de datos con el PicoLog.
24. Cubrir la superficie del depósito con corcho o algún material aislante, con el fin de evitar gradientes de temperatura de más de 2 grados entre el fondo y la superficie del depósito.
25. Seguir atentamente el programa de perfusión, y realizar la programación pertinente en función del instante de ejecución en que nos encontremos.



64. Montaje genérico del experimento.



65. Parámetros de programación de rampas para el BioCool.

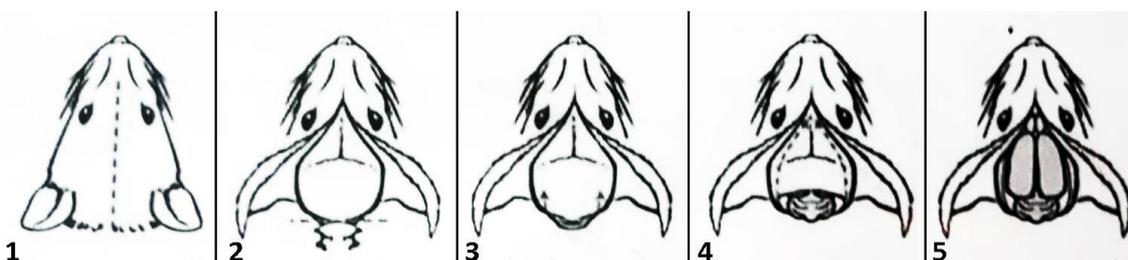
26. El uso de ventiladores externos es crítico para el experimento, pues el propio ventilador interno del aparato no está en funcionamiento. Para las dos primeras rampas, es necesario trabajar con el extractor que saque hacia fuera todo el calor generado por la resistencia

calefactora del BioCool. Para la tercera rampa, un segundo ventilador de apoyo será suficiente para alcanzar las temperaturas.



66. Disposición de los ventiladores de apoyo al BioCool.

27. Una vez finalizada la perfusión, apagar todos los aparatos – especialmente el perfusor. Se debe extraer con sumo cuidado el cuerpo de la cámara, y realizar tres tareas:
- Realizar la cirugía de apertura de cráneo lo más rápido posible para evitar recalentamiento. Es beneficioso hacerlo dentro de una cámara o habitáculo frío. Seguir los cortes marcadas en la figura inferior.



67. Pasos de la cirugía craneal.

- Extraer el órgano central del sistema nervioso con cuidado de no dañarlo o cortar partes de él. Es más sencillo hacerlo con uso de una espátula de preparación de reactivos. Se ha de comprobar con delicadeza la consistencia del órgano, para evaluar su estado de cristalización general.
- Introducir el órgano en un criovial ya fechado, y almacenar en nitrógeno líquido hasta su análisis. El criovial ha de estar vacío.



68. Resultado del equilibrium vitrification al término de la perfusión.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método de análisis de los resultados de absorción de DMSO es, como se comentó, por medio de tomografía axial computerizada. No obstante, dada la extensión del trabajo y el volumen de datos obtenidos de los experimentos, se expondrán resultados desde varias perspectivas, sea resultados de cirugía, canulación, latido en el experimento de Langendorff, electrocardiografía, retención de DMSO o inspección tisular.

Los resultados se ofrecerán de la siguiente manera:

1. Tabla completa de resultados de todos los experimentos de Langendorff y vitrificación de equilibrio realizados.
 - a. Anotaciones sobre los experimentos.
2. Resultados del Experimento 1: perfusión Langendorff.
 - a. Resultados de la cirugía y discusión
 - b. Resultados de latido y discusión
3. Resultados de los Experimentos 2 y 3: vitrificación de equilibrio
 - a. Resultados del TAC en el CNA (días 31/07 y 07/08) y discusión
 - i. Calibraciones previas
 - ii. Retención de DMSO
 - b. Inspección tisular y comentarios breves

De un total de 32 ratones para experimentación, se destinaron 12 exclusivamente al experimento de Langendorff. 12 se destinaron a experimento de Langendorff y vitrificación de equilibrio para corazón, y otros 8 para vitrificación de equilibrio de tejido nervioso central. Esto es así debido a la curva de aprendizaje que requerían los experimentos. No fue hasta el experimento número 8 que se obtuvieron latidos consistentes. Llegados a este punto, y tras 4 experimentos más satisfactorios, se procedió a iniciar la vitrificación de equilibrio para corazón. Una vez se tenía más manejo con esta técnica, se pasó a la criopreservación de tejido nervioso.

Con los datos obtenidos de los experimentos, se hizo un análisis de datos al contraste, comparando variables de cada ratón y plasmando las relaciones en gráficas. Se incluye al final de este proyecto un anexo de relaciones entre las variables que pueden resultar de interés. Dada la relevancia de algunas de ellas, se incluyen en el presente capítulo algunas de ellas.

3.1 Resultados generales

Se construyó una tabla con un total de 13 entradas o valores para cada uno de los 32 experimentos individuales. Estas entradas recogen datos del ratón, datos del Experimento 1 y datos de los Experimentos 2 y 3. Por imposibilidad de presentarlos todos juntos se divide en 3 sub-tablas con los datos separados por categoría.

En la siguiente tabla se muestran los datos de interés de todos los ratones de los experimentos. Se muestra la fecha del experimento y el código, la cepa, edad, sexo y peso.

Tabla 20. Tabla completa de resultados (1/3)

Identificativo		Datos del ratón			
Fecha	Número de experimento	Cepa	Edad (meses)	Sexo	Peso (g)
25/04	1	C57	10	F	31.56
02/05	2	C57	10	F	31.84
14/05	3	FVB	1.25	F	26.20
15/05	4	FVB	1.25	F	25.80
17/05	5	FVB	1.25	F	26.04
20/05	6	TS1CJE	11	M	40.70
21/05	7	TS1CJE	11	M	41.81
21/05	8	TS1CJE	11	M	44.21
04/06	9	FVB	7	M	32.56
05/06	10	FVB	7	M	31.00
07/06	11	FVB	7	M	30.41
12/06	12	FVB	7.25	M	28.07
13/06	13	FVB	7.25	M	38.00
14/06	14	FVB	7.25	M	31.17
17/06	15	CD-1	8	M	41.44
02/07	16	C57-C3H	11	M	31.50
03/07	17	C57-C3H	11	M	29.46
05/07	18	C57-C3H	11	M	36.64
05/07	19	CD-1	8.5	M	40.35
14/07	20	FVB	2	M	25.70
17/07	21	CD-1	10	M	48.64
17/07	22	CD-1	10	M	48.64
17/07	23	CD-1	10	M	41.30
19/07	24	FVB	2	M	19.50
21/07	25	BEIGE	2.25	F	19.17
23/07	26	BEIGE	2.25	F	20.86
24/07	27	BEIGE	2.25	F	20.08
30/07	28	BEIGE	2.5	F	19.22
05/08	29	CD-1	11	M	54.28
06/08	30	BEIGE	3	M	20.23
06/08	31	CD-1	11	M	44.22
06/08	32	BEIGE	3	F	18.66

Los datos de la cirugía y el experimento de Langendorff se presentan en la tabla siguiente. Se incluye una breve descripción de algunos experimentos resaltados en negrita al final de las tres tablas.

Tabla 21. Tabla completa de resultados (2/3)

Identificativo		Datos del Langendorff			
Fecha	Número de experimento	Dosis Heparina (UI)	Canulación (tiempo)	Perfusión	Latido
25/04	1	0	60'	Sí	No
02/05	2	0	60'	Sí	No
14/05	3	0	60'	No	No
15/05	4	0	50'	No	No
17/05	5	0	45'	Sí	No
20/05	6	0	30'	Sí	No
21/05	7	0	7' 30''	Sí	No
21/05	8	0	11' 07''	Sí	Sí
04/06	9	4	8' 40''	Sí	Sí
05/06	10	4	13' 59''	Sí	Sí
07/06	11	4	10'	Sí	No
12/06	12	4	18'	Sí	No
13/06	13	4	7'	Sí	No
14/06	14	4	13' 57''	Sí	No
17/06	15	10	8'	Sí	Sí
02/07	16	12	5' 15''	Sí	Sí
03/07	17	12	1' 55''	Sí	Sí
05/07	18	12	5' 45''	Sí	Sí
05/07	19	12	4' 30''	Sí	No
14/07	20	8	-	-	-
17/07	21	12	2' 30''	Sí	Sí
17/07	22	12	-	-	-
17/07	23	20	6'	Sí	Sí
19/07	24	12	3' 55''	Sí	Sí
21/07	25	9	-	-	-
23/07	26	9	-	-	-
24/07	27	18	-	-	-
30/07	28	18	-	-	-
05/08	29	15	2' 50''	Sí	Sí
06/08	30	15	-	-	-
06/08	31	15	4' 10''	Sí	Sí
06/08	32	12	-	-	-

Y finalmente, los datos de vitrificación de equilibrio para cada experimento. No se incluye el DMSO retenido, pues esto se encuentra en el apartado de resultados obtenidos de CT.

Tabla 22. Tabla completa de resultados (3/3)

Identificativo		Datos de vitrificación de equilibrio			
Fecha	Número de experimento	Órgano	Vitrificación	Cristalización	Almacenamiento
25/04	1	-	-	-	-
02/05	2	-	-	-	-
14/05	3	-	-	-	-
15/05	4	-	-	-	-
17/05	5	-	-	-	-
20/05	6	-	-	-	-
21/05	7	-	-	-	-
21/05	8	-	-	-	-
04/06	9	-	-	-	-
05/06	10	-	-	-	-
07/06	11	-	-	-	-
12/06	12	-	-	-	-
13/06	13	Corazón	Sí	Sí	-27°C
14/06	14	-	-	-	-
17/06	15	Corazón	Sí	Sí	-27°C
02/07	16	Corazón	Sí	No	-27°C
03/07	17	Corazón	Sí	No	-27°C
05/07	18	-	-	-	-
05/07	19	-	-	-	-
14/07	20	T. Nerv.	Sí	No	-196°C
17/07	21	Corazón	No	-	-196°C
17/07	22	T. Nerv.	No	-	-196°C
17/07	23	Corazón	Sí	No	-27°C
19/07	24	Corazón	Sí	No	-196°C
21/07	25	-	-	-	-
23/07	26	-	-	-	-
24/07	27	T. Nerv.	Sí	Sí	-196°C
30/07	28	T. Nerv.	Sí	No	-196°C
05/08	29	Corazón	Sí	No	-196°C
06/08	30	T. Nerv.	Sí	No	-196°C
06/08	31	Corazón	Sí	No	-196°C
06/08	32	T. Nerv.	Sí	No	-196°C

Anotaciones sobre los experimentos (siguiendo el código identificativo de cada experimento):

- Experimentos 1 – 7: Toma de contactos y práctica inicial con la cirugía y el proceso de canulación. Esta fase duró aproximadamente un mes, en el cual se compaginaban experimentos prácticos con sesiones teóricas y aprendizaje propio de las técnicas.
- Experimento 8: Habiendo reducido el tiempo de canulación, y con mejoras en la praxis quirúrgica, se obtiene el primer latido en el laboratorio. Latidos auriculares débiles durante 20 segundos.
- Experimento 9: Latidos débiles durante 20 segundos, pero continuados. Durante la congelación, la bomba de Tyrode's dejó de funcionar, invalidando la perfusión.
- Experimento 10: Latidos auriculares continuados durante 35 segundos. Posible coágulo en las coronarias.
- Experimento 11: Latidos auriculares leves. Canulación poco exitosa (perforación del septo ventricular)
- Experimento 12: Errores sobre protocolo. Canulación infructuosa.
- Experimento 13: Problemas con la perfusión Langendorff. Se adopta definitivamente la bomba Harvard para futuros experimentos. Problemas con la perfusión de DMSO. Cristalización por ausencia de ACP.
- Experimento 14: Errores sobre protocolo. Corazón excesivamente graso, difícil canulación.
- Experimento 15: Espasmos ventriculares con latido auricular sostenido. La canulación se hizo por uno de los vasos ramificados del arco.
- Experimento 16: Latidos completos durante más de 10 minutos, tanto en suspensión como dentro del recipiente de perfusión Langendorff.
- Experimento 17: Latidos vigorosos de corazón completo, más poderosos que en el experimento anterior. Se fueron mitigando poco a poco dado que el aparato calefactor no estaba funcionando. Al solucionar este error, el corazón volvió a latir a buen ritmo.
- Experimento 18: Latidos de corazón completo durante 5 minutos, tras los cuales el corazón se desprende de la aguja. Es vuelto a canular, aunque se descarta su supervivencia.
- Experimento 19: Problemas con el agarre de la aorta a la cánula. No se aprecian latidos dado el fallo de canulación. Se cambia a un hilo de sutura más grueso.
- Experimento 20: Primera prueba con tejido nervioso central. Avance lento y con ligeros contratiempos, pero en general provechoso.
- Experimento 21: Control (no perfundido) el corazón. No exanguinado.
- Experimento 22: Control (no perfundido) el órgano nervioso central. No exanguinado.
- Experimento 23: Latidos muy enérgicos. Dos minutos completos a alta frecuencia y con gran poder. Vitricación de equilibrio inmediata tras la exanguinación por latido.
- Experimento 24: Latido enérgico. Se practica electrocardiografía exitosa sobre la muestra. Experimento de vitricación de equilibrio con éxito.
- Experimento 25: Prueba no exitosa con tejido nervioso central.
- Experimento 26: Prueba no exitosa con tejido nervioso central.
- Experimento 27: Cristalización del tejido al término de la vitricación de equilibrio.
- Experimento 28: Vitricación de equilibrio en ausencia de cristales, pero mal exanguinado.
- Experimento 29: Canulación en 30'', pero se desprendió de la cánula. Se volvió a canular. Latidos muy enérgicos y prolongados. Sin cristalización al término del experimento de congelación.
- Experimento 30: Sin detalles importantes.
- Experimento 31: Latidos enérgicos y prolongados. Sin detalles sobre congelación.
- Experimento 32: Exanguinación completa del cuerpo. Sin cristalización al término de la congelación.

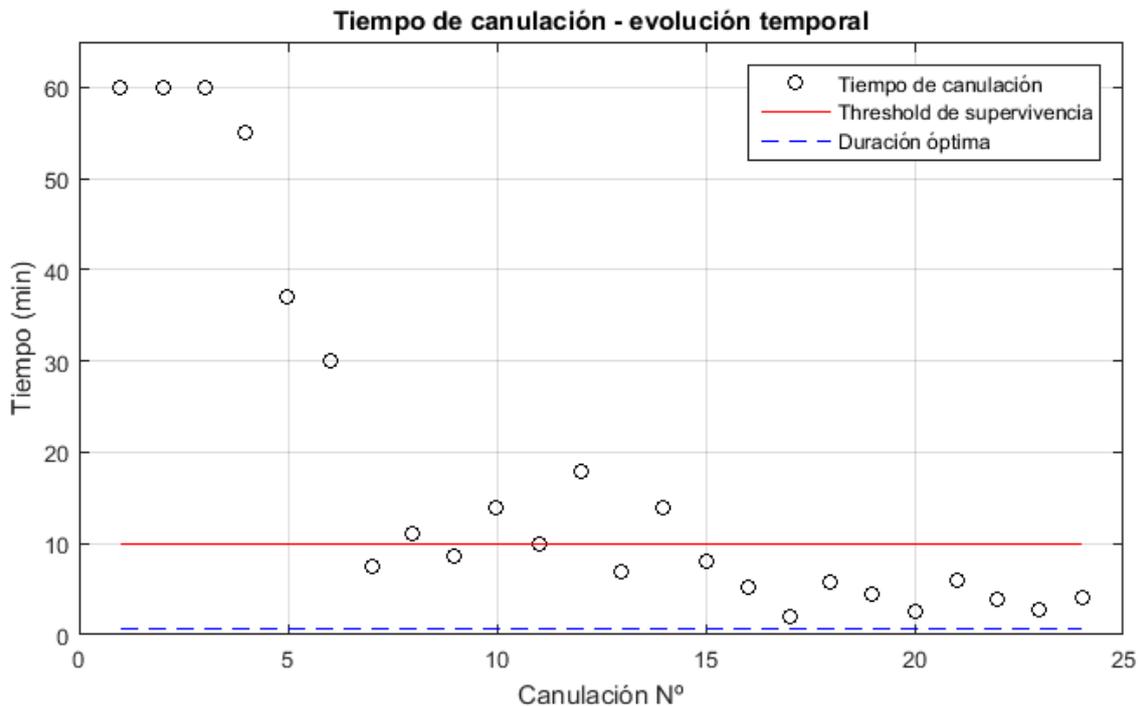
3.2 Sobre el Experimento 1: perfusión aislada Langendorff

3.2.1 Sobre la cirugía

La cirugía – desde la administración de la heparina (previo cálculo de dosis) hasta la canulación – era un paso necesario para una realización exitosa de todos los experimentos. Al no disponer ninguno de los integrantes del equipo de la experiencia en esta materia, fue crucial seguir los consejos de profesionales experimentados en ello, junto con un proceso de autoaprendizaje y práctica en paralelo.

La necesidad de heparinizar a los ratones antes de la cirugía se hacía patente conforme se avanzaba en el experimento de perfusión Langendorff. Esta dosis fue calculada por una estimación relativa al cuerpo humano, y se fue administrando en creciente cantidad hasta alcanzar una dosis que mostrara cambios visibles en la coagulación de la sangre y el drenado de las arterias coronarias.

La canulación, tanto la técnica como el material necesitado para ella, se fue perfeccionando con cada experimento. Se puede apreciar en la siguiente figura la curva que muestra este progreso. Se han trazado, por valor ilustrativo, dos umbrales. Uno representa el umbral tras el cual no se puede esperar supervivencia del corazón ex-vivo. Este umbral habitualmente es más bajo, no superando los 3 minutos, pero la canulación sobre hielo implica un metabolismo más lento y por tanto una mayor horquilla para la canulación.

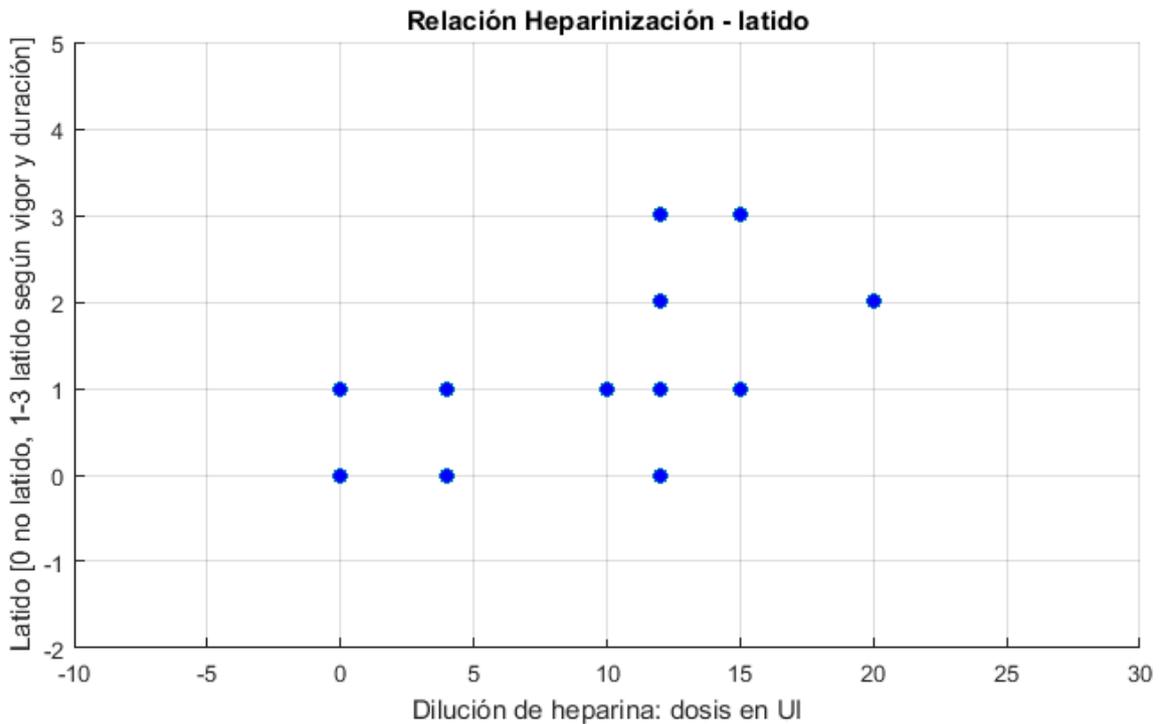


69. Evolución del tiempo de canulación.

La canulación rápida implica un ratio menor de células muertas por isquemia, lo que afecta positivamente a la calidad de los latidos y la integridad funcional del músculo. Se mejora también la capacidad de drenado de sangre del corazón, facilitando la perfusión con ACP posteriormente.

3.2.2 Sobre los latidos

No se obtuvieron latidos (ni siquiera parciales o auriculares) hasta el octavo ensayo del experimento de Langendorff. Se aprecia cómo la presencia de este latido está directamente vinculada a la calidad de la canulación (una canulación no aórtica excita el ventrículo derecho o las aurículas, la perforación del septo ventricular genera arritmias, la perforación del pericardio afecta ligeramente a la potencia de los latidos, etc) pero también por la presencia de heparina, y en qué dosis. Tanto es así, que se puede observar una tendencia ligeramente ascendente en esta relación:

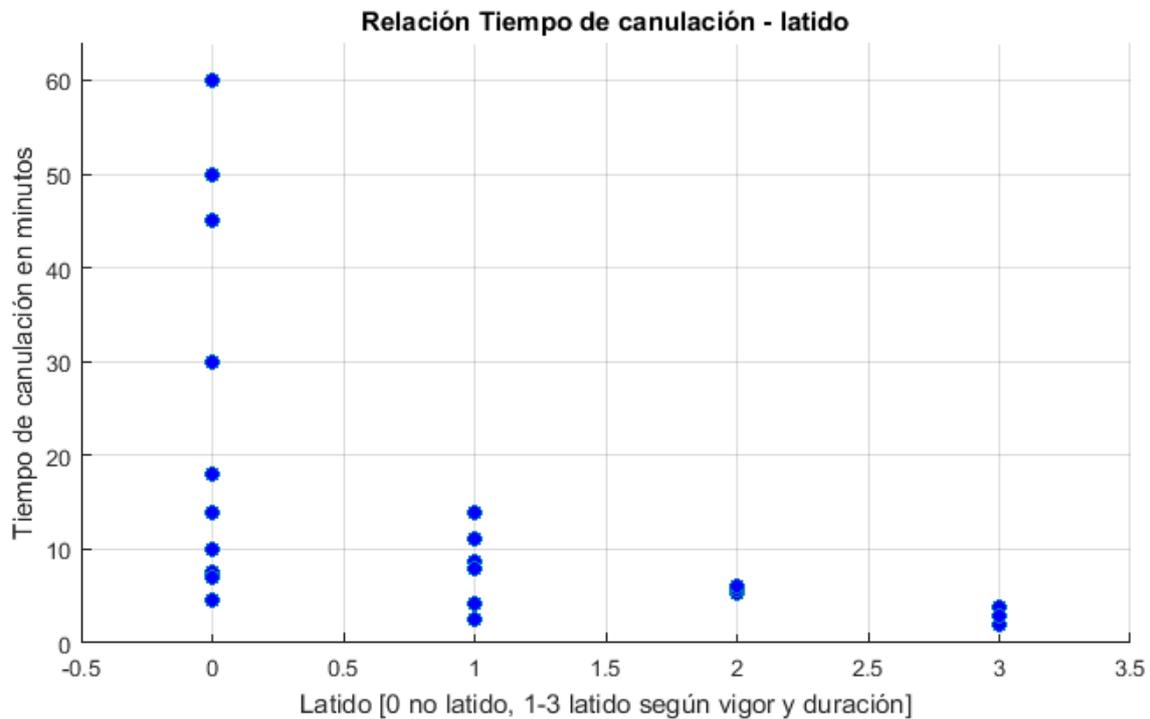


70. Calidad del latido frente a dosis de heparina.

La calidad del latido es una valoración subjetiva de lo observado en el laboratorio. Se califica con un 0 la ausencia de latidos, 1 si el latido es exclusivamente auricular, 2 si los latidos son de corazón completo, pero no al máximo ritmo observado en comparación, por ejemplo, con los corazones latiendo in-vivo durante la cirugía torácica, y 3 es un latido continuado, de corazón completo, y con vigor.

El tiempo de canulación, como se ha comentado, también tiene un efecto directo sobre la calidad de los latidos. De los 23 experimentos en los que se realizó perfusión retrógrada aislada, se apreciaban latidos en 12. Salvo errores sobre protocolo o incidencias posteriores, los latidos se solían producir con los tiempos de canulación más breves, mejorando su calidad en razón directa con la brevedad de esta técnica. Esto se puede apreciar en la siguiente Figura.

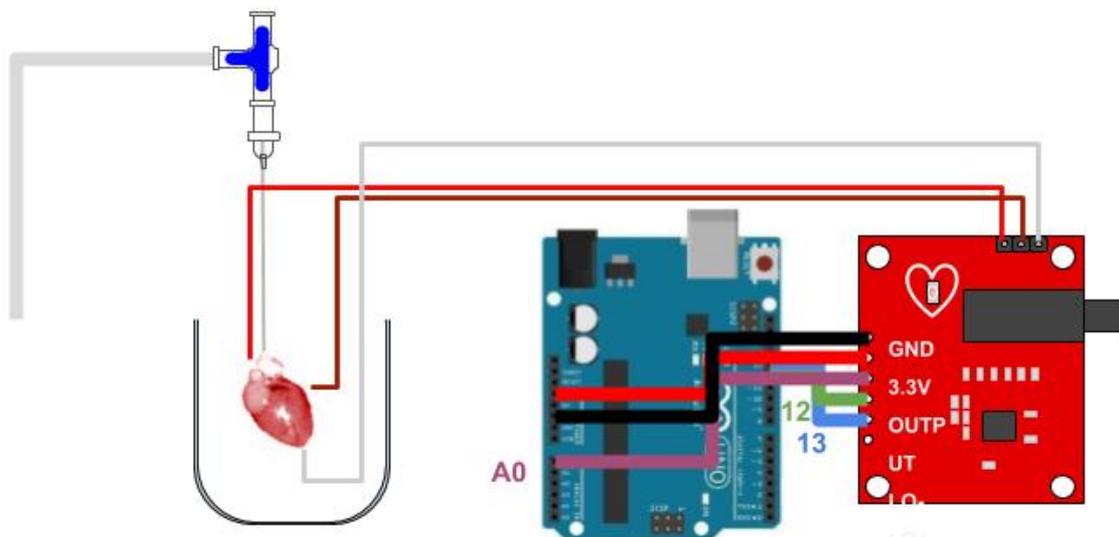
Como es de esperar, no se observan latidos con tiempos de canulación superiores a los 15 minutos. Con una canulación de 5 minutos o menos, se pueden obtener latidos de diferente vigor y frecuencia en función de la bonanza de la canulación y acople al sistema Langendorff.



71. Evolución de la calidad del latido según el tiempo de canulación.

Otro aspecto interesante es la obtención de la bioseñal cardíaca con el sistema de electrocardiografía. Esto se describe en detalle a continuación. Con el corazón suspendido bajo la aguja de perfusión y sumergido en Tyrode's, latiendo, se hubieron de colocar los electrodos de forma que establezcan contacto con aurícula y ventrículo de forma simultánea, sin estorbar al corazón ni sus latidos, y tratando de no perforar la pared muscular pues posteriormente se haría slow freezing del tejido.

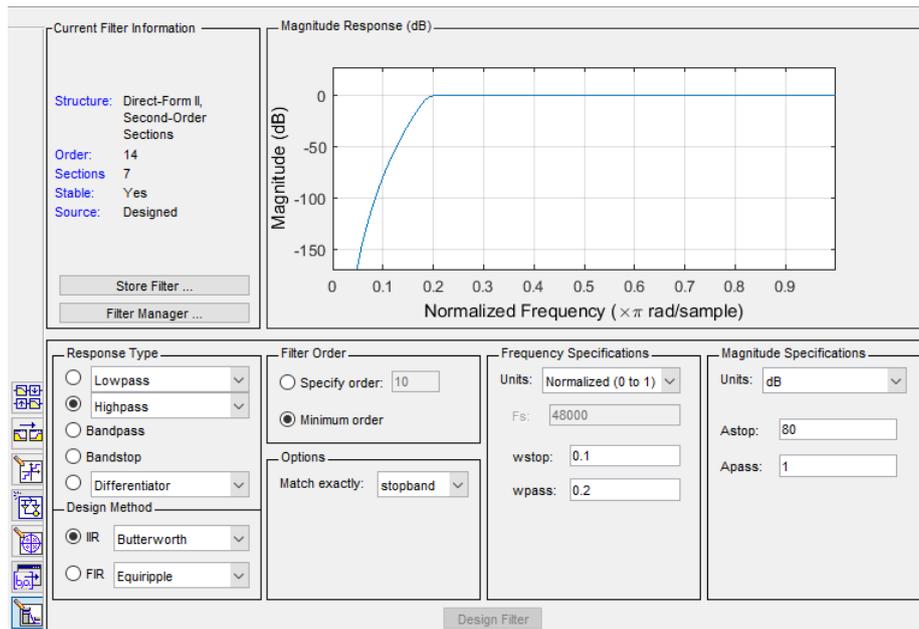
Haciendo uso del mismo instrumental que para los experimentos de perfusión aislada y con los programas de análisis desarrollados en Python, Arduino y Matlab, y con el montaje que sigue:



72. Diagrama de toma de datos para ECG ex vivo.

Al haberse comprobado que la calidad de los electrodos del fabricante no distaba mucho de unos electrodos improvisados con cables de punta de acero, se procedió con los últimos al ser más sencillo de instrumentar el corazón con ellos. Fueron colocados tres electrodos, uno en la aurícula izquierda, otro en el ventrículo izquierdo y otro en la aurícula derecha.

Se tomó una secuencia de 20 segundos de ECG, de la cual se pudo extraer un intervalo de 6 segundos donde la actividad cardíaca es más clara y hay ausencia de ruido – artefactos que alteren la bioseñal. Aun siendo esto así, se apreciaba una componente de baja frecuencia propia de los aparatos para el experimento de Langendorff. Se diseñó un filtro y se trabajó con la señal hasta que pudieron obtenerse los siguientes resultados:



73. Filtro de paso alta para obtener la señal sin la componente de baja frecuencia.

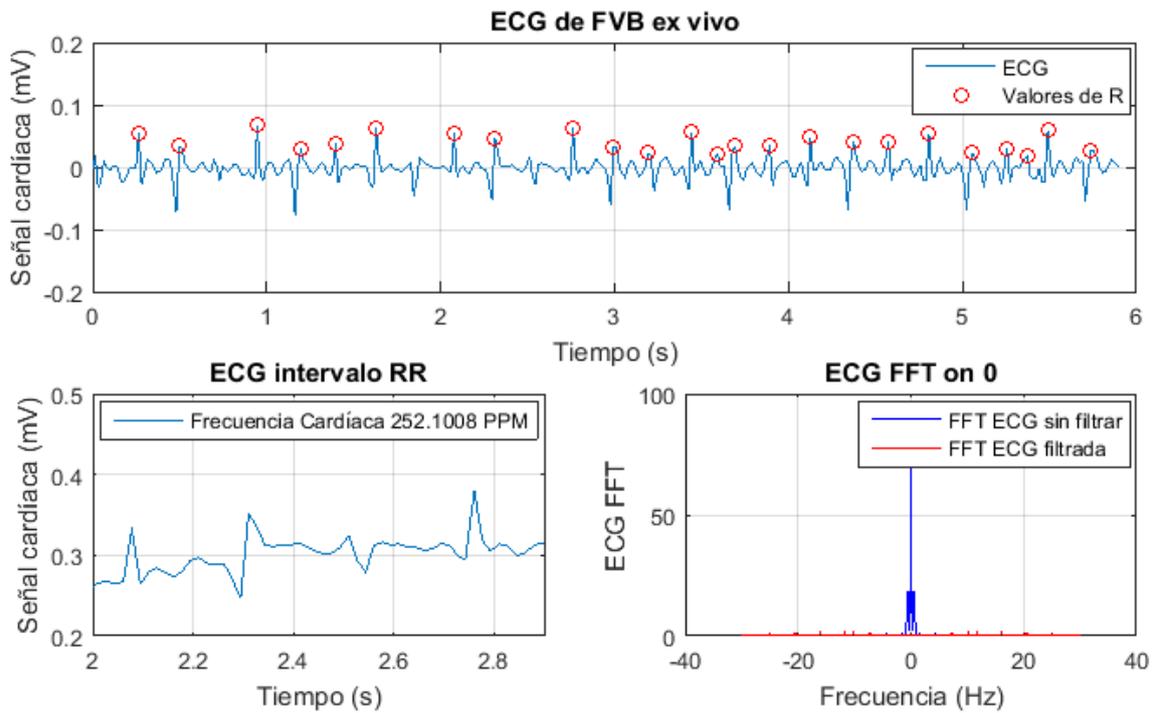
Tabla 23. Datos del ratón en el experimento.

Especie	Identificativo	Sexo	Peso (g)	Edad (meses)
<i>mus musculus</i>	FVB	Macho	19.50	2

Tabla 24. Datos de electrocardiografía.

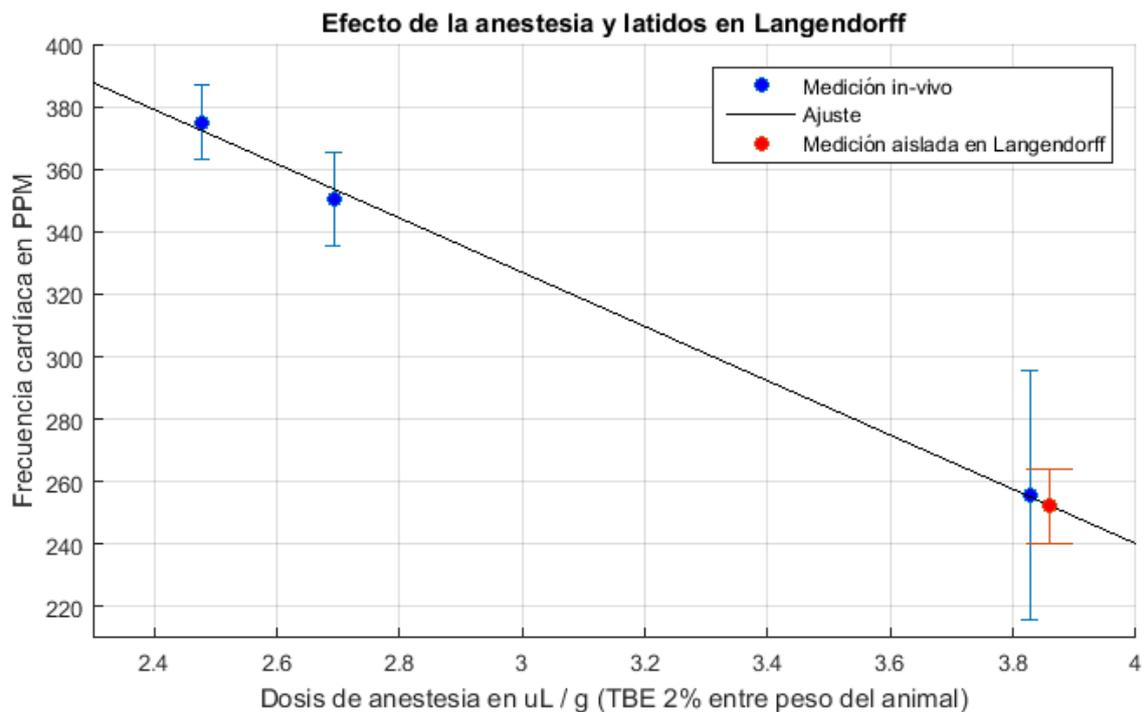
Frecuencia cardíaca (ppm)	Intervalo RR (s)	Magnitud pico R (mV)
252.1008 ± 12	0.24	0.04

Y las gráficas obtenidas, las siguientes:



74. Electrocardiografía ex-vivo de *mus musculus* en perfusión Langendorff.

Con estos datos, se puede trazar una comparativa con los valores de electrocardiografía de ratones in-vivo de los que se dispone. La perfusión Langendorff que se está realizando ofrece una calidad de latido ex-vivo equivalente a la que se obtendría in-vivo con una dosis de anestesia. Esta dosis se puede estimar conociendo la frecuencia cardíaca de los sujetos ya analizados, y la proporción en microlitros por gramo de anestesia para un ratón.



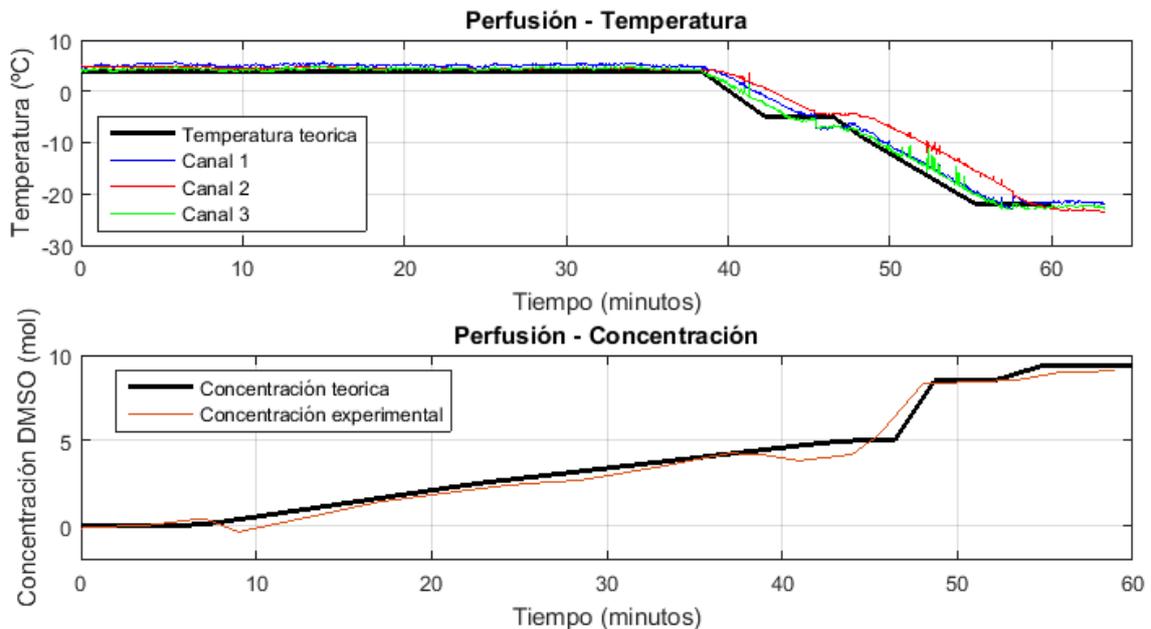
75. Recta TBE (2%) - latidos para *mus musculus*.

Como cabía esperar, las parejas de puntos (dosis de anestesia / peso del animal, frecuencia cardíaca) caen en una recta con pendiente negativa (a mayor dosis, menor frecuencia cardíaca). Se añade la medición aislada para sopesar a qué dosis de anestesia equivaldría nuestro experimento ex-vivo. Esto es importante para conocer cómo es metabolismo en estos niveles reducidos y cuál será el comportamiento que cabe esperar de los tejidos en él.

3.3 Sobre los Experimentos 2 y 3: equilibrium vitrification

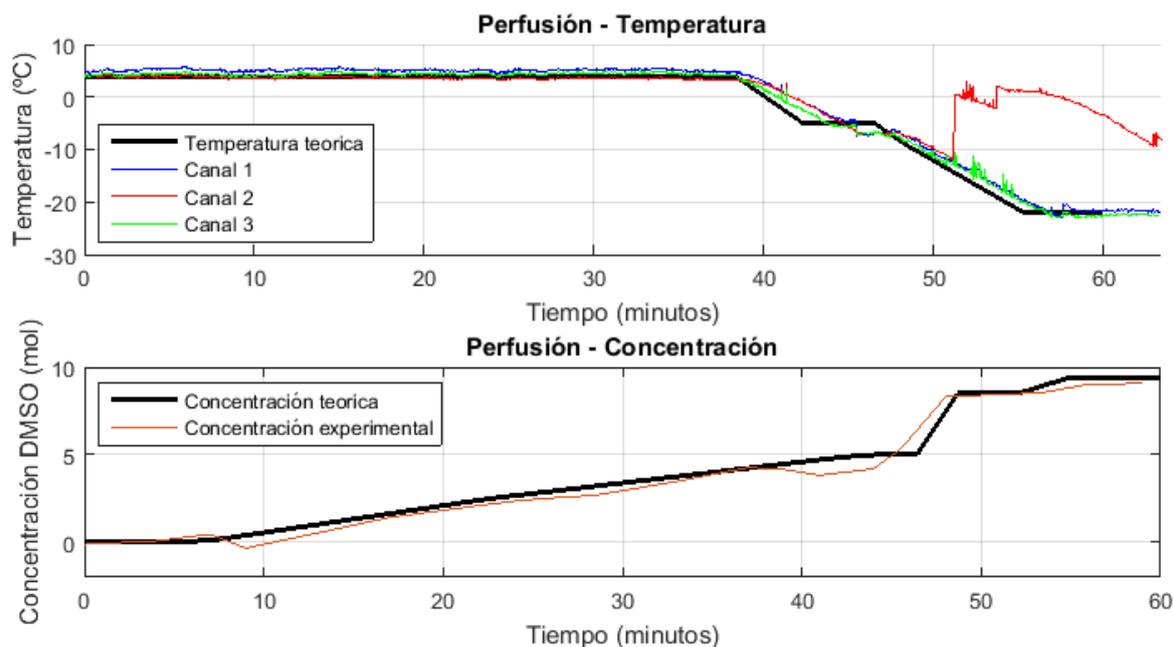
3.3.1 Seguimiento de las curvas

Se comprueba pese a las dificultades un seguimiento de las curvas propuestas por Fahy, contraídas, demostrando que los aparatos diseñados para los experimentos cumplen su función con un error aceptable dentro de la escala de trabajo. Se muestran a continuación dos figuras, referentes a los dos experimentos de vitrificación de equilibrio. En negro se encuentra el perfil propuesto por Fahy y adaptado a nuestro intervalo experimental de 1 hora. A color, las diversas mediciones correspondientes a la validación de los experimentos.



76. Curvas temperatura - concentración para el Experimento 2: corazón.

Se aprecia cómo en el canal 2 (dentro del criovial) se tarda un poco más en alcanzar la temperatura objetivo. Las pendientes de las rampas de temperatura son menos pronunciadas dada la dificultad con la que el BioCool seguía estas rampas, teniendo en cuenta la cantidad de fallas con las que se lidió. Aún así, se observa un tiempo total bastante bueno y un seguimiento satisfactorio (las curvas verde y azul de temperatura muestran la temperatura en la cámara del BioCool).



77. Curvas temperatura – concentración para el Experimento 3: tejido nervioso central.

El salto de temperatura en el canal 2 (el termopar que lee la temperatura craneal) se observó en todos los ensayos de este experimento. Se postula una teoría referente a la temperatura del cráneo con la cavidad bucal llena de etanol y la temperatura del DMSO, más cálida. Al romperse la barrera hematoencefálica dada la presión del DMSO siendo perfundido, el DMSO fluye desde el cráneo en dirección al aparato respiratorio, entrando en contacto así con el termopar. Éste detecta el nuevo fluido a una temperatura más elevada, por lo que registra un escalón que con el tiempo va suavizándose. Esto implicaría una baja absorción de DMSO en el tejido nervioso central, así como la necesidad de perfundir con crioprotector a menor temperatura, ya sea con métodos de refrigeración del depósito o del propio perfusato dentro del tubo de perfusión, a la entrada de la aguja.

También se observa que la temperatura del canal 2 es ligeramente superior a la de los otros canales en las rampas de bajada. Esto se debe a que la materia en contacto con la punta del termopar actúa como aislante térmico del exterior, tardando un poco más en alcanzar la temperatura del resto de la cámara. El interior del cráneo no es un entorno isotérmico, como sí lo es el resto de la cámara, así que el nuevo fluido frío que llega tarda un tiempo en enfriar la cavidad bucal y craneal, a diferencia de lo que pasa con el etanol dentro de la cámara y en constante movimiento.

Se acepta la curva de perfusión de corazón, y se proponen nuevas mejoras para la curva de perfusión de tejido nervioso. Se habrán de explorar nuevos métodos de enfriamiento craneal y del perfusato sin que esto afecte a sus propiedades físicas (el DMSO cristaliza por congelación a 19°C si está en una pureza elevada (superior al 99%). Esto impide enfriar el depósito de DMSO puro, por lo que se abordarán otras soluciones para la problemática de la temperatura del ACP

3.2.1 Resultados tomografía computarizada

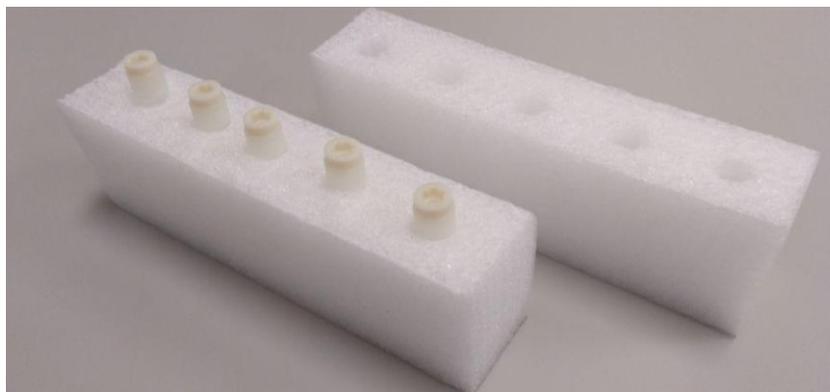
El método preferido de análisis de absorción de DMSO es la tomografía computarizada. El personal del Centro Nacional de Aceleradores analizó las muestras almacenadas, o bien en el congelador a -27°C , o bien en $\text{N}_2(l)$ a -196°C , en su CT animal in-vivo. Esto se hizo en dos sesiones de tomografía y dos sesiones de análisis, comportando los días 31/07, 01/08 y 07/08.

En total se tenían 12 muestras biológicas, 7 corazones y 4 cerebros en la primera sesión, y 4 muestras biológicas en la segunda: 2 y 2. La lista de códigos de las muestras es la siguiente:

Tabla 25. Distribución de muestras para análisis.

Sesión	Corazón			Tejido nervioso central		
	Vial	Fecha	Almacenamiento	Vial	Fecha	Almacenamiento
1	2	13/06	-27°C	2	14/07	-196°C
	3	17/06	-27°C	3	17/07	Control -196°C
	4	02/07	-27°C	4	24/07	-196°C
	5	03/07	-27°C	5	30/07	-196°C
	6	17/07	Control -196°C			
	7	17/07	-27°C			
	8	19/07	-196°C			
	2	4	05/08	-196°C	6	06/08
5		06/08	-196°C	7	06/08	-196°C

Se trasladaron las muestras en una caja termoaislante con hielo las que estaban almacenadas en congelador, y en la cántara de nitrógeno líquido las almacenadas en $\text{N}_2(l)$. Una vez en el CNA, se descongelaron todas las muestras en un baño de agua caliente y se procedió a colocarlas en dos racks de espuma en un orden específico. Los racks de espuma son ideales para colocar eppendorfs o crioviales en el TAC porque en su mayoría es aire, y por tanto no interfiere en el contraste de densidades del TAC. Los huecos de colocación de los viales se hicieron en el laboratorio perforando con un soldador.



78. Rack para crioviales (imagen con recipientes vacíos de ejemplo)

3.2.1.1 Unidades HU

Las unidades que se utilizan en el TAC (Tomografía Axial Computerizada) son las llamadas Unidades Hounsfield (HU) para describir los diferentes niveles de radiodensidad de los tejidos humanos.

La escala de Unidades Hounsfield es el resultado de la transformación de la escala de coeficientes de atenuación lineal de rayos X en una nueva escala en la cual el valor de atenuación del agua destilada en Condiciones Normales de Presión y Temperatura (CNPT) se define como 0 unidades de Hounsfield (HU), mientras que la radiodensidad del aire en Condiciones Normales de Presión y Temperatura (CNPT) se define como -1000 HU, extendiéndose más allá de las 1000 HU asignadas al nivel de absorción del hueso compacto.

El coeficiente de atenuación de los rayos X expresado en Unidades Hounsfield para los diferentes tejidos vivos u otros materiales sometidos a un examen tomográfico de rayos X viene dado por la siguiente fórmula:

$$HU = 1000 \cdot \frac{\mu_t - \mu_{agua}}{\mu_{agua}}$$

Donde μ_{agua} es el coeficiente de atenuación lineal del agua destilada y μ_t el coeficiente de atenuación lineal del tejido o material de interés. Adicionalmente, se pueden usar unidades RAW ('crudas'). (Albiol Tortosa, 2019)

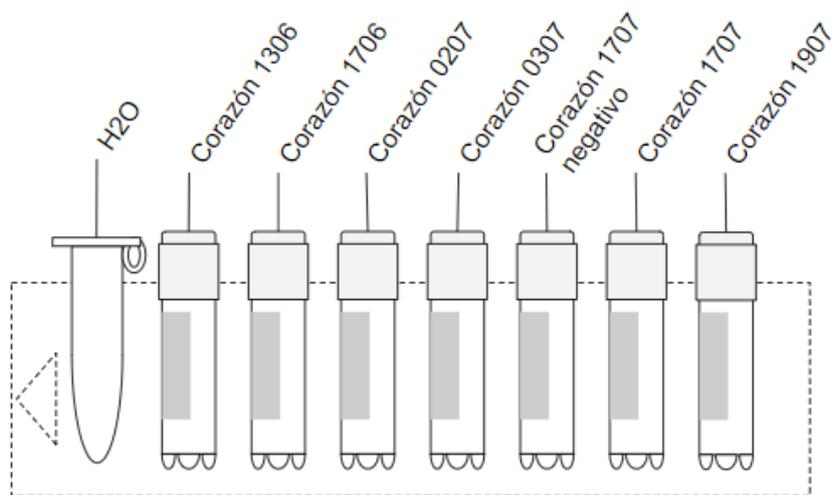


79. NanoSPECT/CT para muestras biológicas de experimentación animal.

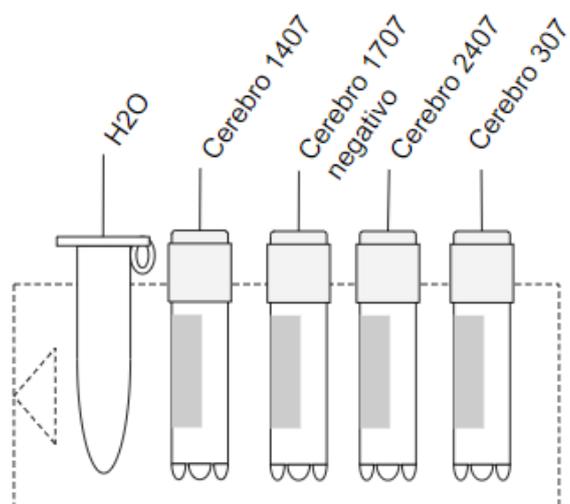
Los racks se separaron por concepto. El Rack 1 contiene los viales con diluciones de DMSO en PBS en concentración ascendente, junto con la muestra de agua mili Q necesaria como fondo de escala en cada medida. Este Rack 1 sirvió como calibración de los valores de DMSO, a modo de establecer una comparativa con los valores que se obtendrían de los tejidos. Los Racks 2, 3 y 4 contienen las muestras tisulares organizadas (Rack 2: corazones día 31, Rack 3: tejido nervioso central día 31, Rack 4: mixto de tejidos, día 7). La disposición fue la siguiente.



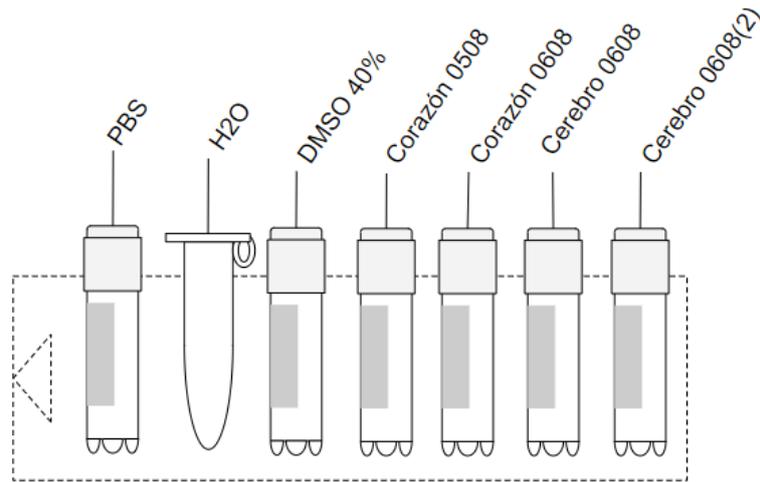
80. Rack calibración DMSO en PBS.



81. Rack corazones día 31.



82. Rack tejido nervioso central día 31.

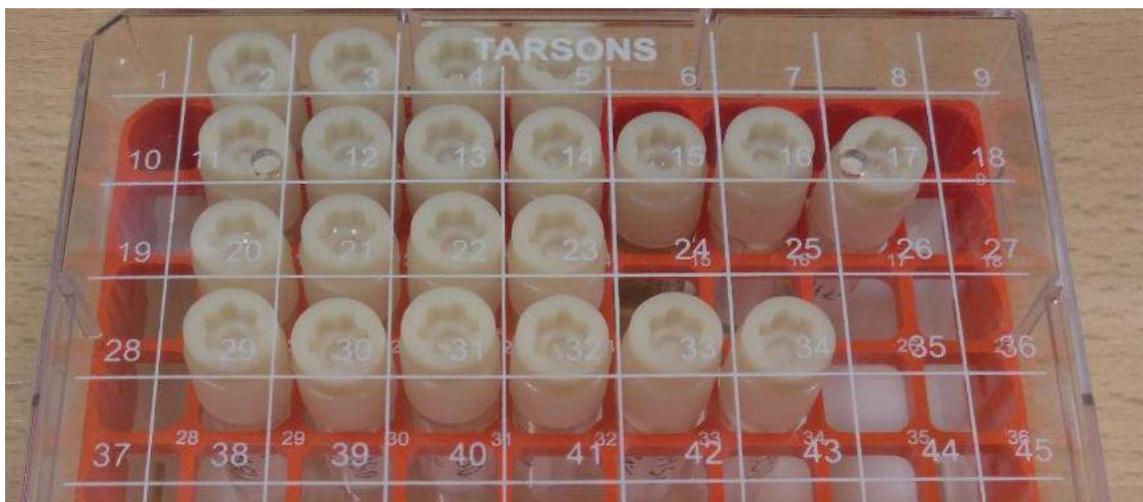


83. Rack 4: mixto de tejidos, día 7.

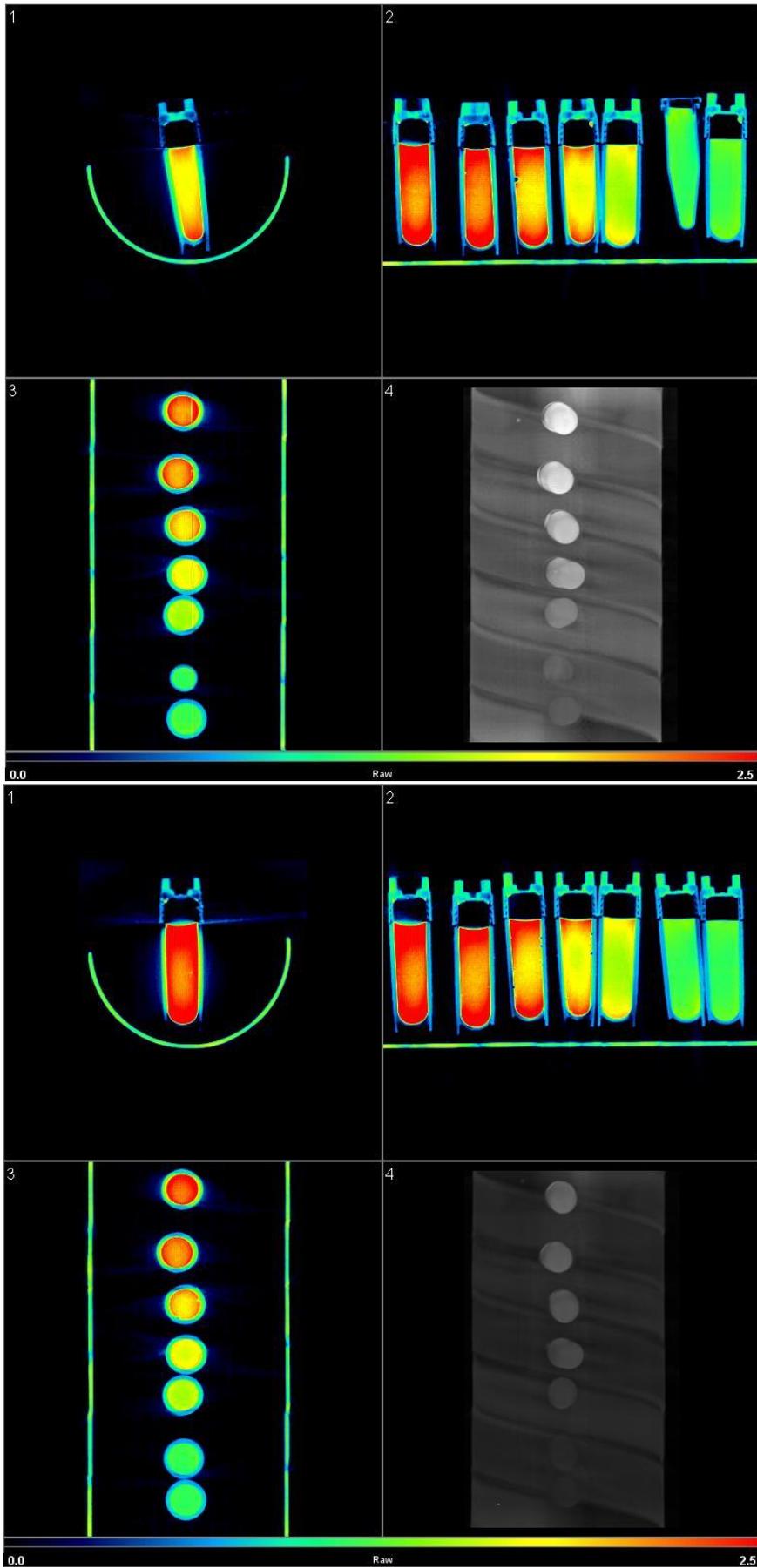
3.2.1.2 CALIBRACIÓN DEL CT

Se hizo un TAC del Rack 1 con el fin de obtener los valores RAW y HU de las disoluciones de DMSO a diferentes concentraciones. Esto sirve para establecer una recta, cuya ecuación dictará la concentración de DMSO de los tejidos que se analicen posteriormente basado en los valores RAW y HU obtenidos en el TAC. Al haber habido dos sesiones de análisis, existen más de una recta de calibración. En la práctica, existen rectas de calibración tanto en HU como en RAW, mostrando la relación de ambos valores con el DMSO. Se apreciará que las rectas de calibración de los días 31/07 y 07/08 son diferentes; esto es comprensible dentro del rango de variabilidad de resultados de la propia máquina.

Con una resolución de 200 micras, se pudieron obtener las siguientes imágenes de los crioviales. Se aprecia el dominio del rojo en altas concentraciones, indicando la presencia de DMSO.



84. Muestras recalentadas y organizadas por racks.



85. Imágenes calibración. Arriba: día 31/07. Abajo: día 07/08.

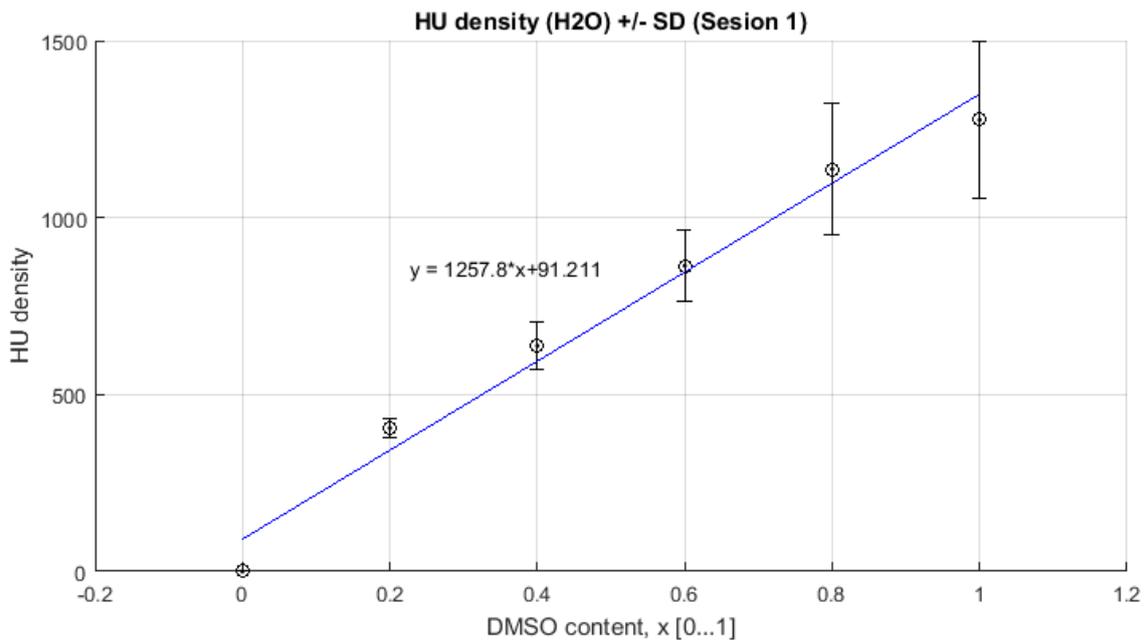
Tabla 26. Valores HU y RAW para rack de calibración (Sesión 1)

DMSO concentration	RAW density	SDraw	HU density	% DMSO
PBS	1,218568	0,036728	65,61682	0
H2O	1,143533	0,040348	0	0
DMSO 20%	1,606948	0,063962	405,2485	24.9703
DMSO 40%	1,872771	0,104132	637,7061	43.4521
DMSO 60%	2,131525	0,11784	863,9821	61.4423
DMSO 80%	2,443992	0,163853	1137,229	83.1671
DMSO 100%	2,603202	0,173903	1276,456	94.2364

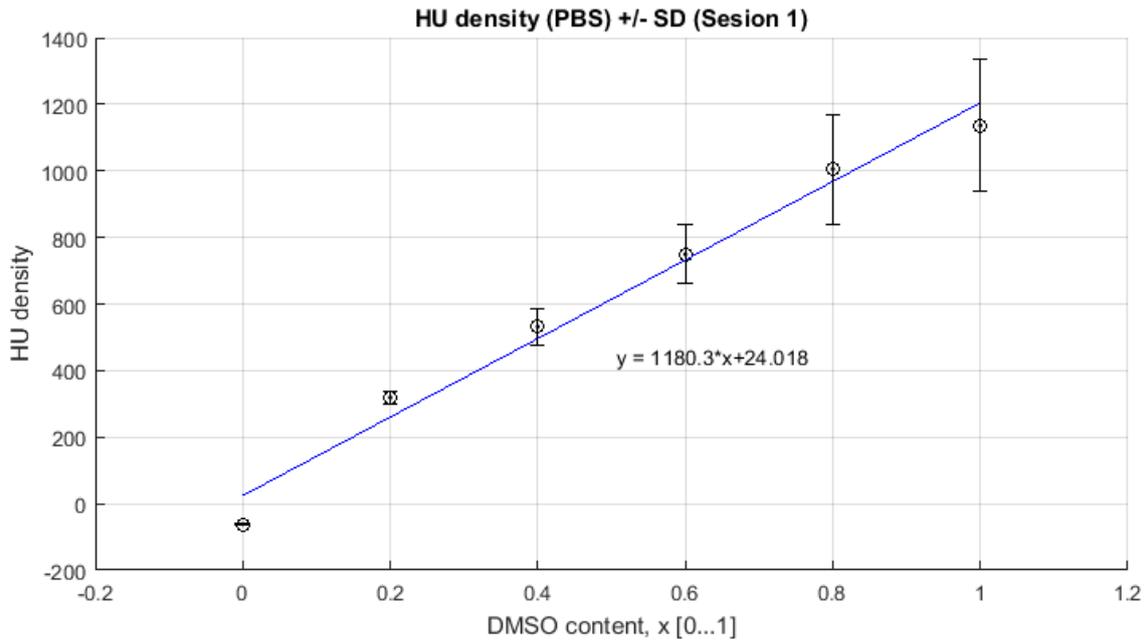
Tabla 27. Valores HU y RAW para rack de calibración (Sesión 2)

DMSO concentration	RAW density	SDraw	HU density	% DMSO
PBS	1,17307	0,036728	0	0
H2O	1,180366	0,040348	0	0
DMSO 20%	1,488634	0,063962	261.1631	23.7909
DMSO 40%	1,655527	0,104132	402.5540	39.0719
DMSO 60%	1.923083	0,11784	629.2260	63.5698
DMSO 80%	2,131571	0,163853	805.8560	82.6593
DMSO 100%	2,270117	0,173903	923.2314	95.3448

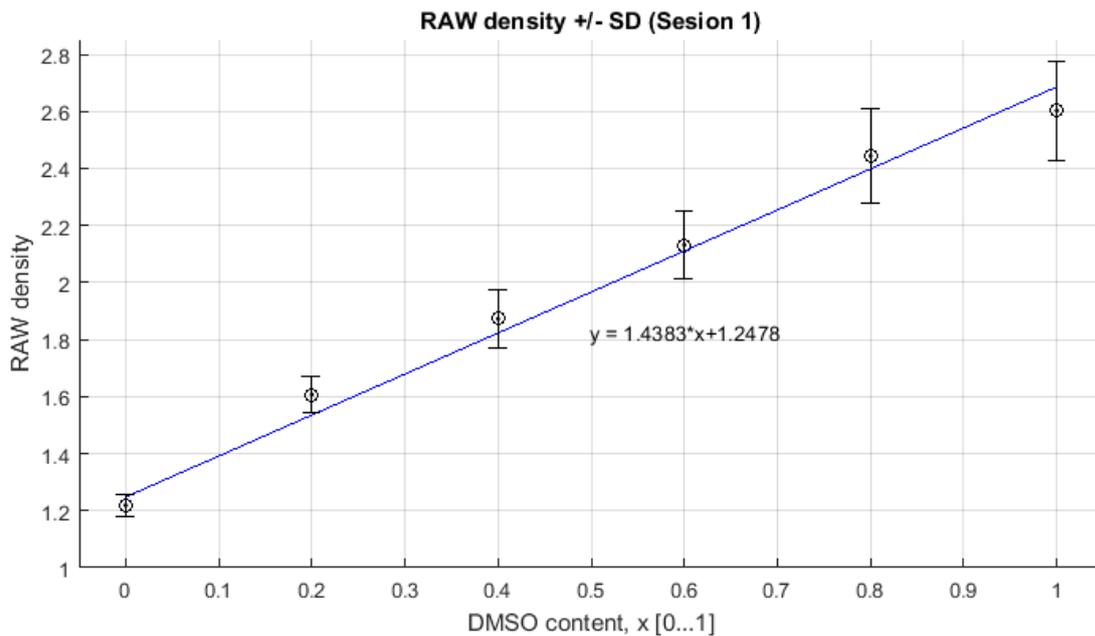
De la primera sesión, se obtienen las rectas de calibración:



86. Calibración HU con fondo de escala en H2O mili Q, día 31/07



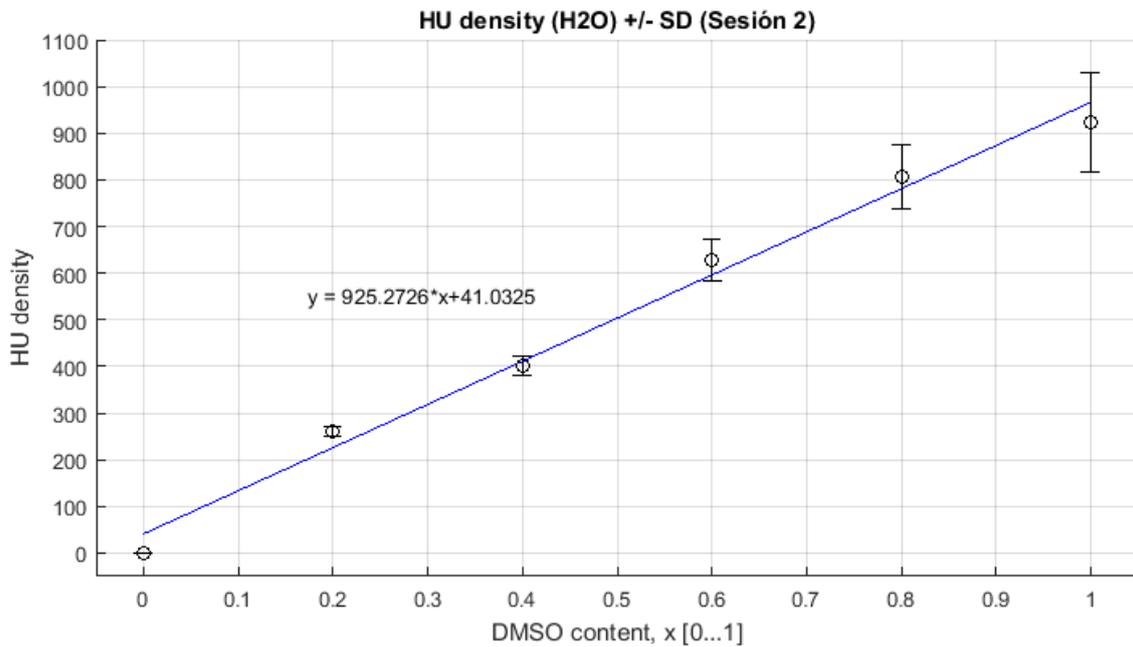
87. Calibración HU con fondo de escala en PBS, día 31/07



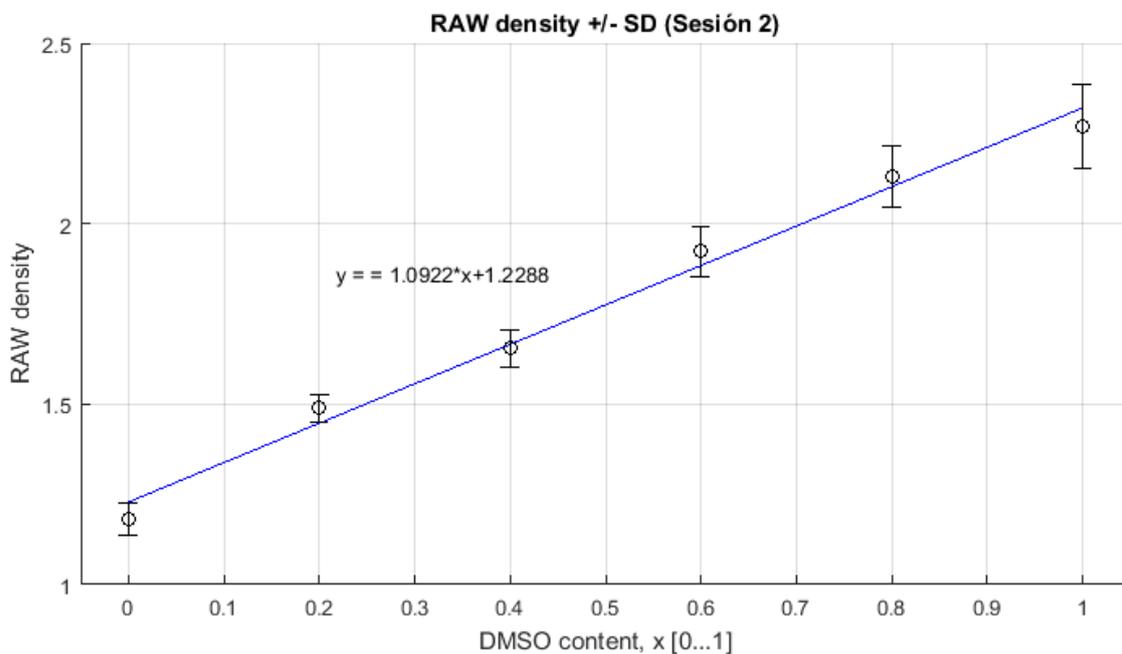
88. Calibración RAW con fondo de escala en H2O mili Q, día 31/07

Dado que HU requiere una conversión que añade error a las medidas, se usará la calibración RAW para calcular el valor DMSO con menor margen de error. Es recomendable usar como fondo de escala el PBS, aunque en caso de que los valores RAW del PBS y el H2O sean cercanos se recomienda usar el H2O.

De la segunda sesión se obtienen las calibraciones:



89. Calibración HU con fondo de escala en H2O mili Q, día 07/08



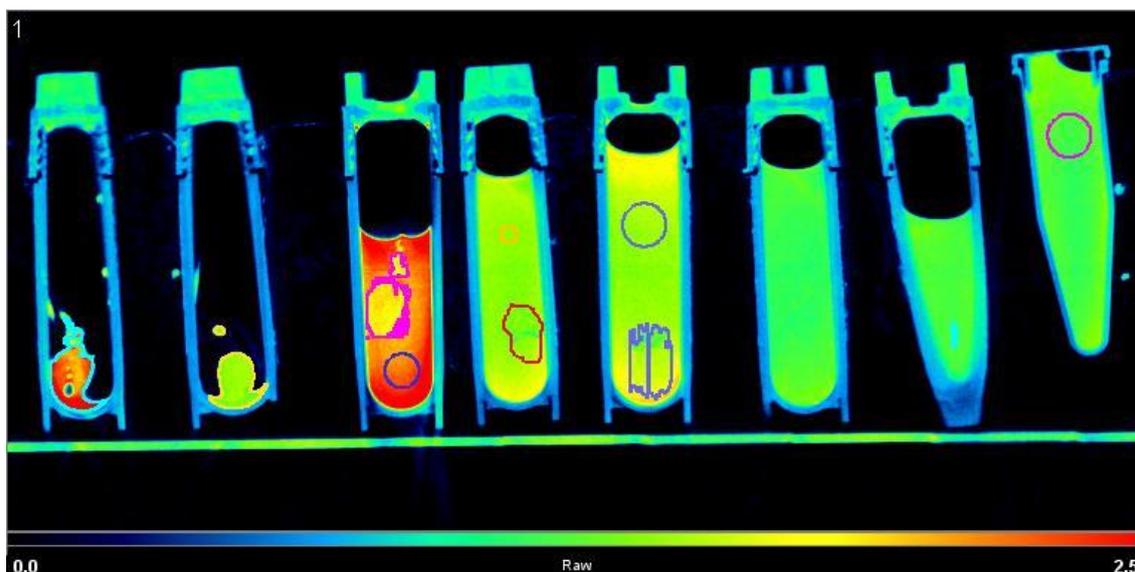
90. Calibración RAW con fondo de escala en H2O mili Q, día 07/08.

Se observa que las calibraciones dan un resultado de las diluciones en porcentaje de DMSO con un error no superior al 6% en DMSO.

3.2.1.3 Imágenes de los análisis

De los corazones, se obtuvieron los siguientes valores gráficos (posteriormente se hará un cálculo del DMSO). Se ofrecen las imágenes directas del TAC de ambas sesiones junto con un histograma de valores RAW

Rack 2, 31/07: corazones



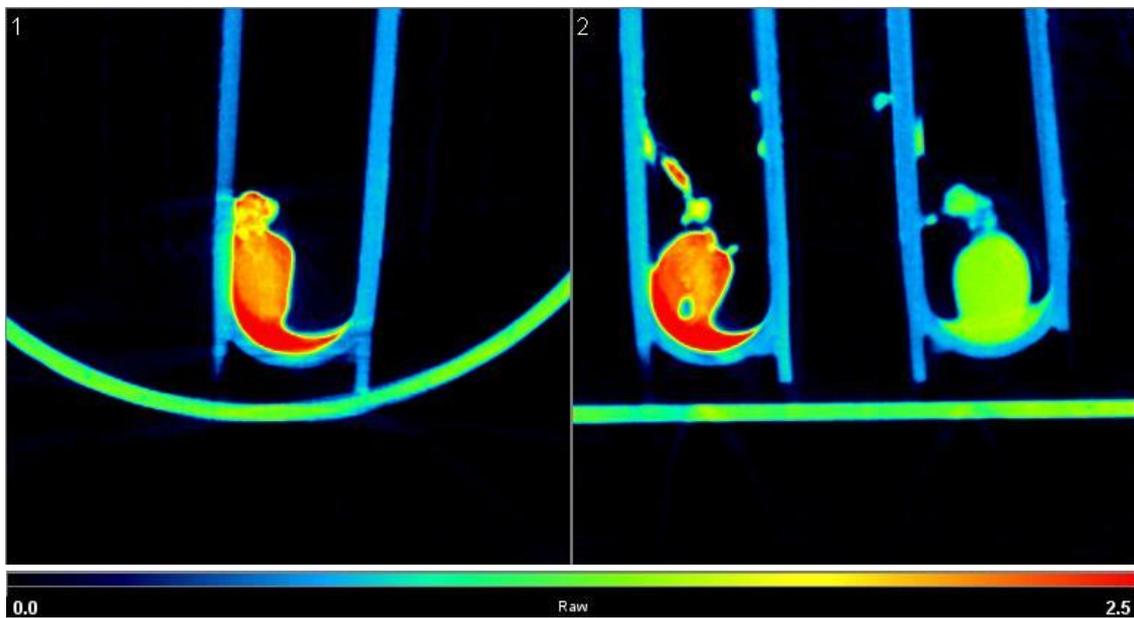
91. Secuencia completa Rack 2: corazones 31/07.

La secuencia muestra los valores RAW como valores de color. Para calcular la cantidad de DMSO en el tejido, era necesario delimitar un VOI, o *volume of interest*, que nos permita calcular la media del valor RAW de dicho volumen y así obtener el promedio de DMSO en el tejido completo. Es importante notar que este valor es una meda, por lo que el VOI ha de ser preciso, y además los valores puntuales de DMSO por región se apreciarán en exclusiva en la imagen como diferentes coloraciones. Siguiendo una equivalencia con la calibración, el valor en RAW de 1.16 se corresponde con el H₂O mili Q (verde en la escala) y un 100% de DMSO es del orden de 2.4 en RAW (rojo en la escala).

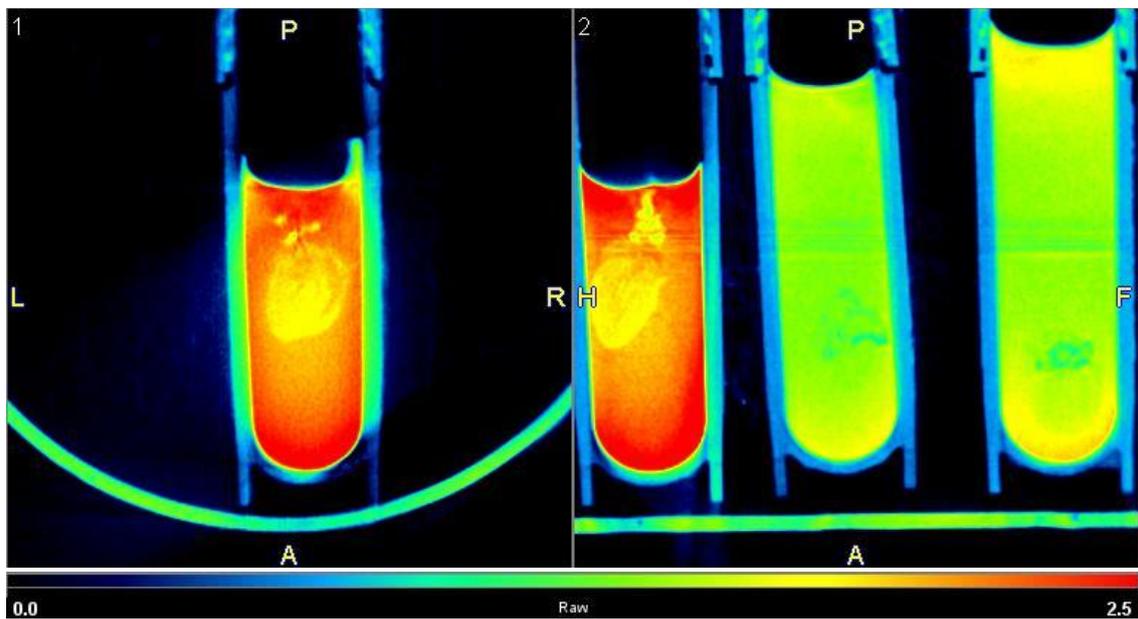
Siguiendo el orden establecido en el Rack, de derecha a izquierda se observan: H₂O mili Q, corazón día 13/06 perfundido sin ACP, sólo exanguinado, corazón día 17/06 perfundido sin ACP, sólo lavado, corazón día 02/07 perfundido con ACP, corazón 03/07 perfundido con ACP, corazón 17/07 perfundido con ACP, corazón 17/07 control no perfundido ni exanguinado y corazón 19/07 perfundido con ACP.

Los corazones perfundidos sin ACP y sólo exanguinados apenas se distinguen del resto del medio, al ser homogéneamente perfundido con PBS y estar sumergido en ese medio. Los corazones perfundidos con ACP muestran variabilidad de retención, siendo el del día 17/07 el que presenta un valor más alto RAW tanto dentro como fuera (se rellenó el eppendorf con DMSO al 70% al terminar el experimento). Los corazones almacenados en nitrógeno líquido son más fáciles de valorar. El control como cabe esperar no posee ACP. El del día 19/07 presenta un alto contenido de DMSO

retenido en los tejidos. Es también este corazón el que latió con vigor y continuidad y del que se dispone un ECG.



92. Detalle de las muestras almacenadas a -196°C .

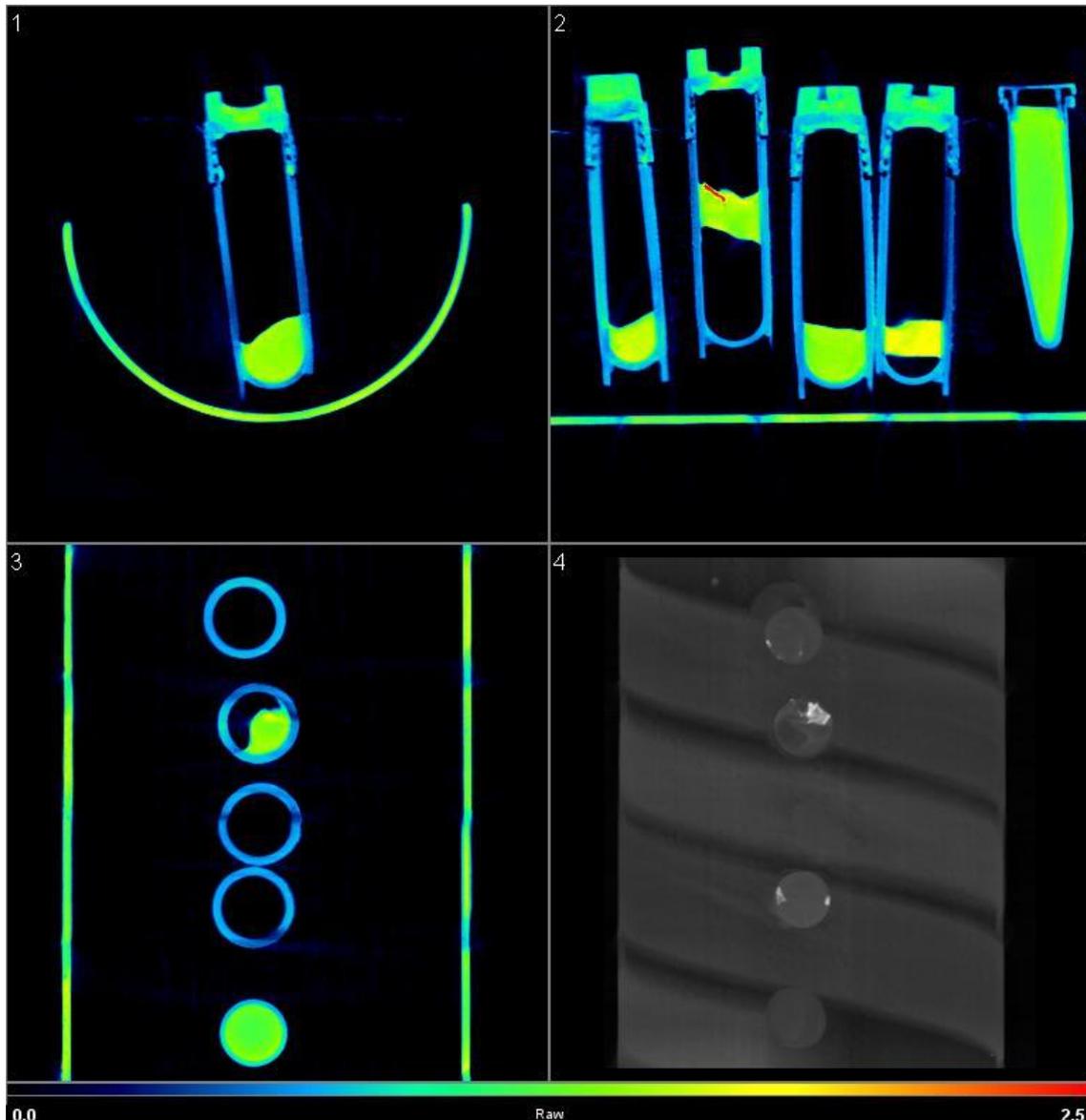


93. Detalle de los corazones en medio DMSO+PBS.

En esta figura se aprecia una mayor concentración de DMSO en el exterior que en el interior. Se midió la cantidad de DMSO dentro del criovial al término de la perfusión, y se estimó el DMSO retenido en el tejido en función de lo que debería ser. Se aprecian regiones dentro del corazón con tonalidad más oscura, donde el DMSO había comenzado a penetrar, pero el tiempo fue insuficiente. Esto fue una fuente de error que llevó a añadir DMSO a demasiada concentración en el exterior. También es importante destacar que estos corazones se analizaron después de un recalentamiento,

por lo que parte del DMSO fue exudado por el tejido al medio exterior, como se puede observar en el corazón izquierdo de la figura de corazones almacenados a -196°C .

Rack 3, 31/07: tejido nervioso central.

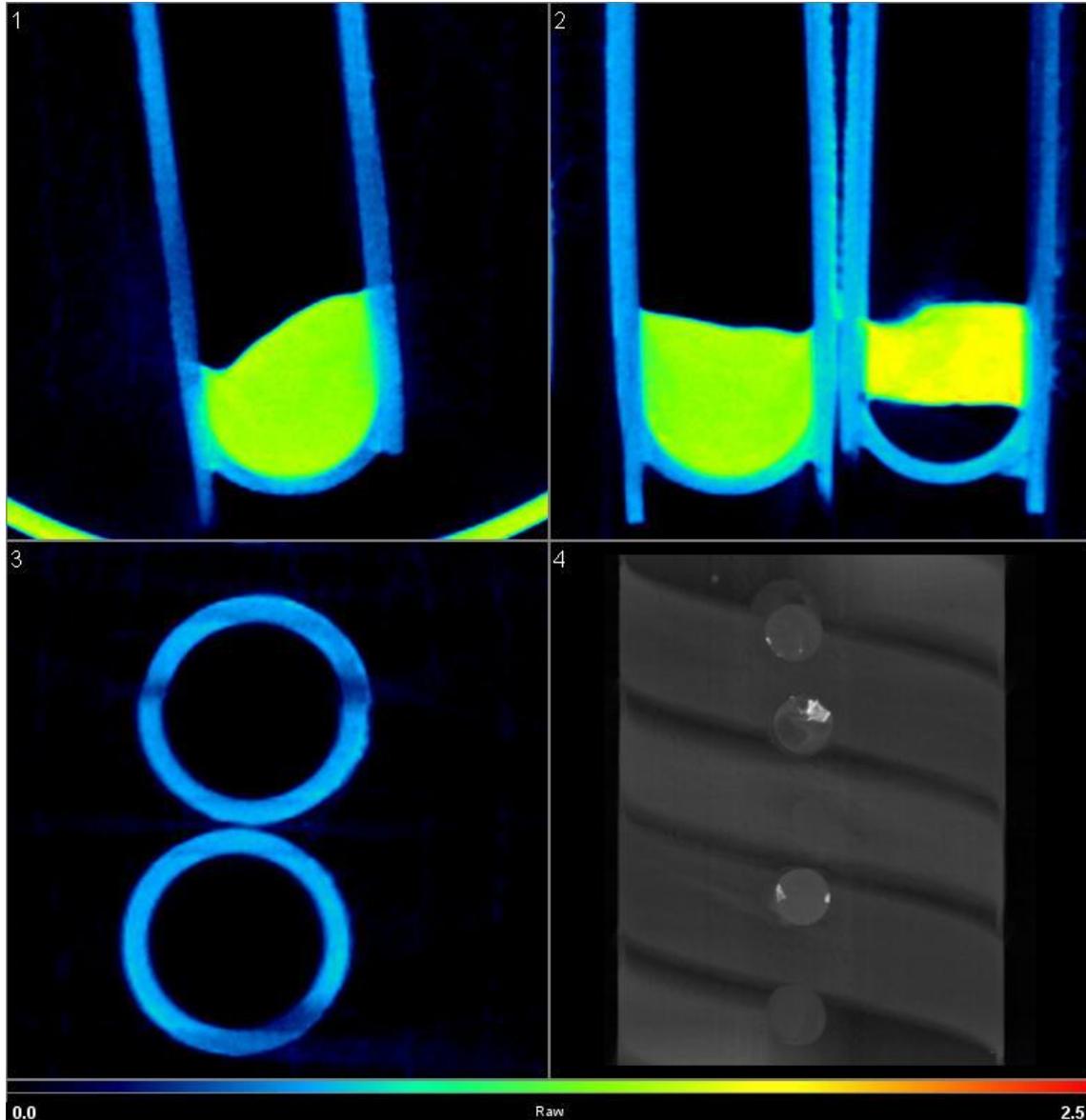


94. Secuencia completa Rack 3: 31/07.

La perfusión de tejido nervioso central presenta una problemática que ya se comentó en lo referente a la barrera hematoencefálica y la capacidad penetrante del crioprotector. La permeabilidad del DMSO, pese a ser alta y más alta que la del glicerol, usado en experimentos anteriores de criopreservación de este órgano, podía no ser suficiente para el tejido en cuestión.

Se observa este fenómeno en el bajo porcentaje de DMSO retenido en el tejido. La muestra del día 14/07 es la que presenta un mayor porcentaje global de DMSO retenido (segunda por la

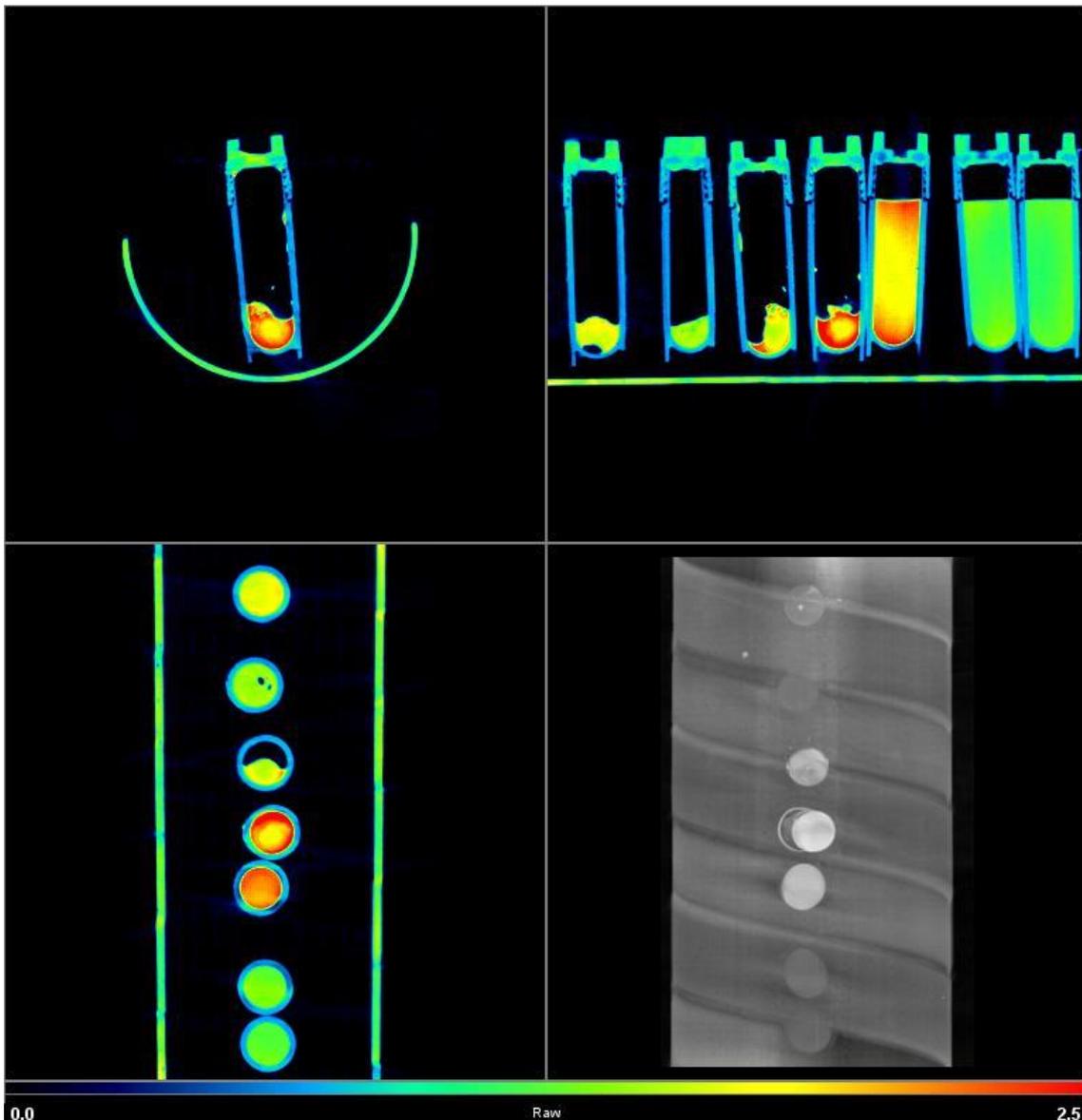
derecha), mientras que las muestras 4 y 5 por la derecha presentan un porcentaje mucho menor. Se observa también que en la cuarta muestra hay una región en la zona superior del córtex, aquella donde entra en contacto con la arteria basilar, es la que presenta un mayor porcentaje de DMSO retenido, apareciendo este en muy alta concentración en dicha zona.



95. Detalle de tejido nervioso central: control (izq.) y día 24/06 (dch.).

El control no se encuentra correctamente exanguinado, pues se realizó la cirugía craneal justo tras el sacrificio del animal, sin dar lugar al pinchado ventricular y a la perfusión con solución Tyrode's para lavar la sangre. Fue inmediatamente almacenado, y la sangre se congeló en los capilares. Tras el recalentamiento, la sangre fluyó hacia fuera de los vasos y se retuvo dentro del criovial. Es por ello por lo que aparece como una masa amorfa en el fondo de éste. El órgano de la derecha aparece volteado en la imagen, correspondiendo la zona cortical con el borde derecho e inferior del órgano. Se aprecia un segmento de menor concentración de DMSO en lo que según la orientación correspondería al tálamo.

Rack 4, 07/08: mixto tejido nervioso central y corazón



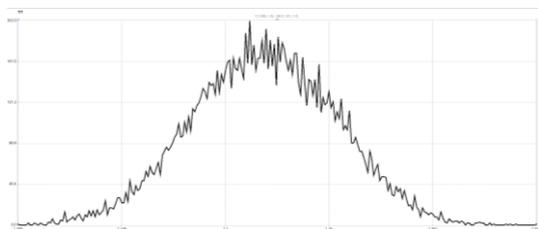
96. Secuencia completa Rack 4: mixto de tejidos.

De derecha a izquierda: vial con PBS, vial con H₂O mili Q, vial con DMSO al 40% en PBS, corazón 05/08 perfundido con ACP, corazón 06/08 perfundido con ACP, tejido nervioso 06/08 (1) perfundido con ACP y tejido nervioso 06/08 (2) perfundido con ACP. De nuevo se aprecian tonos más rojizos en las muestras de corazón que en tejido nervioso central. En el caso de los corazones el recalentamiento supone en una exudación de parte del DMSO retenido en los tejidos.

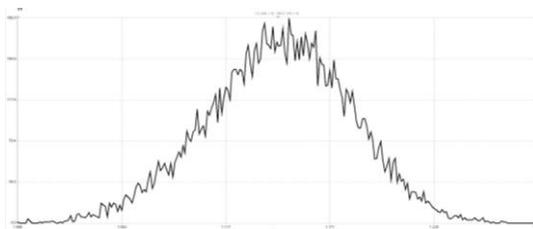
A continuación, se muestran los histogramas de valores RAW volumétricos según la delimitación del VOI. Se aprecia que las muestras más homogéneas presentan una curva en forma de campana de Gauss, mientras que aquellas con picos de DMSO o zonas con ausencia de éste presentan un sesgo estadístico considerable.

Histogramas ordenados: calibraciones 31/07 y 07/08, corazones Rack 2, tejido nervioso central Rack 3 y mixto de tejidos Rack 4. Se ofrece la media de los valores RAW junto con el histograma.

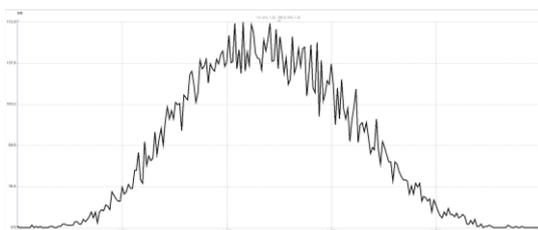
PBS 31/07, centrado en 1.22



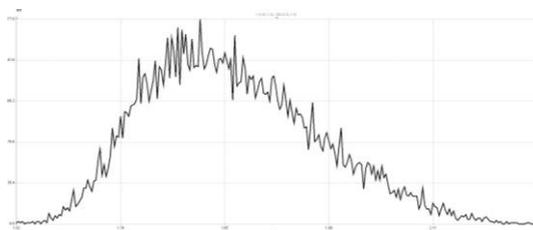
H2O mili Q 31/07, centrado en 1.14



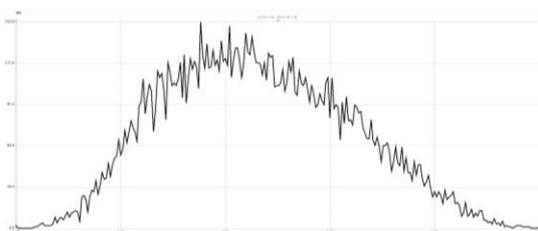
DMSO 20% 31/07, centrado en 1.60



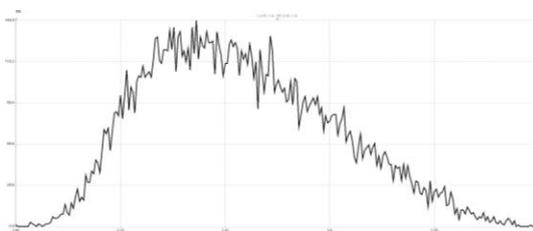
DMSO 40% 31/07, centrado en 1.81, sesgo



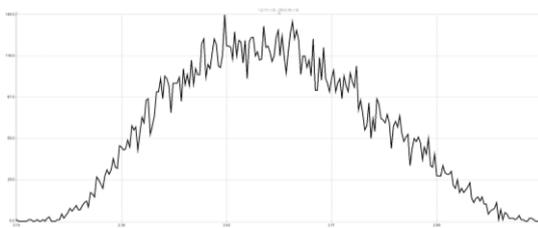
DMSO 60% 31/07, centrado en 2.05, sesgo



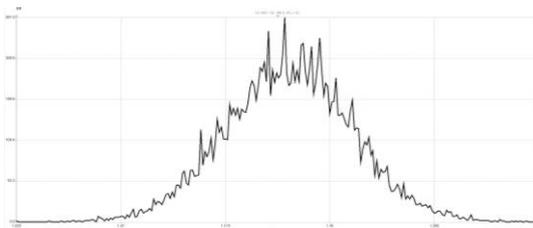
DMSO 80% 31/07, centrado en 2.36, sesgo



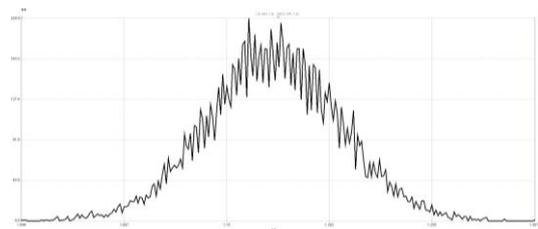
DMSO 99.7% 31/07, centrado en 2.62



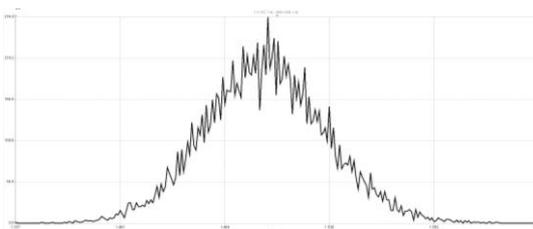
H2O mili Q 07/08, centrada en 1.18



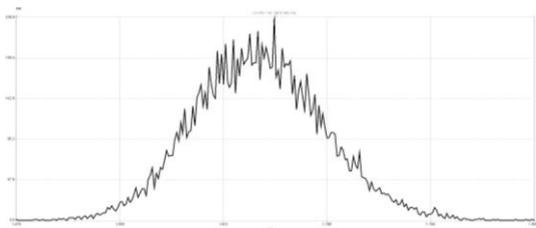
PBS 07/08, centrado en 1.17



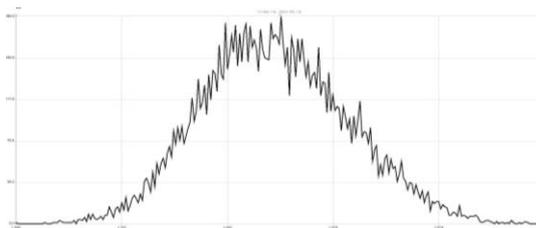
DMSO 20% 07/08, centrado en 1.48



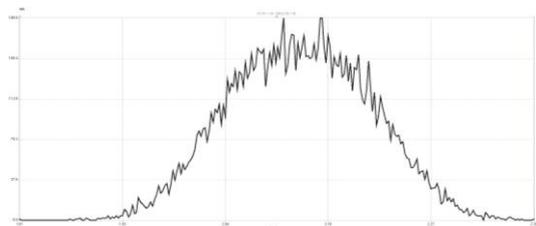
DMSO 40% 07/08, centrado en 1.65



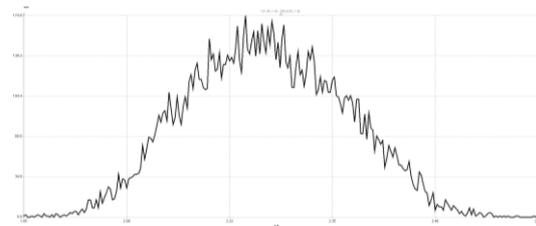
DMSO 60% 07/08, centrado en 1.92



DMSO 80% 07/08, centrado en 2.12

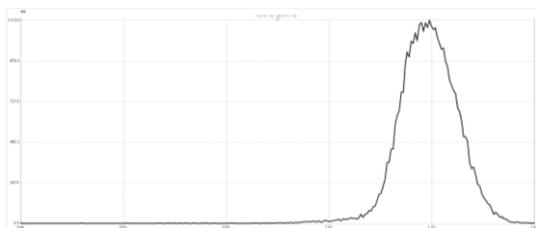


DMSO 100% 07/08, centrado en 2.30

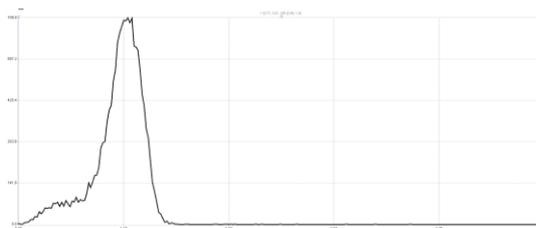


Rack 2: corazones

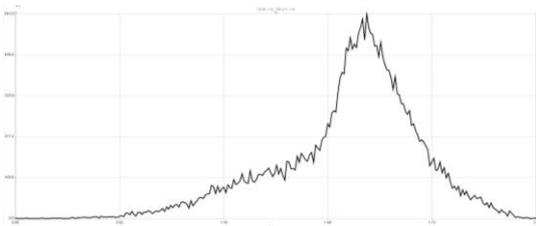
Corazón 14/06, pico en 1.21



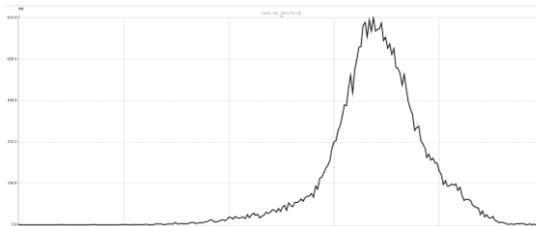
Corazón 17/06, pico en 1.20



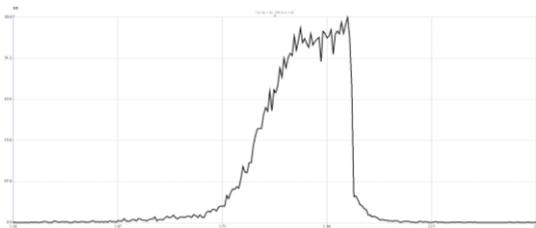
Corazón 02/07, pico en 1.60



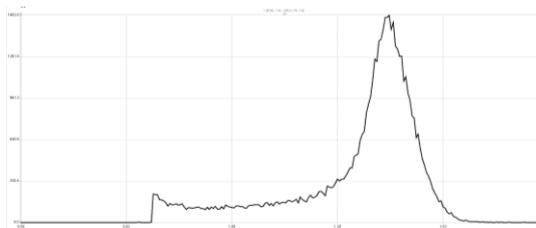
Corazón 03/07, pico en 1.40



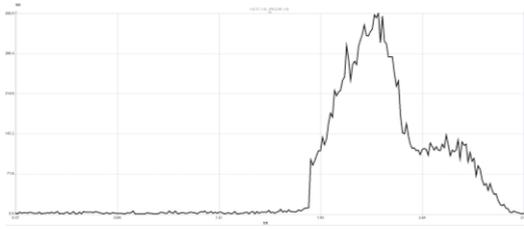
Corazón 17/07 (1), centrado en 1.88, sesgo



Corazón 17/07 (2), centrado en 1.42, sesgo

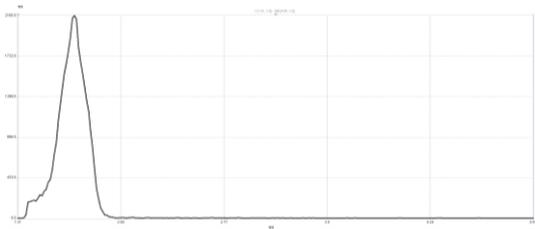


Corazón 19/07, centrado en 2.36, sesgo

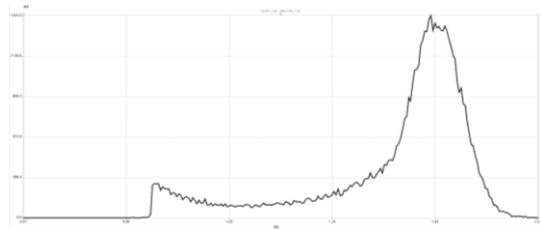


Rack 3: tejido nervioso central

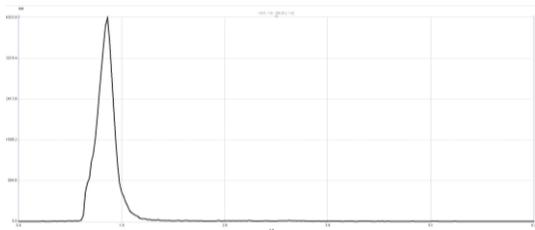
T. Nerv. 14/07, centrado en 1.73



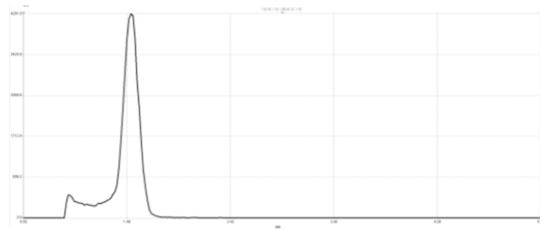
T. Nerv. 17/07, centrado en 1.44



T. Nerv. 24/07, centrado en 1.50

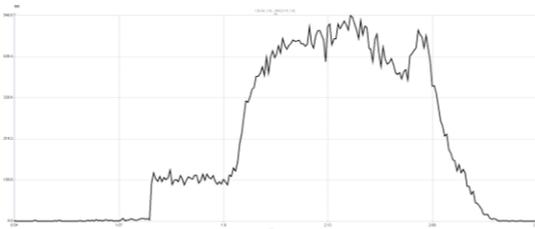


T. Nerv. 30/07, centrado en 1.53

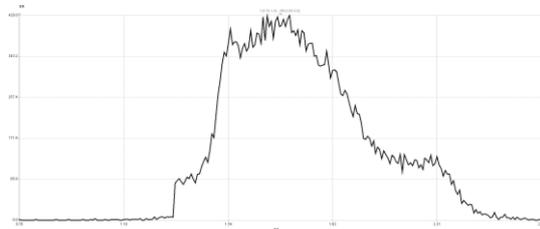


Rack 4: mixto de tejidos

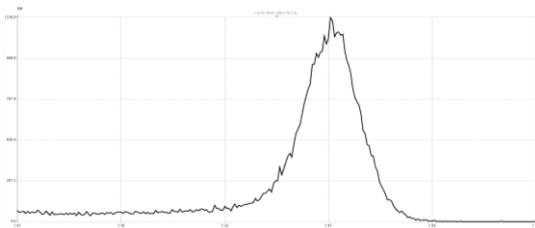
Corazón 05/08, centrado en (desconocido)



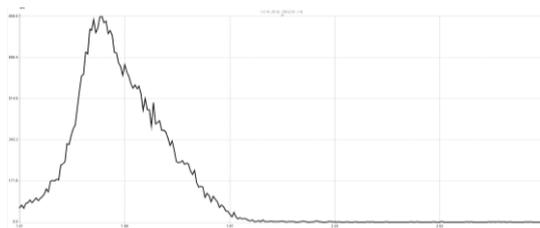
Corazón 06/08, centrado en



T. Nerv. 06/08 (1), centrado en 1.48



T. Nerv. 06/08 (2), centrado en 1.60, sesgo

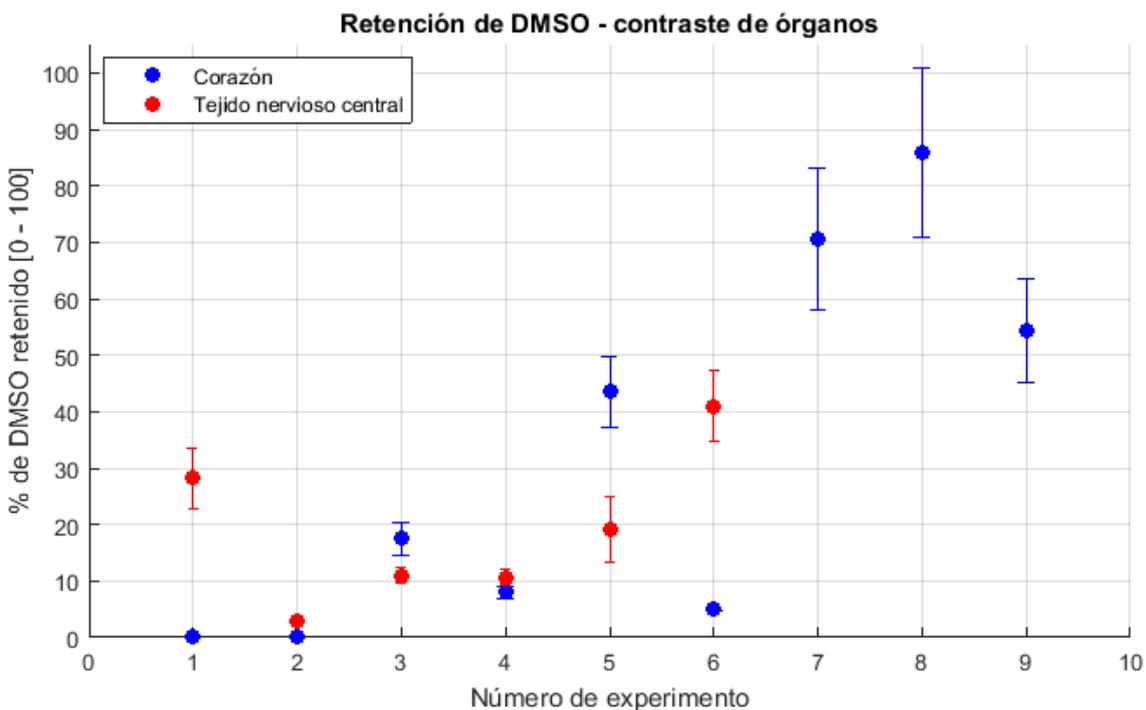


Se obtuvieron los siguientes valores de DMSO con las calibraciones, analizando los datos RAW:

Tabla 28. Cantidad de DMSO retenido. (100% supone una molaridad de 12, 0% de 0)

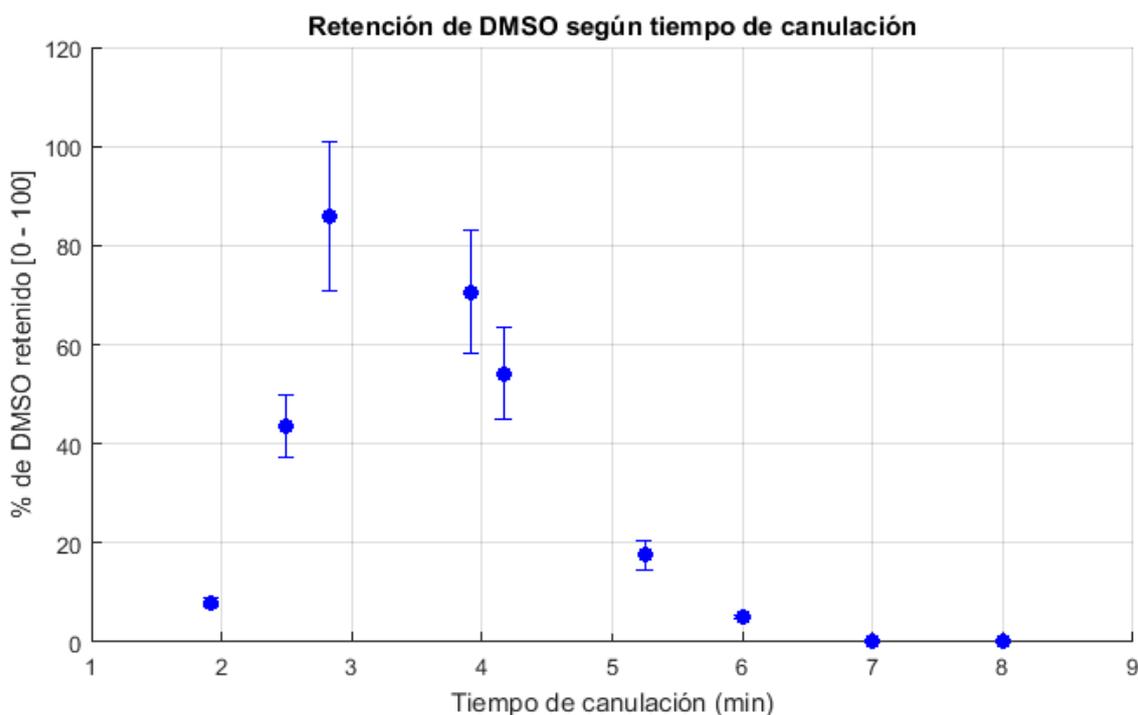
Sesión	Corazón			Tejido nervioso central		
	Vial	Fecha	% DMSO	Vial	Fecha	% DMSO
1	2	13/06	0	2	14/07	28.235 ± 5.3123
	3	17/06	0	3	17/07	2.866 ± 0.1833
	4	02/07	17.554 ± 2.9133	4	24/07	11.023 ± 1.3401
	5	03/07	8.006 ± 1.0003	5	30/07	10.659 ± 1.3033
	6	17/07	43.511 ± 6.2355			-
	7	17/07	5.036 ± 0.4255			-
	8	19/07	70.599 ± 12.5232			-
	2	4	05/08	85.862 ± 14.9128	6	06/08
5		06/08	54.212 ± 9.1847	7	06/08	41.008 ± 6.1622

Con estos datos de DMSO se puede establecer una relación con otras variables del experimento, para notar los aspectos más influyentes de cada ensayo con la cantidad de DMSO retenido.



97. Retención de DMSO en ambos órganos.

Lo primero que se observa es que la capacidad de absorción y retención de DMSO en tejido nervioso central es bastante menor que en corazón. La media de DMSO retenido en los experimentos de corazón que sí fueron perfundidos con ACP (viales 4 – 8 de la sesión 1, y viales 4 y 5 de la sesión 2) es de **40.68%** del total puro, mientras que en tejido nervioso central (todos los viales) cae a **18.82%** del total puro. Los mejores picos de retención se observan en corazones.



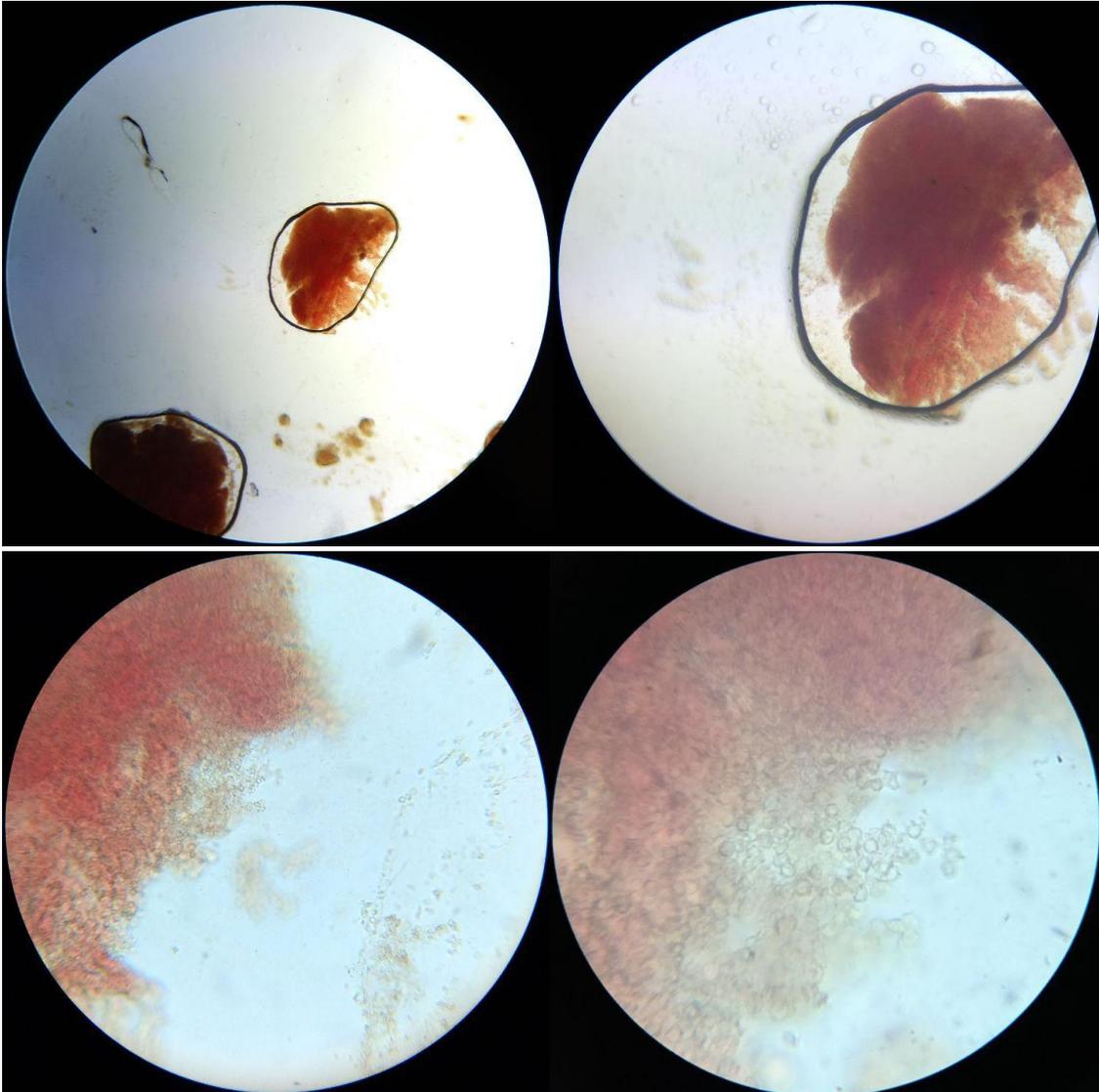
98. Retención de DMSO según tiempo de canulación en corazones.

Para corazones, se puede observar cómo afecta el tiempo de canulación a la retención de DMSO. Los valores más altos de DMSO se encuentran en tiempos de canulación bajos, aproximándose el porcentaje a cero conforme el tiempo de canulación aumenta. Esto se debe a la muerte tisular por isquemia, en función de cuánto tiempo está el corazón ausente de oxígeno. A mayor tiempo de canulación, mayor número de células que mueren y peor se hace la perfusión. La curva tampoco presenta su máximo en el menor tiempo de canulación. Esto se puede deber a que canulaciones muy rápidas podrían implicar errores que afecten a dónde se perfunde con crioprotector por las arterias coronarias.

En tejido nervioso central, es importante una buena exanguinación del cuerpo completo del animal. La adición de heparina ayuda a evitar coágulos de sangre en los capilares, pero no impide que a la larga y durante el experimento a bajas temperaturas esos coágulos aparezcan y entorpezcan la llegada del DMSO a las zonas de interés. Los ensayos 1 y 6 de tejido nervioso central sí supusieron una exanguinación total garantizada del cuerpo del ratón, pues en la cirugía craneal no se apreciaban trazas hemáticas en el tejido próximo a las cervicales y la nuca. En los ensayos 2 – 5 de este experimento sí se observaron algunos restos de sangre en proceso de cristalización, indicando una mala heparinización y exanguinación.

3.3.2 Inspección tisular

Como detalle adicional, se ofrecen imágenes de microscopía óptica de una porción tisular expulsada por uno de los corazones tras la perfusión. Al no haber cristalizado esta muestra, se hizo una inspección con microscopio de aumento entre x4 y x100, previo aumento x16 en el óptico.



99. x4 (arriba izq.), x10 (arriba dch.), x40 (abajo izq.), x100 (abajo dch.)

La observación, con el tejido aún frío, no arrojaba indicios de cristales a ninguna de las escalas observadas. Se comprobó que el tejido estaba inmerso en una gota del perfusato a la misma concentración que el resto del perfusato en el vial.

4 CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

La componente fisiológica y biológica de este proyecto es de gran peso, requiriéndose unos conocimientos en la materia que por motivos obvios no son impartidos en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería. Se requirió del estudio y el consejo para comprender los aspectos menos propios de la ingeniería. En la práctica, la adquisición de destreza en la parte quirúrgica de los experimentos se tradujo en la compleción satisfactoria de varios ensayos. Se comentarán algunos aspectos sobre esto.

La correcta identificación anatómica, por simple que pudiera parecer, es muy importante para la fase de cirugía. El escaso tiempo de supervivencia del que se dispone no da margen a dudas, y la identificación de los órganos del animal, sus partes y el trato con los tejidos ha de ser rápido y automático. Una correcta identificación conlleva mayor índice de éxito en la canulación, sin duda la fase más crítica del Experimento 1: perfusión Langendorff. El tiempo de canulación se redujo notablemente hasta valores por debajo de los 3 minutos en frío, reduciendo la posibilidad de isquemia.

La heparina es una sustancia que facilita enormemente tanto la fase de cirugía como la fase de criopreservación, al evitar la coagulación de sangre y eliminar posibles trombos que pudieran aparecer desde el sacrificio hasta la perfusión con crioprotector. Coágulos en el circuito coronario significa que no se podrá hacer una difusión satisfactoria del ACP, especialmente en tejido nervioso central, además de dificultar enormemente el latido del corazón.

En lo referente a los sistemas, los equipos hidráulicos presentaron fugas en la parte que entraba en contacto con el DMSO dada su acción de ataque a tubos y juntas. Esto se pudo solucionar con la sustitución del material por uno más resistente a este ataque.

El diseño del circuito, así como la caracterización de las bombas y los parámetros fluidicos del circuito (presión, caudal, velocidad del fluido en dos puntos) fue una tarea tan necesaria como interesante. La necesidad de trabajar dentro de un rango de presiones y caudales (la presión arterial y el flujo coronario en el caso del corazón) como condiciones de contorno fue determinante a la hora de escoger la bomba y los puntos de operación. Así, se pudo perfundir en el Experimento 1 con éxito (perfusión a 100 mmHg, caudal de 2.1 mL/min), lo que llevaría a un mayor índice de éxito en el Experimento 2: equilibrium vitrification de corazón.

Los sistemas térmicos son para los experimentos 2 y 3 la otra parte crucial de los ensayos. Al requerirse de unos valores de concentración (proporcionados por el programa de Álvaro Pérez) y de temperatura específicos en cada instante del tiempo, el control y monitorización de esta variable fue algo fundamental. No sin dificultades, se consiguió que el BioCool realizara un seguimiento de temperatura a rampas y mesetas con un error en una horquilla del 10% en tiempo. La reducción de este error tiene fuerte dependencia de la bondad del estado del equipo. Se hicieron las reparaciones y arreglos pertinentes para conseguir un funcionamiento aceptable.

El sistema electrónico para electrocardiografía es un apoyo interesante para estimar la bondad del Experimento 1. Con datos precisos de la frecuencia cardíaca, combinados con la observación, se puede valorar el estado del corazón antes de producirse la criopreservación. Un corazón más activo aprovecha la perfusión Langendorff, queda completamente exanguinado y sus células son “alimentadas” por medio del perfusato Tyrodes hasta el inicio de la criopreservación.

Respecto a la retención de DMSO, la elección de este ACP facilita que se pueda hacer por tomografía computarizada. Se comprobó que la retención de DMSO es más favorable en corazones con alta actividad durante la perfusión Langendorff y con un tiempo de canulación bajo, siendo el mayor índice de retención de DMSO de un 80% en pureza con un error del 15%. Para el caso de tejido nervioso central, la barrera hematoencefálica fue la mayor traba para el experimento. Se comprueba que el DMSO es capaz de penetrar algunas zonas del cortex superior pero no es difundido más allá.

Una vez concluidos los experimentos se proponen una serie de mejoras para facilitar tanto su reproducción como mejorar el índice de éxito, así como explorar nuevas vías de análisis.

En primer lugar, en lo referente al sistema de perfusión de Álvaro Pérez, se propone pasar la lógica del sistema a un equipo con un SO más potente que Windows XP (Ortiz Serrano, 2019). LabVIEW es un programa potente y la DAQ board usada tiene grandes capacidades de muestreo, pero el propio equipo resultó dar numerosos problemas (reinicios inesperados en pleno ensayo, pérdida de datos, dificultad para abrir documentos).

En segundo lugar se propone una forma alternativa de alimentar las bombas peristálticas. Estas bombas pueden trabajar a 10 V y presentan unas rpm interesantes en este voltaje. Con el voltaje, se puede aumentar el caudal perfundido, que en corazón puede ser de hasta 2 mL/min. En la práctica se trabajaba a 0.40 ml/min. En lugar de alimentar las bombas directamente con las salidas analógicas de la tarjeta de adquisición, se propone un circuito con transistor tipo MOS y resistencia de pull-down en Source (para el tipo N) o en Drain (para el tipo P). Este transistor estaría sería activado en puerta por la salida de la tarjeta de adquisición, actuando así como un interruptor para la corriente que va desde Vdc (10V) y pasando por el MOS hasta tierra. El motor puede ver una diferencia de potencial entre Vdc y el transistor, permitiéndole trabajar a tensiones mayores sin estar restringido a los 5V de la tarjeta de adquisición.

En tercer lugar, para eliminar la zona muerta de las bombas peristálticas, se propone que la solución de PBS contenga una pequeña concentración de DMSO, suficiente para que en el rango de tensión de 0 a 0.36V (zona muerta) se esté administrando algo de DMSO y no haya una ausencia de éste por un tiempo prolongado (en la práctica, 13') y evitar un escalón de concentración posterior.

Como trabajo futuro propuesto para continuar con este proyecto, se valora la capacidad de hacer un análisis de supervivencia mediante los valores de Na/K de las células. La medición de Sodio y Potasio en el citosol da una medida de si esta célula está viva y trabaja a contragradiante con el medio extracelular, o si por el contrario está muerta (Albiol, 2019). Esta técnica requiere de unos reactivos y un entorno de trabajo que abrirían las puertas a trabajar en el IBIS. Asimismo, una vez que la concentración de DMSO retenida alcanza unos valores constantes entorno al 70% en pureza, se postula realizar el rewarming o recalentamiento del órgano y probar su supervivencia (por el método anterior) y por electrocardiografía en el caso del corazón.

Es necesario hacer un estudio más exhaustivo del tejido nervioso central, a la búsqueda de un ACP con características más favorables para penetrar en el tejido (sustancia liposoluble y no hidrosoluble y con menor peso molecular). Hasta ese momento, no se espera obtener valores superiores al 30% en pureza para DMSO, lo que resulta en la muerte de la mayor parte de los tejidos. Para el análisis de viabilidad no invasivo (considerando Na/K como lo más invasivo pues requiere del cortado de rodajas del tejido para su análisis) se propone la construcción de un circuito de electroencefalografía.

ANEXO A: ARTÍCULO DE G. M. FAHY

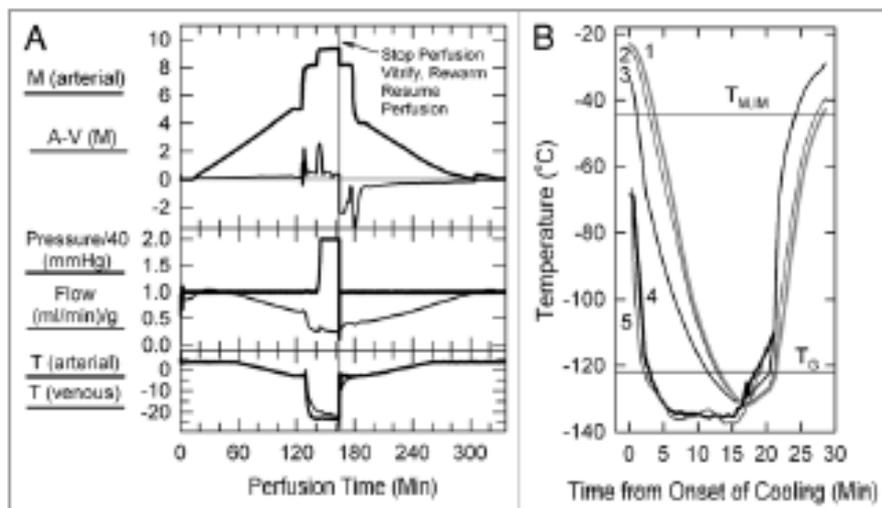


Figure 1. (A) Perfusion protocol for renal survival after vitrification and rewarming. M, molarity; A-V (M), arteriovenous difference in molarity; T, temperature in degrees Celsius. The protocol, as usual,^{4,5} employs an initial 5 M plateau, a second plateau at 8.4 M to allow cooling to -22°C without 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_{MIM} , 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.^{5,6,38,49-51} 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.^{5,6,6} 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_{MIM}) 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-

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-sought^{2,4} and important^{1,2,5-31} 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,^{7,8,32-35} 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,²³⁻²⁴ 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 methodology³³ used for rabbit kidney freezing), proposed a way of cooling organs to cryogenic temperatures without incurring the consequences of ice formation.³⁸⁻³⁹ 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.^{41,42} To date, small ovaries,⁴³⁻⁴⁵ 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

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.

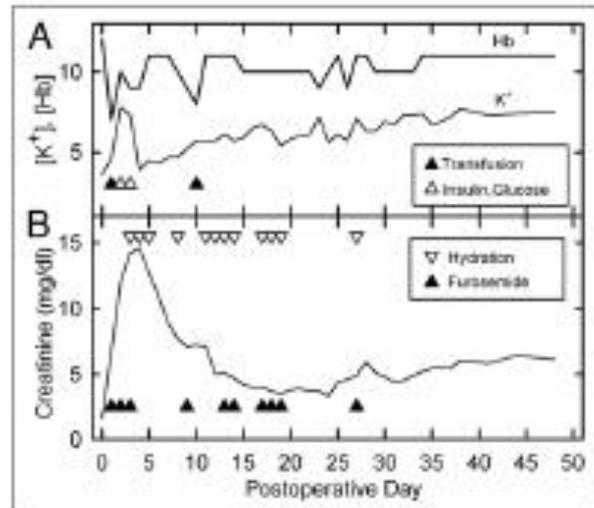
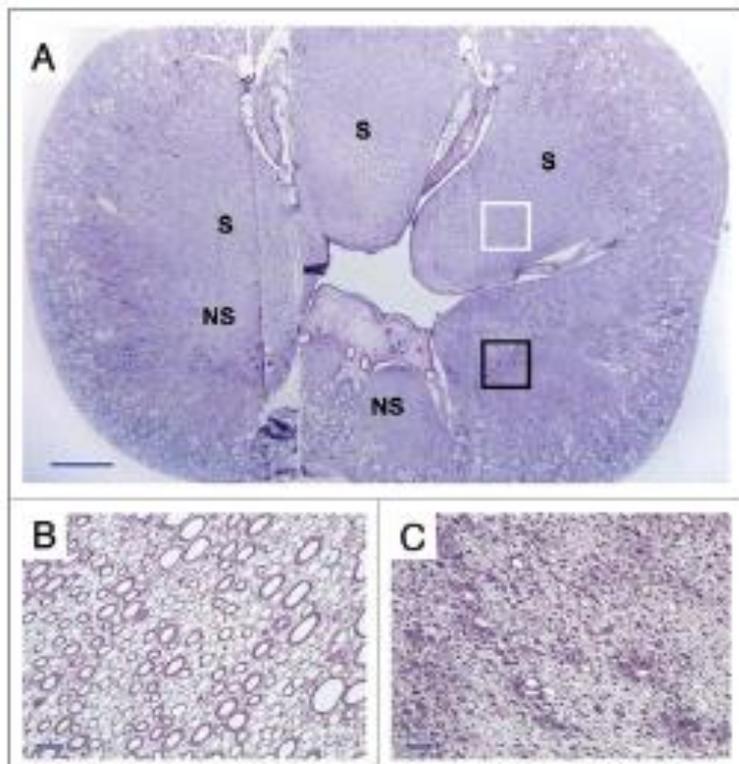


Figure 2. (A) Changes in blood levels of hemoglobin and potassium after transplantation of a previously vitrified rabbit kidney and interventions to correct both (triangles). Hyperkalemia was corrected by intravenous glucose (20 ml of 5% dextrose in 0.45% NaCl) and insulin (0.4 ml of 1 U/ml, IV). Anemia 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.

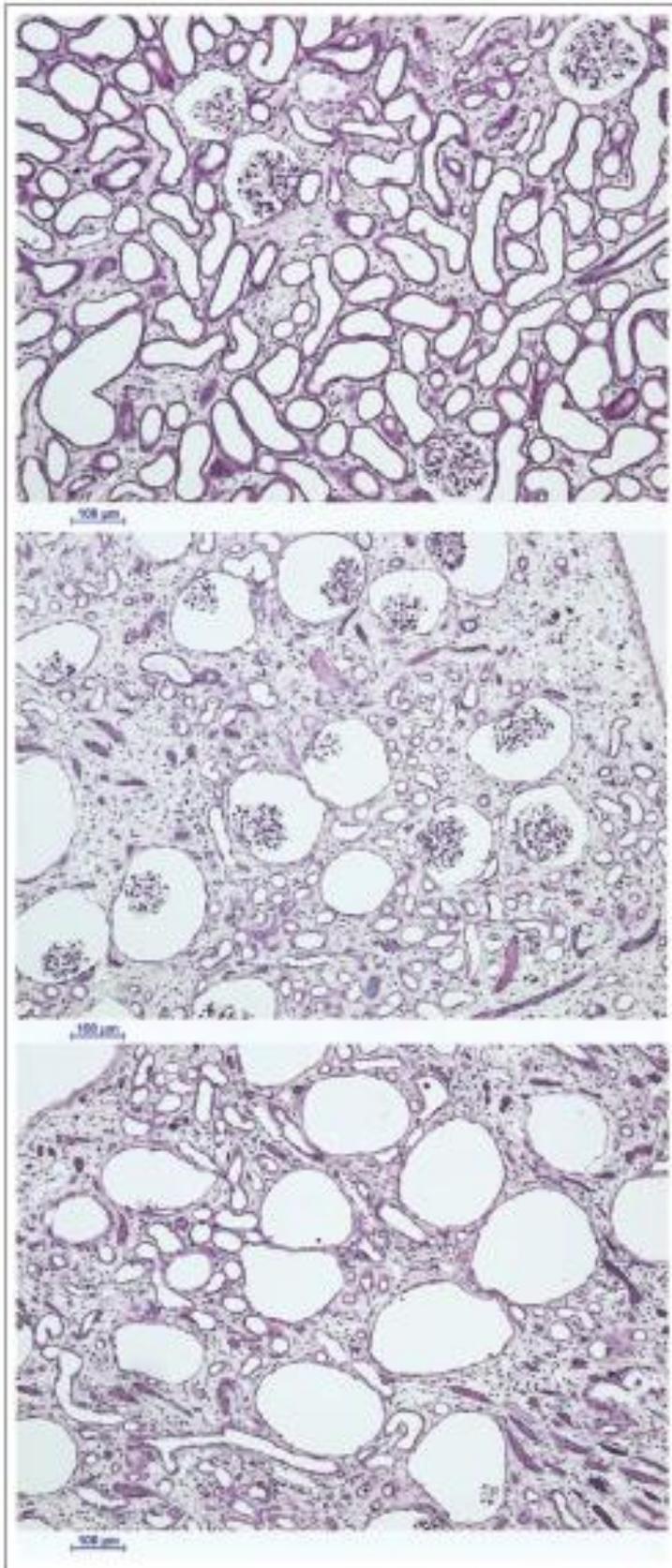


Figure 4. The spectrum of renal cortical responses to vitrification and rewarming. Top: area showing predominant survival of both tubules and glomeruli. Scale bars all represent 100 microns. Middle: transitional zone between predominantly surviving superficial renal cortex and non-surviving cortex, showing 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,³³ 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;³⁴ 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,³³ a filtration fraction in the vicinity of just 10%, which we have observed for rabbit kidneys,⁴⁵ 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 solution³⁵ (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 blocker³⁶ (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.

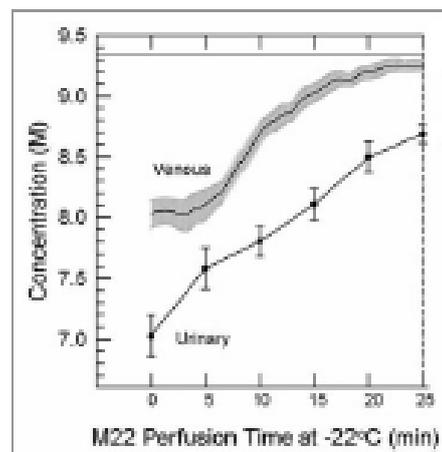


Figure 5. Difference between the venous concentration and the urinary space concentration during M22 perfusion at -22°C and 40 mmHg ($n = 4$ perfusions). Urine concentrations (discrete data points ± 1 SEM) determined manually; venous concentrations (line with gray “haze” consisting of ± 1 SEM) determined 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.

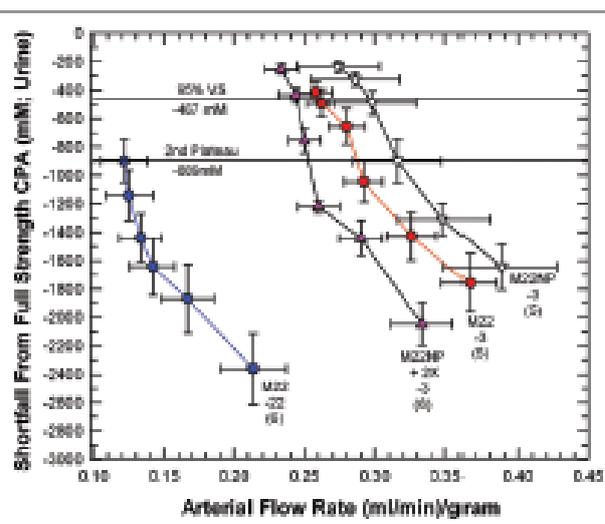


Figure 6. Equilibration shortfalls (urine concentration minus nominal arterial concentration) in rabbit kidneys perfused with M22 at -22°C (M22-22) or at -3°C (M22-3) plotted as a function of arterial flow rates (which decline as higher concentrations are reached and viscosity increases). M22NP-3 refers 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.

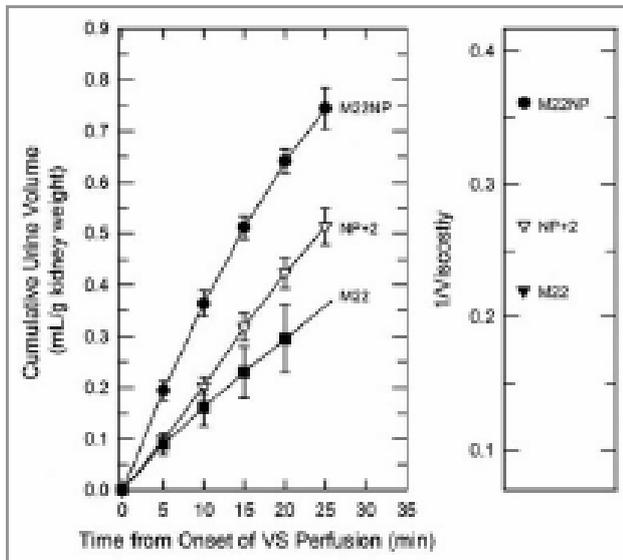


Figure 7. Left: urine accumulation during perfusion with M22, M22NP + 2% X1000 (NP + 2), and M22NP at -3°C ; right: reciprocal viscosities of these three vitrification solutions (cP^{-1}). The total accumulated urine volumes are inversely proportional to the total viscosity of each VS (M22 = 4.54 cP; 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 \pm 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).

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.

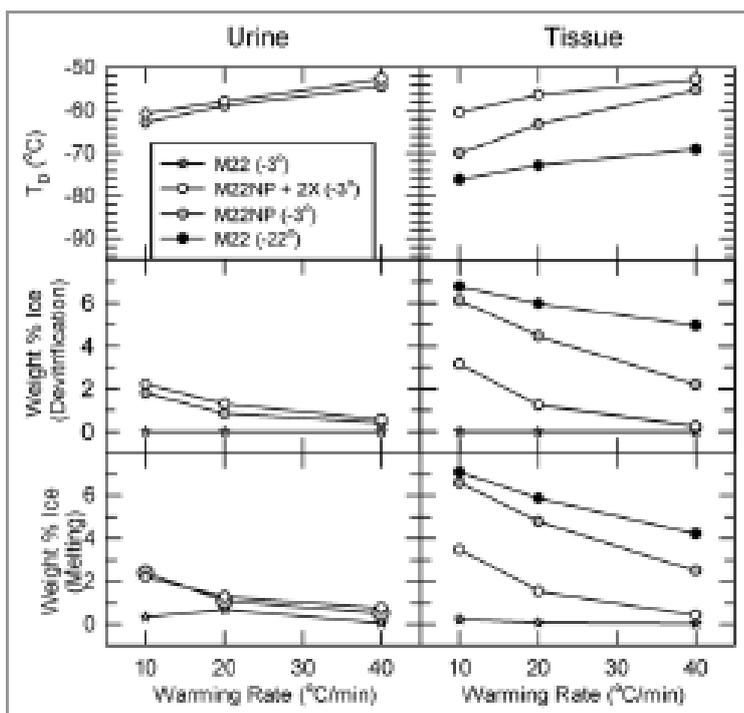


Figure 8. Temperature, extent and warming rate dependence of ice formation in urine (left) and tissue samples (right) obtained from kidneys subjected to the four protocols of Figure 6 and relationship between the amount of ice formed during devitrification and the amount of ice that thawed upon complete 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.

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,^{14,34} in an LM5 carrier solution under computer control⁶ 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 VMP¹⁹ 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_{∞} 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

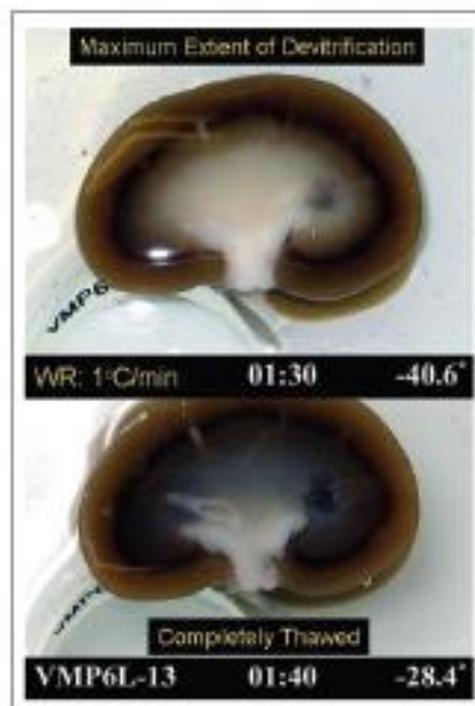


Figure 9. Visual appearance of ice in an exemplary rabbit kidney cross-section during rewarming. The kidney was perfused with M22 at -22°C, cut in half, immersed in M22, vitrified in a CryoStar freezer at -135°C, and eventually rewarmed at about 1°C/min while being photographed from time to time. Rewarming 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 method⁶ 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 Gilmore 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, Wosk B, Wu J. Cryopreservation of complex systems: the missing link in the regenerative medicine supply chain. *Rejuvenation Res* 2006; 9:273-91.
- Stard TL. 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, Alzouza GJM, Humphries AL Jr, eds. *Organ Preservation for Transplantation*. Boston: Little, Brown and Company 1976: 3-8.
- Khaliladi B, Fahy GM. Permanent life support by kidneys perfused with a vitrifiable (7.5 molar) cryoprotectant solution. *Transplantation* 2000; 70:51-7.
- Fahy GM, Wosk B, Wu J, Muan J, Ruch 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, Gooden B. Fertility after intact ovary transplantation. *Nature* 2002; 415:285.
- Karlsson JO, Toner M. Cryopreservation. In: Lema RF, Langer R, Vacanti J, eds. *Principles of Tissue Engineering*, Second Edition. San Diego: Academic Press 2000: 293-307.
- Acar A, Reed A, Nathan Y, Bor A, Garcia H, Trevis S, et al. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. *Hum Reprod* 2005; 20:3534-9.
- Kalser J. New prospects for putting organs on ice. *Science* 2002; 295:1015.
- Seop YC, Khaliladi BS, Lightfoot F, Brockbank KJL, Taylor MJ. Vitrous cryopreservation maintains the function of vascular grafts. *Nat Biotechnol* 2000; 18:286-9.
- Bellamy MA, Jovanic E, Garambaoglu R, Hazwin MR, Semlanow M, Baccati C, et al. Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. *Fertil Steril* 2005; 79:594-602.
- Martinez-Madrid B, Dolzans M-M, van Langendonck A, Defrere S, Demers J. Frozen-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril* 2004; 82:1389-4.
- Hawkins R, Hols H, Lehr HB. Successful preservation of canine small intestine by freezing. *J Surg Res* 1973; 14:313-8.
- Fahy GM. Analysis of "isolation effect" injury: rabbit renal cortex frozen in the presence of dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* 1980; 17:371-88.
- Ehmi A, Cavali Z, Knoch A, Housinger E, Schneider A, Schwilk H, et al. Successful restoration of function of frozen and thawed isolated rat hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135:666-72.
- Tokelo-Pereya LH. Organ freezing. *J Surg Res* 1982; 32:75-84.
- Pegg DE, Green CJ, Walter CA. Attempted canine renal cryopreservation using dimethyl sulfoxide, 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 in -50°C or below. *Low Temp Med* 1976; 2:95-105.
- Pegg DE, Duper ME. The mechanism of cryoinjury in glycerol-treated rabbit kidneys. In: Pegg DE, Jacobsen JA, Halse NA, eds. *Organ Preservation, Basic and Applied Aspects*. Lancaster: MTP Press, Ltd 1982: 389-93.
- Karow AM Jr, Shiber M. Ultrastructure-function correlative studies for cardiac cryopreservation. IV. Prethaw ultrastructure of myocardium cooled slowly ($-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$) or rapidly ($-70^{\circ}\text{C}/\text{sec}$) with or without dimethyl sulfoxide (DMSO). *Cryobiology* 1979; 12:130-43.
- Hart 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, Hards IR. An isolated perfused rat mesentery model for direct observation of the vasculature during cryopreservation. *Cryobiology* 1980; 23:500-11.
- Halse NA, Rosenfield HA, Orloff MJ, Sefton LN. Whole organ preservation II. Freezing studies. *Surgery* 1967; 61:617-21.
- Halse 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.
- Gutman FM, Latta J, Robitaille F, Marchand H, Thorge-Krueck 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 -50°C for up to 8 days. *Cryo Letters* 1980; 1:512-7.
- Fahy GM. Prospects for vitrification of whole organs. *Cryobiology* 1981; 18:617.
- Fahy GM, Hinch A. Prospects for organ preservation by vitrification. In: Pegg DE, Jacobsen JA, Halse NA, eds. *Organ Preservation, Basic and Applied Aspects*. Lancaster: MTP Press 1982: 398-404.
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Morysan HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984; 21:407-26.

33. Paly GM, Mactulane DG, Angell CA. Recent progress toward vitrification of kidneys. *Cryobiology* 1982; 19:668-9.
34. Wosk B, Paly GM. Toward large organ vitrification: extremely low critical cooling and warming rates of M22 vitrification solution. *Cryobiology* 2005; 51:362.
35. Wosk B, Paly GM. Ice nucleation and growth in concentrated vitrification solutions. *Cryobiology* 2007; 550.
36. Wosk B. Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology* 2009; 59:(in press).
37. Paly 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. Eal WE, Paly GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1987; 315:575-5.
39. Paly GM, Wosk B, Wu J, Popelar S. Improved vitrification solutions based on predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology* 2004; 48:22-35.
40. Paly GM. The role of nucleation in cryopreservation. In: Lee RJ, Warren GJ, Genu LV, eds. *Biological ice nucleation and its applications*. St. Paul: APS Press 1979; 315-36.
41. Paly 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. Courbin B, Mazardier J, Sille B, Metzger C, Guerin J-F, Lorange J. Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. *Fertil Steril* 2009; 91:1065-71.
43. Sugimoto M, March S, Marabe N, Miyamoto H. Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. *Theriogenology* 2006; 53:1093-103.
44. Sakchaisri M. Autograft of vitrified mouse ovaries using ethylene glycol as cryoprotectant. *Exp Anim* 2002; 5:509-12.
45. Mijahima F, Suzuki-Mijahima R, Song S-Y, Karamochi T, Asano S, Nishijima M, et al. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol Reprod* 2003; 68:881-7.
46. Brodthorn KG, Song YC. Morphological analysis of ice-free and frozen cryopreserved heart valve explants. *J Heart Valve Dis* 2004; 13:297-301.
47. Armstrong WJ, Hall SC, Routhledge 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, Brodthorn KG. Vitrification in tissue preservation: new developments. In: Fuller BJ, Lane N, Bennett EE, eds. *Life in the frozen state*. Boca Raton: CRC Press 2004; 603-41.
49. Paly 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* 1987; 55:114-31.
50. Paly GM, da Motta C, Tisser L, Khirabadi ES, Mehl F, Meryman HT. Cellular injury associated with organ cryopreservation: chemical toxicity and cooling injury. In: Lavanian JJ, Oliver C, eds. *Cell Biology of Trauma*. Boca Raton: CRC Press 1995.
51. Khirabadi ES, Paly GM, Ewing L, Saur J, Meryman HT. 1978 survival of rabbit kidneys chilled to -52°C after perfusion with 8 M cryoprotectant at -22°C. *Cryobiology* 1994; 31:597.
52. Wu J, Ge X, Paly GM. Ultrarapid nonstatic mixed cuff technique for renal transplantation in rabbits. *Microsurgery* 2003; 23:1-5.
53. Ohlnd J, Aulhaus K. Renal circulation. In: Seldin DW, Giebisch G, eds. *The kidney, physiology and pathophysiology*. New York: Raven Press 1985; 471-96.
54. Katsling B, Katz W. Structural analysis of the rabbit kidney. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1979; 56:1-123.
55. Wosk B, Leid F, Ruch CM, Meislich-Karsten N, Harris SH, Paly GM. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology* 2000; 40:228-36.
56. Paly GM. Organ perfusion equipment for the introduction and removal of cryoprotectants. *Biomed Instrum Technol* 1994; 28:67-100.

ANEXO B: TRABAJO CON ANIMALES



Sociedad Española
para las Ciencias del Animal de Laboratorio

PRINCIPIOS ÉTICOS EN INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA CON MODELOS ANIMALES

1. Se debe evitar el uso de animales cuando exista un *método alternativo* que proporcione resultados satisfactorios.

2. El beneficio final del uso de animales de experimentación debe estar claramente definido en cada protocolo. La evaluación de la necesidad de su uso debe realizarse a través de un *Comité Ético de Experimentación Animal*.

3. Los ensayos que incluyan animales como modelo experimental deben realizarse en *Establecimientos Usuarios* registrados. Los animales deben proceder de *Establecimientos de Cría* registrados en aquellos casos en que así lo establezca la legislación vigente.

4. Las personas que tomen parte en los experimentos (diseño, manipulaciones, cuidados) deben tener *formación específica* en las ciencias del animal de laboratorio. Los animales estarán siempre bajo *control veterinario*.

5. En cada ensayo hay que utilizar el *mínimo número de animales* posible que garantice resultados estadísticamente fiables.

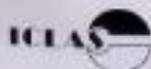
6. Los animales tienen que ser estabulados en *jaulas y recintos* apropiados, en espacios con *condiciones ambientales* estandarizadas y controladas. Igualmente debe estar garantizada la posibilidad de que los animales desarrollen los comportamientos propios de su especie siempre que las necesidades experimentales lo permitan.

7. Los ensayos deben realizarse con un grado de *refinamiento* que evite el dolor, sufrimiento o angustia de los animales. Se deben establecer *criterios de punto final* y pautas de *anestesia y analgesia* en función de la severidad de cada procedimiento.

8. Para la *eutanasia*, cuando sea necesaria, se debe aplicar un método ético y científicamente aprobado que reduzca al máximo el dolor y el estrés en los animales.

9. Legislación básica actual: REAL DECRETO 223/1988, de 14 de Marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Miembro de:



Diseño: juliasmgomezmas.com

ANEXO C: INFORMACIÓN SOBRE RATONES

En la fase experimental se trabajó con gran diversidad de especímenes. Dado que es un estudio metodológico, favorecemos la variabilidad entre muestras. En total los experimentos tuvieron lugar con hasta 5 cepas diferentes de *Mus Musculus*, de individuos con edades comprendidas entre los 3 y los 12 meses, y con un peso superior a 20 gramos e inferior a 48. Describiremos brevemente estas cepas:

FVB – corazón y tejido nervioso



La FVB (FVB/NJ) es una cepa multipropósito muy extendida en la experimentación en laboratorio (era sin duda la más común en el animalario del hospital Virgen Macarena) y son un buen referente para modelos y experimentación de actividad cardíaca (Gibb, y otros, 2016). No obstante, al menos en los individuos tratados en el laboratorio, la canulación aórtica solía llevar más tiempo dado el reducido diámetro vascular en comparación con otras cepas con las que se trabajó.

CD-1 – corazón

Similar en coloración a los FVB/NJ, los ratones CD-1 son considerablemente más grandes que los antes mencionados. Esto se traducía en un peso superior y un mayor volumen cardíaco, y por consecuencia un diámetro aórtico superior como se comprobó en la cirugía. No obstante, era frecuente encontrar el corazón rodeado de tejido adiposo que dificultaba la distinción de los vasos sanguíneos de la zona de trabajo. Los especímenes que tuvimos en el laboratorio se mostraban más activos que el resto de las cepas, traducándose esto en un manejo más dificultoso a la hora de administrar heparina y en el sacrificio. Son ratones de propósito general, similares a los FVB con la salvedad del tamaño.



C57-C3H – corazón



C57C3H es una cepa híbrida de las dos que componen su nombre. Estos ratones sobresalieron en la cirugía por el gran volumen de su corazón siendo adultos, pero más notablemente por la ausencia de tejido adiposo en gran cantidad alrededor de los vasos sanguíneos del corazón, lo que posibilitaba una visión clara de la aorta y canulación en tiempos muy inferiores a los intentos con otras cepas. Estos ratones producen una descendencia de gran tamaño, igualando a los CD-1 en peso a edades similares bajo el mismo régimen alimentario. Las mejores reproducciones del experimento de Langendorff para perfusión retrógrada se consiguieron con ratones pertenecientes a esta cepa.

TS1CJE – corazón

Una cepa modelo para el estudio del síndrome de Down, presenta anomalías en el comportamiento y capacidad de aprender (Sago, y otros, 1998) pero sin cardiopatías conocidas. Los ejemplares con los que se trabajó fueron híbridos de la cepa C57-C3H, y presentaban un gran tamaño y peso, y un corazón voluminoso lo que facilitaba la localización de la aorta y la canulación para el experimento de Langendorff. Su elección se debe únicamente a su gran tamaño.

C57 – corazón

(C57BL/6) Primera cepa que se usó para los experimentos. Nos proporcionó una visión clara de la aorta y sirvió como modelo para la canulación de ese momento en adelante. Es una cepa que compete con la CD-1 en laboratorio dada su versatilidad y similitud a nivel fisiológico (pesos similares a edades similares). Las crías nacidas por relaciones endogámicas son casi idénticas entre ellas y sus progenitores, por lo que esta cepa crea un grupo estable para experimentación reiterada y ofrece muestras con baja variabilidad interindividual. (Welsch, s.f.).

BEIGE – tejido nervioso

Son los ratones de menor tamaño de todas las cepas que hemos tenido, lo que nos invitó a practicar con ellos el experimento de criopreservación de tejido nervioso al no requerirse la canulación de una aorta más pequeña y dificultosa. La edad de los ejemplares se ubicaba entre los 2 y los 4 meses. El corazón se encontraba totalmente despejado, con ventrículos bien expuestos y diferenciados y ausentes de tejido adiposo en los alrededores, facilitando la perforación ventricular y la perfusión.



ANEXO D: TRANSPORTE DE ANIMALES

TSICJE

(Página 1 de 2)

ANEXO V

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL
 Dirección General de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural

DOCUMENTO DE ACOMPAÑAMIENTO PARA EL TRASLADO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EN EL MARCO DE UN PROYECTO

El presente documento se redacta en cumplimiento de lo establecido en el artículo 10 de la Ley 17/2011, de 4 de junio, por la que se modifica la Ley 17/2002, de 14 de mayo, por la que se regula la producción de carne y derivados de los animales de cría, en el ámbito de aplicación de la Ley 17/2011, de 4 de junio, por la que se modifica la Ley 17/2002, de 14 de mayo, por la que se regula la producción de carne y derivados de los animales de cría.

1 DATOS DEL CENTRO DE ORIGEN			
NOMBRE O RAZÓN SOCIAL Animalario Facultad de Medicina/BVM		Nº DE REGISTRO 80410910100010	NIF Q-4118961-7
DIRECCIÓN Avda. Sánchez Pizjuán s/n		LOCALIDAD Sevilla	PROVINCIA Sevilla
CÓDIGO POSTAL 41013	TELÉFONO 955.080.204	FAX	CORREO ELECTRÓNICO ibenito@us.es

2 DATOS DEL TITULAR DEL CENTRO DE ORIGEN			
APELLIDOS Y NOMBRE Capitán Morales, Luis			IDENTIFICACION
DIRECCIÓN Avda. Sánchez Pizjuán s/n		LOCALIDAD Sevilla	PROVINCIA Sevilla
CÓDIGO POSTAL 41013	TELÉFONO 954559822	FAX	CORREO ELECTRÓNICO

3 DATOS DEL CENTRO DE DESTINO			
NOMBRE O RAZÓN SOCIAL Cursos Injertos		Nº DE REGISTRO 804109101008019	NIF
DIRECCIÓN		LOCALIDAD	PROVINCIA
CÓDIGO POSTAL	TELÉFONO	FAX	CORREO ELECTRÓNICO

4 DATOS DEL PROYECTO	
TÍTULO DEL PROYECTO Mecanismos	DIRECCIÓN (Indicador en años y meses)
APELLIDOS Y NOMBRE DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL Ramon Ros	HORA DE SALIDA

5 NUMERO E IDENTIFICACIÓN DE LOS ANIMALES		
ESPECIE	Nº DE ANIMALES	IDENTIFICACIÓN
Ratones (TSICJE)	3	6/ junio/18

6 INSTRUCCIONES SOBRE EL SUMINISTRO DE AGUA, DE ALIMENTOS Y DE CUIDADOS ESPECIALES A LOS ANIMALES	



7 DATOS DEL TRANSPORTE			
DATOS DEL TRANSPORTISTA <i>Vehículo propio</i>			UNIDAD
Nº DE AUTORIZACIÓN DEL TRANSPORTISTA		Nº DE AUTORIZACIÓN DEL VEHÍCULO PARA EL TRANSPORTE DE ANIMALES	
FECHA DE SALIDA	LUGAR DE SALIDA	FORMA DE SALIDA PREVISTA	DEJARCIÓN ESTIMADA DEL VIAJE

8 DATOS DEL VETERINARIO/A DEL CENTRO DE ORIGEN			
APellidos y nombre Benito Latasa de Acamibar, Itxier			DIRECCIÓN 449516707
DIRECCIÓN Avda. Sánchez Pizjuán s/n		LOCALIDAD Sevilla	PROVINCIA Sevilla
CÓDIGO POSTAL	TELÉFONO	FAX	CORREO ELECTRÓNICO
43008	955.000.204		ibenitodas.es

9 DOCUMENTACIÓN QUE SE ADJUNTA (Original y/o copia para su control)
<input type="checkbox"/> Acreditación del órgano competente del lugar de destino (si procede)

10 LUGAR, FECHA Y FIRMA
<p>En <i>Sevilla</i> a <i>20 de mayo</i> de <i>2016</i></p> <p>EL VETERINARIO DEL CENTRO DE ORIGEN</p> <p><i>[Firma]</i></p> <p>Id. <i>IBIAR Benito</i></p>

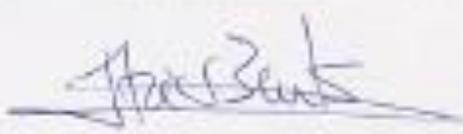
<p>PROTECCIÓN DE DATOS</p> <p>En cumplimiento de lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, la Consejería de Agricultura, Pesca y Ganadería hace el informe que por este parte tiene aludidos en relación con el presente documento (registro/autorización y demás que se requiera con el correspondiente, según su naturaleza, a su fichero automatizado. Asimismo, se le informa que el registro y mantenimiento de estos datos tiene como finalidad el gestión de la documentación.</p> <p>De acuerdo con lo previsto en la citada Ley Orgánica, puede ejercerse los derechos de acceso, rectificación, modificación y supresión dirigidos al respecto a la Dirección General de Producción Agrícola y Ganadera, Consejería de Agricultura, Pesca y Ganadería, C/ Sábana, s/n, 41011-02/ES/SA.</p>
--

EL PERIODO DE VALIDEZ DE ESTE DOCUMENTO NO PODRÁ SER SUPERIOR AL DEL DOCUMENTO SANITARIO DE TRASLADO CORRESPONDIENTE.

7 DATOS DEL TRANSPORTE			
DATOS DEL TRANSPORTISTA			OTRO:
Vehículo propio:			
Nº DE AUTORIZACIÓN DEL TRANSPORTISTA		Nº DE AUTORIZACIÓN DEL VEHÍCULO PARA EL TRANSPORTE DE ANIMALES VIVOS	
FECHA DE SALIDA	LUGAR DE SALIDA	FECHA DE SALIDA PREVISTA	DIRECCIÓN ESTIMADA DEL VIAJE

8 DATOS DEL VETERINARIO/A DEL CENTRO DE ORIGEN			
APellidos y Nombre			DPTO:
Dimitio Esteban de Arribas, Ibar			649578702
DIRECCIÓN:		LUGAR:	PROVINCIA:
Arda, Sánchez Pizjóns s/n		Sevilla	Sevilla
CÓDIGO POSTAL	TELÉFONO	FAX	CORREO ELECTRÓNICO
41001	955.028.284		ibarnitofus.es

9 DOCUMENTACIÓN QUE SE ADJUNTA (Original y/o copia para su control)
<input type="checkbox"/> Acreditación del órgano competente del lugar de destino (si procede)

10 LUGAR, FECHA Y FIRMA
En Sevilla, a 04 de Junio de 2013
EL VETERINARIO DEL CENTRO DE ORIGEN

Fm. IBAR BENITO

PROTECCIÓN DE DATOS
 En cumplimiento de lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, la Dirección General de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural le informa que los datos personales que constan en el presente documento han sido facilitados y de los que se adjuntan con él, son proporcionados, para su tratamiento, a esta Administración. Asimismo, se le informa que la recogida y tratamiento de dichos datos tiene como finalidad la gestión de la documentación.
 De acuerdo con lo previsto en la Ley Orgánica, usted ejerce los derechos de acceso, rectificación, actualización y supresión dirigidos al respecto a la Dirección General de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, C/ Tardajos, s/n. 41013 SEVILLA.

EL PERÍODO DE VALIDEZ DE ESTE DOCUMENTO NO PODRÁ SER SUPERIOR AL DEL DOCUMENTO SANITARIO DE TRASLADO CORRESPONDIENTE

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL
 Delegación Provincial de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente

DOCUMENTO DE ACOMPAÑAMIENTO PARA EL TRASLADO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EN EL MARCO DE UN PROYECTO

Origen de: Laboratorio Centro de Experimentación Establecimiento de cría Establecimiento de reproducción Establecimiento de conservación Establecimiento de investigación Establecimiento de diagnóstico Establecimiento de referencia Establecimiento de diagnóstico Establecimiento de referencia Establecimiento de diagnóstico Establecimiento de referencia

por el que se autoriza el transporte y traslado de animales experimentales de la siguiente y con las condiciones previstas en el Decreto 85/2012, de 13 de marzo, por el que se regulan las condiciones de sanidad y bienestar de los animales.

1 DATOS DEL CENTRO DE ORIGEN			
NOMBRE O RAZÓN SOCIAL: Mineralogic Facultad de Medicina/BUVM		N.º DE REGISTRO: 25410910000010	N.º: Q-4118001-1
DOMICILIO: Ave. Sánchez Pizjón 4/n		LOCALIDAD: Sevilla	PROVINCIA: Sevilla
CODIGO POSTAL: 41000	TELÉFONO: 955.008.284	FAX:	CORREO ELECTRÓNICO: lbanito@us.es

2 DATOS DEL TITULAR DEL CENTRO DE ORIGEN			
APELLIDOS Y NOMBRE: Capitán Morales, Uxía		D.N.I.:	
DOMICILIO: Ave. Sánchez Pizjón 4		LOCALIDAD: Sevilla	PROVINCIA: Sevilla
CODIGO POSTAL: 41000	TELÉFONO: 954559023	FAX:	CORREO ELECTRÓNICO:

3 DATOS DEL CENTRO DE DESTINO			
NOMBRE O RAZÓN SOCIAL: Escuela Ingenieros		N.º DE REGISTRO: 25410910000010	N.º: Q-4118001-1
DOMICILIO:		LOCALIDAD: Sevilla	PROVINCIA: Sevilla
CODIGO POSTAL:	TELÉFONO:	FAX:	CORREO ELECTRÓNICO:

4 DATOS DEL PROYECTO	
TÍTULO DEL PROYECTO:	COORDENACIÓN (ubicación en el país y ciudad):
APELLIDOS Y NOMBRE DEL PRESTADOR PRINCIPAL: Ramon Risco	HORA DE SALIDA: 13:30

5 NÚMERO E IDENTIFICACIÓN DE LOS ANIMALES		
ESPECIE	N.º DE ANIMALES	IDENTIFICACIÓN
Rododora	3	FVB, 7 meses

6 INSTRUCCIONES SOBRE EL SUMINISTRO DE AGUA, DE ALIMENTOS Y DE CUIDADOS ESPECIALES A LOS ANIMALES DURANTE EL TRANSPORTE	



000131/ANOS

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

DOCUMENTO DE ACOMPAÑAMIENTO PARA EL TRASLADO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EN EL MARCO DE UN PROYECTO (Código procedimiento: 12575)

Orden de _____ por la que se establecen los modelos y sistemas normalizados de la solicitud y comunicaciones previstos en el Decreto 66/2012, de 13 de marzo, por el que se regulan las condiciones de sanidad y zootécnicas de los animales.

1 DATOS DEL CENTRO DE ORIGEN			
NOMBRE O RAZÓN SOCIAL: Servicio de Producción y Experimentación Animal, IISGG/INVS		Nº DE REGISTRO: E0411910000045	NIF: G0100105
DOMICILIO: Avda Manuel Sáenz s/n		ENTIDAD DE POBLACION: Sevilla	PROVINCIA: Sevilla
CODIGO POSTAL: 4 1 0 1 2	TELÉFONO: 955912103	FAX: 955912101	CORREO ELECTRÓNICO: animalario.1bis@us.es
2 DATOS DE LA PERSONA TITULAR DEL CENTRO DE ORIGEN			
APPELLIDOS Y NOMBRE: José López Barneo			DNI/NIF: 3561275727V
DOMICILIO: Avda Manuel Sáenz s/n			PROVINCIA: Sevilla
CODIGO POSTAL: 4 1 0 1 2	TELÉFONO: 955912103	FAX: 955912101	CORREO ELECTRÓNICO: animalario.1bis@us.es
3 DATOS DEL CENTRO DE DESTINO			
NOMBRE O RAZÓN SOCIAL: CEA-CITIOBIII Escuela de Ingenieros Univ. Sevilla		Nº DE REGISTRO: E0411910000019	NIF: G4118001-1
DOMICILIO: C/ Camino de los descubrimientos s/n		ENTIDAD DE POBLACION: Sevilla	PROVINCIA: Sevilla
CODIGO POSTAL: 4 1 0 6 2	TELÉFONO: 955420102	FAX:	CORREO ELECTRÓNICO: animalario@us.es
4 DATOS DEL PROYECTO			
TÍTULO DEL PROYECTO: 16/13/2016/174			DURACION (Indicación en años y meses)
APPELLIDOS Y NOMBRE DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL: Rafael Fernández Chacón			HORA DE SALIDA: 12:00
5 NÚMERO E IDENTIFICACIÓN DE LOS ANIMALES			
ESPECIE	Nº DE ANIMALES	IDENTIFICACIÓN	
Ratón (Ras musculus)	3	Número C57N	
6 INSTRUCCIONES SOBRE EL SUMINISTRO DE AGUA, DE ALIMENTOS Y DE CUIDADOS ESPECIALES A LOS ANIMALES DURANTE EL TRANSPORTE			
El transporte dura menos de 30 minutos y no se considera necesario. No obstante, los cajas tienen algunos pellets de paja.			



0002131710005

7 DATOS DEL TRANSPORTE			
DATOS DEL TRANSPORTISTA: Transporte propio			DNI/NIE/NIF:
Nº DE AUTORIZACIÓN DEL TRANSPORTISTA:		Nº DE AUTORIZACIÓN DEL VEHÍCULO PARA EL TRANSPORTE DE ANIMAL VIVOS:	
FECHA DE SALIDA:	LUGAR DE SALIDA: Sevilla	HORA DE SALIDA PREVISTA: 0:00	DURACIÓN ESTIMADA DEL VIAJE: 30 minutos

8 DATOS DE EL/LA VETERINARIO/A DEL CENTRO DE ORIGEN			
APELLIDOS Y NOMBRE: Dacar Placido Sanjuan			DNI/NIE: 104000000
DOMICILIO: C/BA-CENTRO III Edif.Manuel Lameda Villaverde Univ. Sevilla		ENTIDAD DE POBLACIÓN: Sevilla	PROVINCIA: Sevilla
CODIGO POSTAL: 41013	TELÉFONO: 954420100	FAX:	CORREO-ELECTRÓNICO: animales@daa.es

9 DOCUMENTACIÓN QUE SE ADJUNTA	
<input type="checkbox"/>	Autorización del órgano competente del lugar de destino (si procede)

10 LUGAR, FECHA Y FIRMA	
En <u>Sevilla</u> a <u>08</u> de <u>Mayo</u> de <u>2019</u>	
EL/LA VETERINARIO/A DEL CENTRO DE ORIGEN	
Fdo: <u>Responsable de Bienestar Animal Cristina Richardo</u>	

PROTECCIÓN DE DATOS

El presente formulario puede contener datos de carácter personal, amparados por la vigente legislación en materia de protección de datos, con la que se garantiza la finalidad de documentar la trazabilidad de los productos agrícolas y forestales a los que se refiere. Cualquier tratamiento que se realice sobre los datos (incluida la conservación en material del formulario), está sujeto a las obligaciones establecidas para los responsables y/o encargados de tratamiento por el Reglamento General de Protección de Datos y cualquier normativa adicional.

Esta información, por obligación legal, puede ser requerida por los cuerpos y fuerzas de seguridad del estado y por las compañías con competencias en la materia, en el ejercicio de sus funciones.

EL PERIODO DE VALIDEZ DE ESTE DOCUMENTO NO PODRÁ SER SUPERIOR AL DEL DOCUMENTO SANITARIO DE TRASLADO CORRESPONDIENTE

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL
 Dirección General de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente

DOCUMENTO DE ACOMPAÑAMIENTO PARA EL TRASLADO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EN EL MARCO DE UN PROYECTO

Cumplido por el/los titular/es del centro de origen y el/los destinatarios del centro de destino, en cumplimiento de lo establecido en el Decreto 65/2012, de 13 de marzo, por el que se regulan los requisitos de sanidad y zootécnicos de los animales.

1 DATOS DEL CENTRO DE ORIGEN			
NOMBRE O RAZÓN SOCIAL Alumbario Facultad de Medicina/UDVM		Nº DE REGISTRO E5410910008318	NIF D-4120001-1
DOMICILIO Avda. Sánchez Pizjuán s/n		LOCALIDAD Sevilla	PROVINCIA Sevilla
CÓDIGO POSTAL	TELÉFONO	FAX	CORREO ELECTRÓNICO
41009	955.608.204		ibanito@us.es

2 DATOS DEL TITULAR DEL CENTRO DE ORIGEN			
APellidos y nombre Capitán Morales, Luis			DNIF 61000000
DOMICILIO Avda. Sánchez Pizjuán 4			LOCALIDAD Sevilla
CÓDIGO POSTAL	TELÉFONO	FAX	CORREO ELECTRÓNICO
41009	95559822		

3 DATOS DEL CENTRO DE DESTINO			
NOMBRE O RAZÓN SOCIAL Escuela Ingenieros		Nº DE REGISTRO E5410910008019	NIF D-4120001-1
DOMICILIO		LOCALIDAD Sevilla	PROVINCIA Sevilla
CÓDIGO POSTAL	TELÉFONO	FAX	CORREO ELECTRÓNICO

4 DATOS DEL PROYECTO	
TÍTULO DEL PROYECTO	DIRECCIÓN (destino en años y meses)
APellidos y nombre del investigador principal Ramón Risco	HORA DE SALIDA 13:30

5 NÚMERO E IDENTIFICACIÓN DE LOS ANIMALES		
Especie	Nº DE ANIMALES	IDENTIFICACIÓN
Rodentia	6	3 CD1 Tceboos, 3 C57CBH (hibrido) 10 meses

6 INSTRUCCIONES SOBRE EL SUMINISTRO DE AGUA, DE ALIMENTOS Y DE CUIDADOS ESPECIALES A LOS ANIMALES DURANTE EL TRANSPORTE	

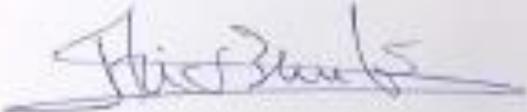


0001171408

7 DATOS DEL TRANSPORTE			
DATOS DEL TRANSPORTISTA			IBR/IB
Vehículo propio			
Nº DE AUTORIZACIÓN DEL TRANSPORTISTA		Nº DE AUTORIZACIÓN DEL VEHICULO PARA EL TRANSPORTE DE ANIMALES VIVOS	
FECHA DE SALIDA	LUGAR DE SALIDA	FECHA DE SALIDA PREVISTA	DURACION ESTIMADA DEL VIAJE

8 DATOS DEL VETERINARIO/A DEL CENTRO DE ORIGEN			
NOMBRE Y NOMBRE			IBR/IB
Dorito Larasa de Aranzhar, Itiner			845078707
DOMICILIO		LOCALIDAD	
koda. Sánchez Pizjón 6/n		Sevilla	
CÓDIGO POSTAL	TELÉFONO	FAX	CORREO ELECTRÓNICO
4 1 . 0	955.008.284		ibranito@es.es

9 DOCUMENTACIÓN REE SF 60 MINTA (Original y foto copia para su archivo)	
<input type="checkbox"/>	Asesoración del origen competente del lugar de destino (si procede)

10 LUGAR, FECHA Y FIRMA	
En Sevilla el 17 de Julio de 2015	
EL VETERINARIO DEL CENTRO DE ORIGEN	
	
Dra. Dorito Larasa	

PROTECCIÓN DE DATOS
En cumplimiento de lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, la Comisión de Actividades Pesqueras de Sevilla, declara que los datos que se recogen en el presente formulario de traslado de animales vivos, tanto en su contenido como en su finalidad, son de carácter personal y que la recogida y tratamiento de dichos datos tiene como finalidad la gestión de la documentación.
De acuerdo con el artículo 17 de la Ley Orgánica, podrá ejercerse los derechos de acceso, modificación, cancelación y supresión de los datos recogidos en este formulario en la Dirección General de Pesca Acuática y Acuicultura, Campesinado Agrario, Pesca y Desarrollo Rural, C/ Jandilla, s/n. 41015 SEVILLA.

EL PERIODO DE VALIDEZ DE ESTE DOCUMENTO NO PODRÁ SER SUPERIOR AL DEL DOCUMENTO SANITARIO DE TRASLADO CORRESPONDIENTE.

ANEXO E: PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Tabla 29. Reactivos para preparar Tyrode's HEPES.

	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂ · 2H ₂ O	Buffer HEPES	Glúcosa
g/L	5.844	0.403	0.203	0.265	2.383	4.504
No.	15	10	41 (anhydrous)	7	27	4

Tabla 30. Reactivos para preparar PBS.

	NaCl	KCl	Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄
g/L	8.0	0.2	1.444	0.24
No.	15	10	14	26



100. Reactivos para preparar Tyrode's HEPES.



101. Reactivos para preparar PBS.

Instrucciones para hacer la solución

Hay que pesar esos gramos de cada reactivo y disolverlo todo en agua pura, pero hay que seguir una serie de pasos por orden.

Hay que disolver cada sal individualmente en agua, una por una, y es mejor si son añadidas en el orden en el que se han puesto.

Materiales:

- ✓ Matraz aforado de 1 L o 500 mL
- ✓ Espátula
- ✓ Vaso de precipitados mediano (2)
- ✓ Agitador magnético y mosca
- ✓ Báscula de precisión
- ✓ Agua Type I

1. En la balanza analítica, tarar el vaso de precipitados y luego añadir, con la espátula, el reactivo hasta tener los gramos necesarios.
2. Trasvasar todo al otro vaso de precipitados, simplemente volcando, y en ese segundo vaso de precipitados añadir agua (unos 50 mL) y colocar en el agitador hasta que se disuelva; es decir, que el agua sea totalmente transparente.
3. Mientras se disuelve, pesar el siguiente reactivo de la misma manera en el vaso, sucio (porque quedarán trazas), pero tarando el vaso siempre antes de una nueva pesada.
4. Cuando se te haya disuelto el reactivo, trasvasar al matraz aforado.
5. Repetir con todos los reactivos, y al final, enrasar con agua pura hasta la marca del cuello del matraz; la parte más baja del líquido es la que tiene que estar tocando la línea por encima. Eso es un volumen perfectamente exacto.
6. Cuando se esté llegando al cuello, hacerlo con un cuentagotas o pipeta Pasteur para no pasarnos, porque entonces hay que repetirlo todo.



102. Preparación de Tyrodes HEPES.

Consideraciones

- Tarar el vaso de precipitados siempre antes de una nueva pesada (porque cada vez tendrá más residuos de los reactivos que han ido pasando por ahí)

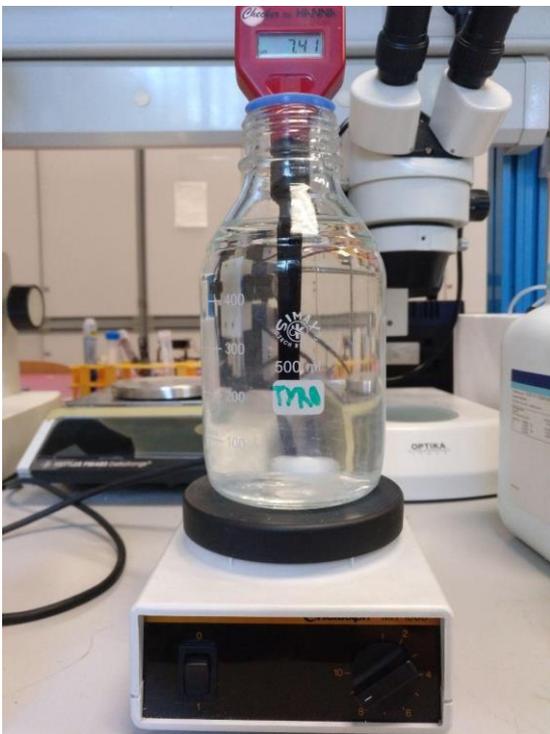
- Cuando no haya que pesar más y se tenga que acabar de llenar el matraz, hacerlo limpiando ambos vasos de precipitados (es decir, echar el agua pura en ambos vasos, remueves un poco y trasvasar el contenido al matraz; normalmente se limpian tres veces cada uno)
- Cada vez que se cambie de reactivo, limpiar la espátula con un papel para no contaminar el reactivo siguiente.
- Al finalizar, poner un tapón al matraz aforado y homogeneizar la solución volcándolo tres veces boca abajo.
- Cuando esté lista, pasarlo a un bote de 1L, y a la nevera.

Ajuste de pH para Tyrodes

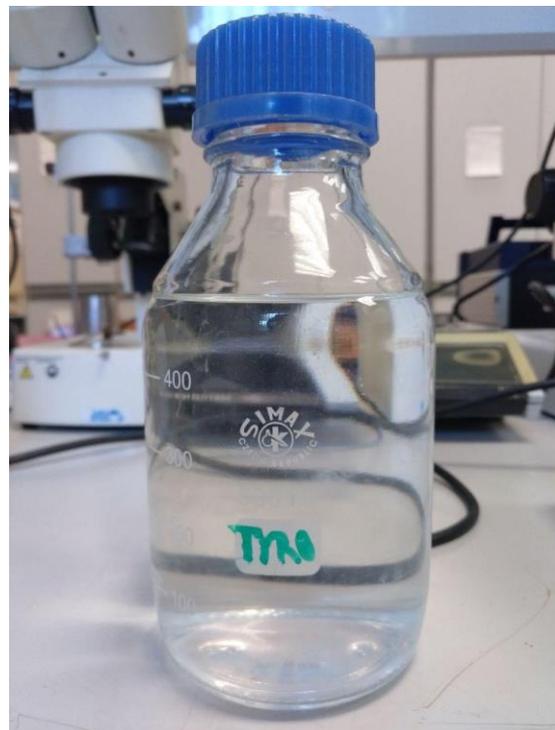
La solución preparada tiene un pH demasiado bajo para nuestra aplicación. Con un pH cercano a 4.8 en el fondo del vaso de precipitado y superior a 5.15 en la superficie, necesitamos homogeneizar la solución y ajustarlo a 7.4. Para ello, vertemos el contenido en un bote y volteamos tres veces, y medimos el pH en el centro del recipiente.

Añadimos con una pipeta NaOH hasta ajustar el pH, agitando con un agitador magnético y mosca para evitar gradientes de pH.

Se deberá ajustar el pH en cada uso de la solución, pues tiende a acidificarse con el tiempo y requerimos 7.4 de pH constante.



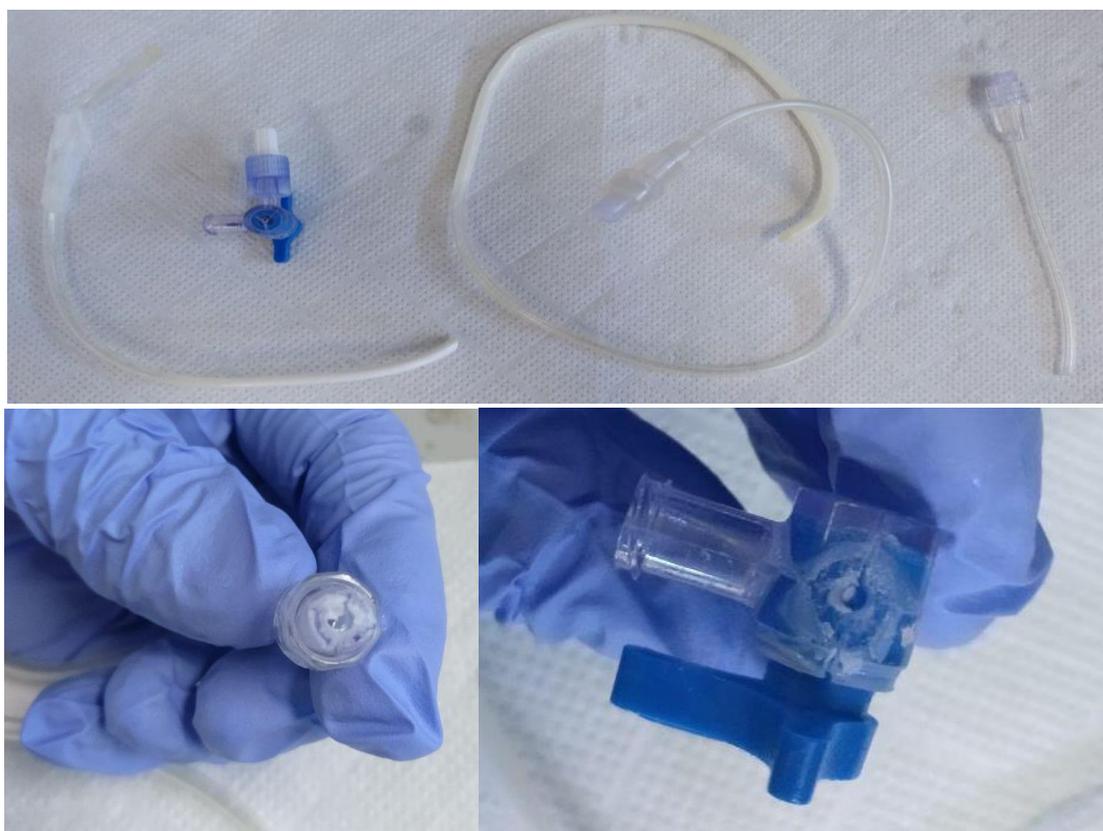
103. Ajuste de pH.



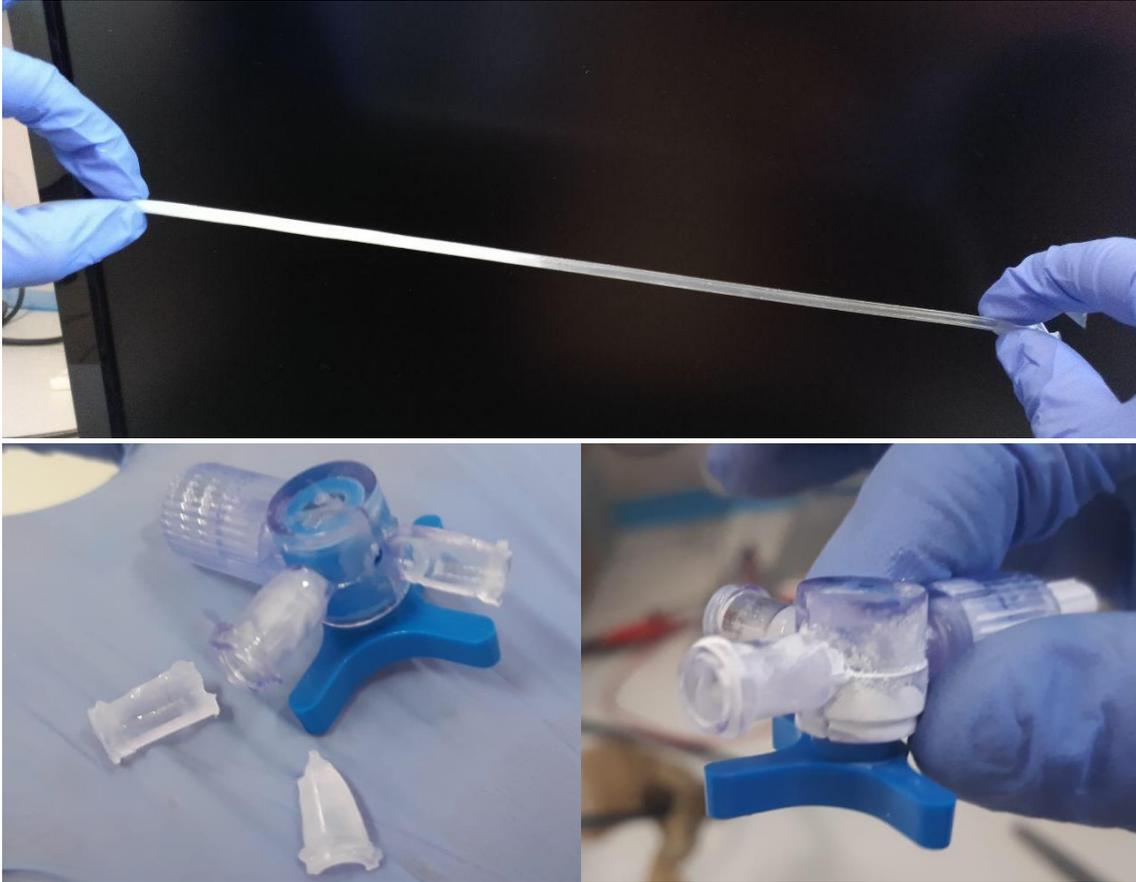
104. Tyrode's HEPES 500mL preparado.

ANEXO F: INCIDENCIAS CON EL DMSO

El ataque del DMSO a los circuitos hidráulicos fue una problemática durante todo el proyecto. Al estar hechos de plástico, los tubos de conexionado, en particular las llaves de tres vías y el conexionado Luer eran especialmente sensibles a esta acción en un tiempo prolongado. La duración de los experimentos de perfusión, desde la precarga inicial hasta el término del ensayo, no era superior a las 2 horas. No obstante, si el circuito no era vaciado y lavado al completo una vez terminar, los restos de DMSO debilitaban las uniones. En los periodos más intensos de experimentación se hubo de cambiar las llaves de tres vías y otro tipo de conexionado con una frecuencia elevada, a veces más de una vez por día. Los tubos que se veían expuestos al DMSO perdían rigidez y la pared interior con el tiempo se iba desprendiendo, lo cual es muy perjudicial para el experimento. Esto afectaba tanto a la parte biológica del experimento (micropartículas de plástico desprendidas presentes en el perfusato) como a la parte más mecánica, cambiando la estructura del tubo, su continuidad, su grosor y afectando todo esto a las bombas peristálticas.



104. Ataque del DMSO a los tubos y conexiones (1/2).



105. Ataque del DMSO a los tubos y conexiones (1/2).

La solución aportada a esta problemática fue la cobertura de fugas y empalmes con resina Epoxi y con silicona. La silicona y el polietileno son resistentes a la acción de ataque del DMSO, por lo que se reemplazaron los tramos del circuito hidráulico de DMSO con este material.

En lo referente a la temperatura del DMSO, el hecho de que su punto de fusión se encuentre a 19°C cuando la pureza es alta dificulta la posibilidad de mantener frío el perfusato antes de entrar al corazón, pues si se quisiera enfriar los depósitos por separado el de DMSO cristalizaría, y si se quisiera enfriar el tubo de perfusión a la salida de la unión T se necesitaría un tramo relativamente largo para poder tener una transmisión de calor a lo largo de este tubo que permita perder entre 20°C y 30°C antes de salir de la aguja. Esto se traduce en un retardo en la llegada del fluido al órgano desde que sale de la unión T, y el desfase de un par de minutos es algo que se debería evitar.

ANEXO G: CÁLCULO DE DOSIS DE HEPARINA

El cálculo de la dosis se hizo acorde a la cantidad necesaria para heparinizar un cuerpo humano, el volumen de sangre en este así como el volumen de sangre de un ratón. Según aparece en (Kaese, 2012), se tiene:

Table 1 | Comparison of mouse and human (cardiac) physiology.

	Human	References	Mouse	References
GENERAL				
Body mass (kg)	58–85	de la Grandmaison et al., 2001; Stein et al., 2002; Noujaim et al., 2004; Johnstone et al., 2005; Kasper et al., 2008; Later et al., 2010; Barnes et al., 2012	0.015–0.043	Sheng et al., 1999; et al., 2000; Jai et al., 2002; Ne Muller et al., 2009; Brands et al., 2010; Cai
Lifespan (year)	70–80	Zhang and Zhang, 2009	2–2.5	Speakman et al.
Basal metabolic rate (kJ/d)	6279	Johnstone et al., 2005	15.6	Speakman et al.
Basal metabolic rate (O ₂ consumption L/(kg ^{0.75} ·h))	0.9	Janssen and Smits, 2002	0.8–3	Desai et al., 1999
HEART				
Heart weight (g)	261–366	de la Grandmaison et al., 2001; Cunha et al., 2002; Janssen and Smits, 2002; Later et al., 2010	0.12–0.17	Muller et al., 2009; Carlström
Heart weight/body weight ratio (kg/kg)	0.004–0.006	de la Grandmaison et al., 2001; Cunha et al., 2002; Later et al., 2010	0.004–0.005	Muller et al., 2009; Carlström
HEMODYNAMIC				
Stroke volume (mL)	50–100	Janssen and Smits, 2002; Meijler et al., 2005; Kasper et al., 2008	0.015–0.05	Janssen and Smits et al., 2010; Hy
Cardiac output (L/min)	4–8	Janssen and Smits, 2002; Mestas and Hughes, 2004; Meijler et al., 2005; Kasper et al., 2008	0.005–0.03	Janssen and Smits et al., 2010
Blood pressure (mean arterial pressure, mmHg)	88–100	Mancia et al., 1983; Janssen and Smits, 2002; Barnes et al., 2012; Damkjaer et al., 2012	73–125	Kass et al., 1999; Smits, 2002; Bi
Blood volume (L)	5–6	Janssen and Smits, 2002; Mestas and Hughes, 2004; Kasper et al., 2008	0.002–0.03	Sheng et al., 1999; and Hughes, 2004
CARDIAC EP				

106. (Kaese, 2012)

Y partiendo de la dosis en una jeringuilla con heparina (0.5 mL) para suministrar a una persona (5-6 L de sangre), se puede calcular la dosis necesaria para un ratón:

0.5 mL de heparina → 5 L de sangre;

0.1 mL de heparina para 1 L de sangre

Se dispone de 0.2 mL para una primera reserva de heparina. Se realizarán los cálculos con esta cantidad. Dado que, según la Figura 1, un ratón tiene unos 2 mL de sangre (usamos la cepa FVB, machos de 7 meses, con un peso de 30 gramos aproximadamente. Frente a los TS1CJE que serán

manejados en laboratorio, de más de 40 gramos, suponiéndose que el volumen de sangre para FVB es el valor inferior de la horquilla).

$0.1 \text{ mL de heparina} \rightarrow 1 \text{ L de sangre}$

$x \quad \rightarrow 2 \text{ mL de sangre}$

$$x = \frac{0.1 \times 10^{-3} L_{hep} \times 2 \times 10^{-3} L_{sangre}}{1 L_{sangre}} = 2 \times 10^{-7} L_{hep}$$

Esta es la dosis para un solo ratón. Esta cantidad, no obstante, no es realista a la hora de ser suministrada; no se dispone del equipamiento para suministrar una dosis así en volumen. Por ello, se propuso diluirla en agua pura hasta conseguir una dosis inyectable total (agua + heparina) de 0.1 mL , fácil de visualizar y administrar con una jeringuilla de insulina.

Teniendo en cuenta que tenemos 0.2 mL de heparina en total, la cantidad de agua pura para todas las dosis disponibles en ese volumen de heparina será:

$$\text{Número de dosis} = 0.2 \times 10^{-3} L_{hep} \text{ disponibles} \times \frac{1 \text{ dosis}}{2 \times 10^{-7} L_{hep}} = 1000 \text{ dosis}$$

Se necesitará:

$$0.1 \text{ mL dosis inyectable} - 2 \times 10^{-7} L_{hep} = 0.998 \text{ mL de agua pura}$$

$$1000 \times 0.998 \text{ mL} = 99.8 \text{ mL de agua pura}$$



107. Preparación y cálculo de la dosis.

ANEXO H: ANEXO DE CÓDIGOS

Código de Arduino:

ECG_read.ino



```
#define LOminus 12
#define LOplus 13
#define ECG A0
float t = 0.0;

void setup() {
  Serial.begin(9600);
  pinMode(LOminus, INPUT);
  pinMode(LOplus, INPUT);
}

void loop() {
  if ((digitalRead(LOminus) == 1) || (digitalRead(LOplus) == 1))
    Serial.println(1024/2);
  else
    //Serial.println("#"+String(t)+"#+analogRead(ECG)+"#");
    Serial.println(analogRead(ECG)); // borrar cuando funcione
    delay(1);
    t = millis();
}
```

Código de Python:

ECG_guardar.py



```
import serial, time
from io import open

arduino_com = serial.Serial('COM15', 9600)
time.sleep(1)
count = 0;

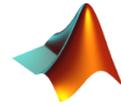
while count < 5000:

    lecturas = arduino_com.readline()# readline sent by Arduino
    print(str(lecturas)+'\r\n')
    fichero_texto=open("ECG_nombre.txt", "a")
    datosLista = str(lecturas).split('#')
    datosLista = datosLista[1:len(datosLista)-1]

    for dato in datosLista:
        fichero_texto.write(dato+'\t')
    fichero_texto.write('\n')
    cont+=1
    print(str(cont)+'\r\n')

    fichero_texto.close()

arduino_com.close()
```



```

%% ===== Limpieza de workspace y consola

clc; clear all; close all;

% Carga de datos
datos = load('ECG_Enrique.txt');
t = datos(1:end,1)/1000;
ECG = datos(1:end,2); % en este archivo ECG vienen en uV
ECG = ECG./1000;
threshold = 0.6;
duracion = t(end); %seconds

%% Análisis frecuencial
n = length(ECG);
Fs = n / duracion;
T = 1/Fs;
ECG_fft = fftshift(fft(ECG));
f = (-n/2:n/2-1)*(Fs/n);
Potencia = abs(ECG_fft).^(2/n);

% Finding R maxima
[pks, idx] = findpeaks(ECG);

for i=1:length(pks)
    if pks(i) > threshold
        loc(i) = idx(i);
    end
end

nzLoc = find(loc);
pks_loc = t(loc(nzLoc));
R_loc = ECG(loc(nzLoc));

% Mean magnitude of R peak
ECG_media = mean(ECG)
R_media = mean(R_loc)
R_media_magnitud = R_media - ECG_media

% Finding Heart Rate -- this will be done taking the points in time
for i=2:length(pks_loc)
    intervalo(i-1) = pks_loc(i)-pks_loc(i-1); % subtract the time
    between R peaks
end

intervalo_RR = mean(intervalo) % seconds / beat
pulsPorSeg = 1 / intervalo_RR;

% The approximated and real HR (RR interval)
PPM_calc = pulsPorSeg * 60 % in one minute
PPM_aprox = length(pks_loc) * 60 / duracion % based on number of peaks
through the recording

```

```

% Gráficas
figure;
hold on;
subplot(2,2,1:2);plot(t,ECG);grid;axis([0 10 0 0.95]); hold on;
xlabel('Tiempo (s)');ylabel('Señal cardíaca (mV)');title('ECG sujeto 2
- con pad');
plot(pks_loc,R_loc,'ro');
legend('ECG', 'Valores de R');

subplot(2,2,3);plot(t,ECG);grid; axis([2 3.8 0 0.95]);
xlabel('Tiempo (s)');ylabel('Señal cardíaca (mV)');title('ECG intervalo
RR');
legend(['Frecuencia Cardíaca ' num2str(PPM_calc) ' PPM']);

subplot(2,2,4);plot(f,abs(ECG_fft));grid;
xlabel('Frecuencia (Hz)');ylabel('ECG FFT');title('ECG FFT on 0');

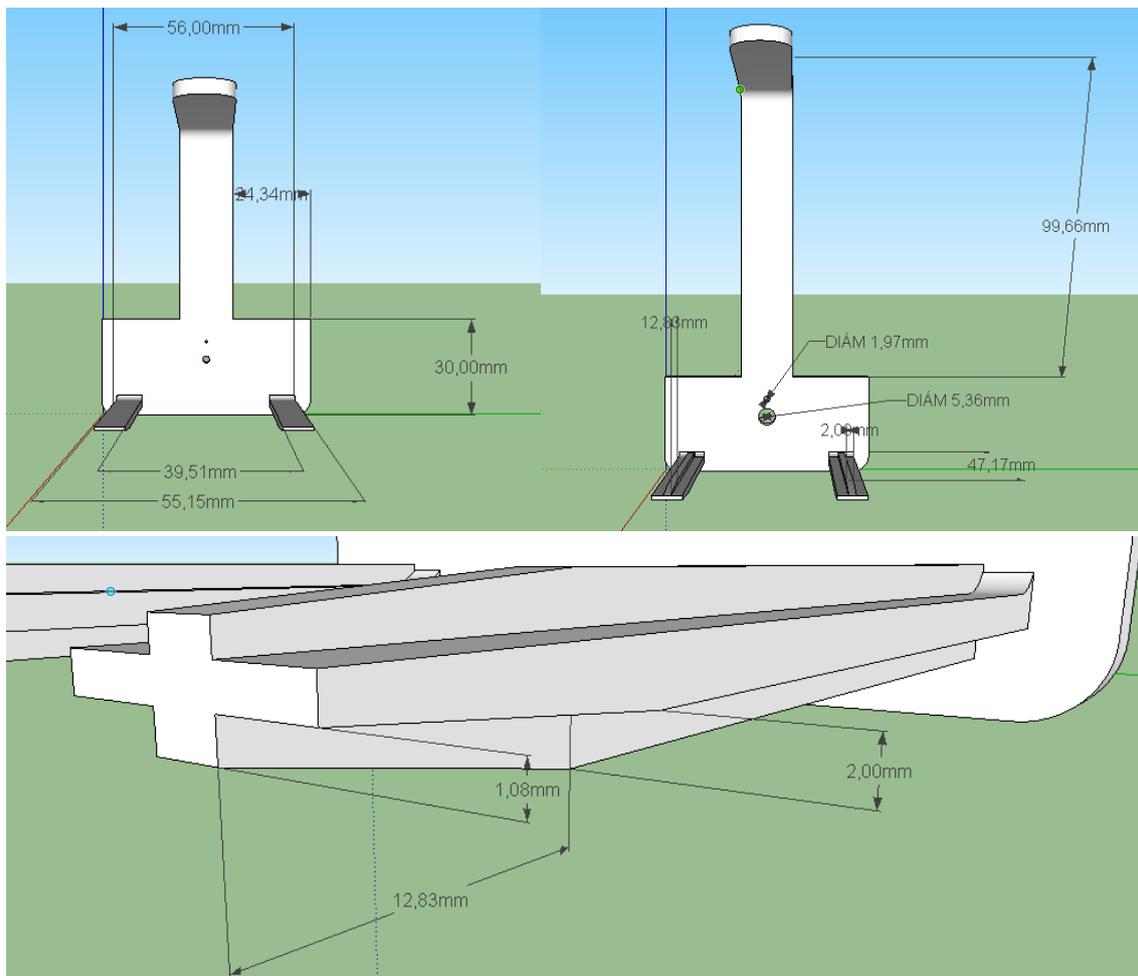
```

* Algunas variaciones en ECGexvivo.m para el tratamiento de la señal y filtrado.

ANEXO I: DISEÑO DEL SOPORTE 3D

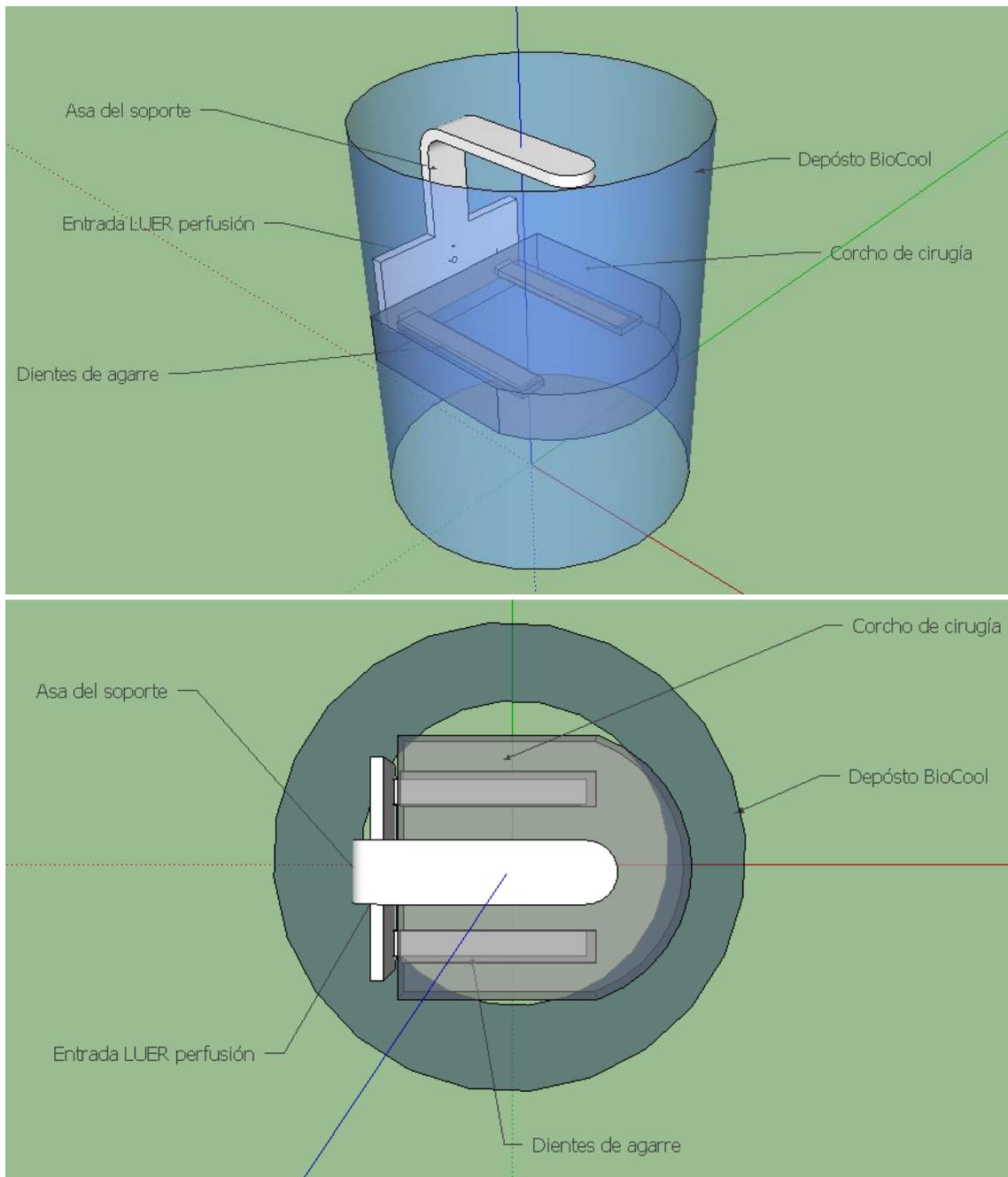
En el experimento de vitrificación de cerebro, se ha de sumergir la cabeza de animal en el depósito del BioCool para seguir la curva de enfriamiento. Esto ha de hacerse mientras que el ventrículo izquierdo es perfundido con una aguja, la cual no se debe mover de su sitio mientras transcurre la perfusión (aproximadamente 1 hora). Para fijar la aguja en su lugar, sostener el corcho que sujeta al animal y poder manipularlo con sencillez, se diseñó un soporte en programa de CAD (Google Sketchup Pro 2016).

La primera versión resultó tener el mango demasiado corto y las aletas que sujetaban el corcho eran excesivamente débiles. La versión 2 corrigió la debilidad al incluir transformar los dientes de perfil rectangular a uno en T, y se alargó el mango para poder sumergir el soporte a mayor profundidad. La versión 3 mejora los dientes de agarre al corcho con un perfil en cruz, y se agranda el orificio por el que pasará el tubo de perfusión.



108. Versiones 1, 2 y mejora en versión 3 del soporte.

Las pruebas de encaje y holguras se hicieron dentro del propio entorno de diseño, con las medidas del depósito y un modelo de corcho de sujeción del animal para comprobar los espacios. Se ofrecen las imágenes a continuación. Se muestra la v1, pues las v2 y v3 sólo crecen en la dirección Z.



109. Montaje genérico de prueba para el experimento.

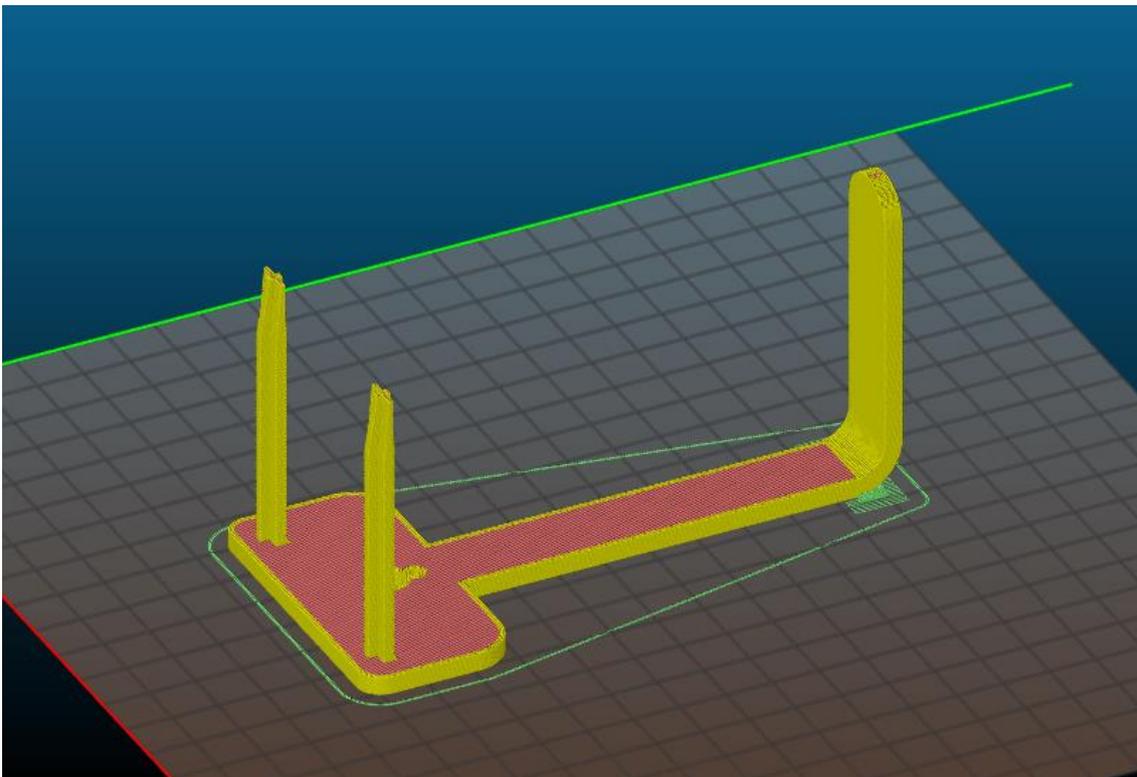
Se dejó un espacio de 3 cm para que el eje del agitador pudiera entrar sin colisionar con el soporte. Así podríamos mantener el agitador funcionando, a la vez que tenemos el soporte totalmente sumergido y siendo retenido en el lugar con la parte de abajo del cabezal del agitador.

La impresión del soporte se realizó con una impresora 3D propia, la Ender 3 de Creality. Para los parámetros de impresión se ofrece la siguiente tabla:

Tabla 31. Parámetros de impresión para el soporte.

Parámetros de impresión	Valor
Material	PLA
Temperatura de fusor (°C)	210
Temperatura de cama caliente (°C)	55
Diámetro de fusor (mm)	0.4
Velocidad de fusor (mm/s)	60
Altura de capa (mm)	0.2
Número de perímetros	3
Relleno	Rectilíneo al 10%

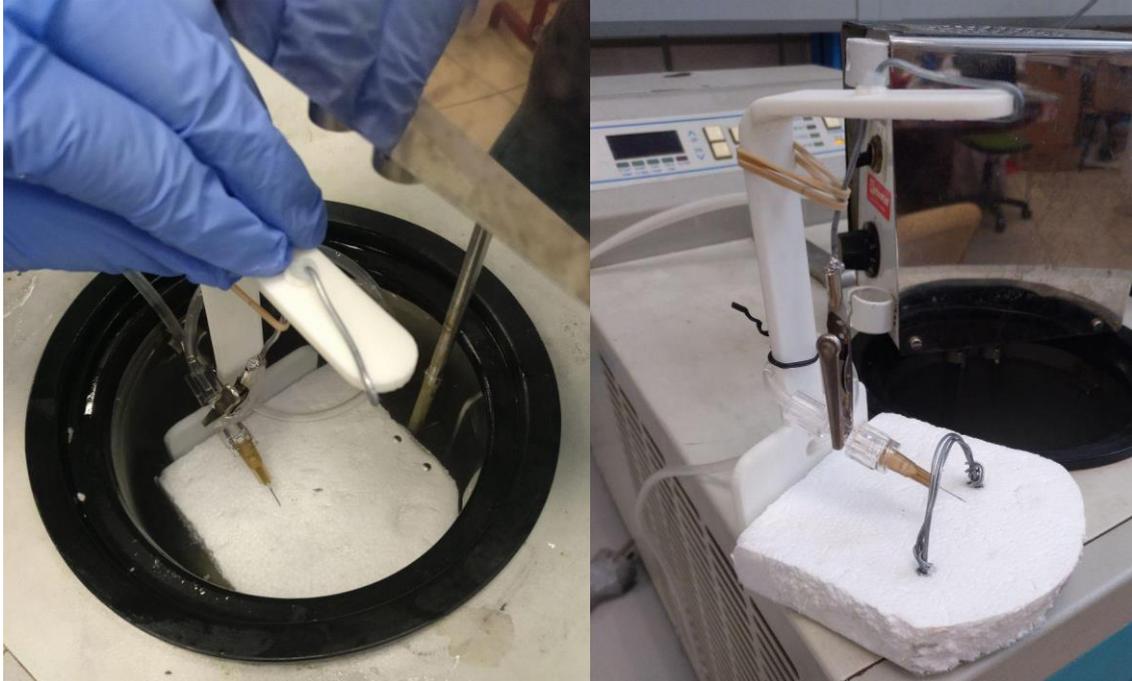
La disposición y orientación para la impresión (cortado en capas y visualizado en Slic3r) es la siguiente:



110. Impresión del soporte en Ender 3.

Se soldó y acopló el agarre en cocodrilo para la aguja, la cual estaba conectada a un tubo enrollado alrededor del asa del soporte. Así se podrá mantener sujeta a aguja. Se comprobó en la fase

experimental que conviene colocar un reposo para la cabeza del animal, con el fin de impedir movimientos de adelante hacia atrás (los demás estaban restringidos por el soporte). El montaje quedó como se muestra:

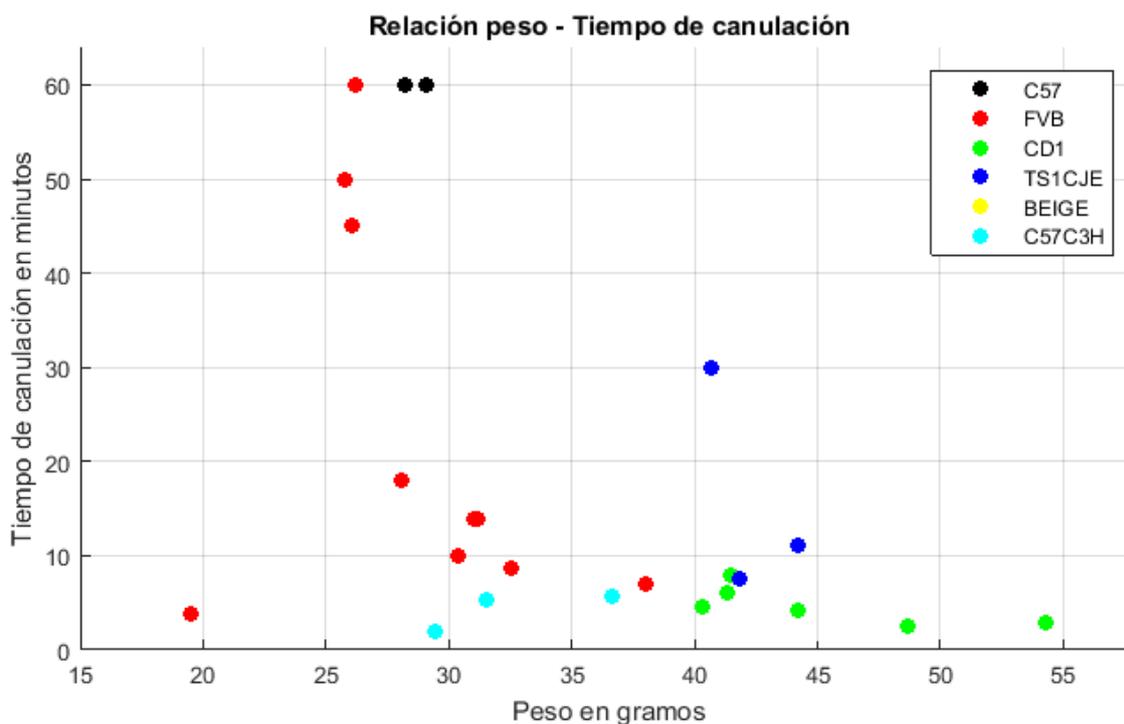


111. Resultado del soporte y prueba.

Durante la construcción, se comprobó que el conector LUER macho-macho del perfusor estaba defectuoso y tenía fugas. Se reemplazó con un nuevo conector fabricado en el laboratorio. Se colocó un aro de metal que rodearía el tórax del ratón, en primer lugar para proteger el corazón y la aguja de posibles colisiones, y en segundo lugar para ofrecer un agarre al termopar que se introduciría por la boca del animal hasta tocar la base del hueso esfenoideas, punto más cercano hasta el cerebro desde la boca.

ANEXO J: ANÁLISIS ADICIONAL DE DATOS

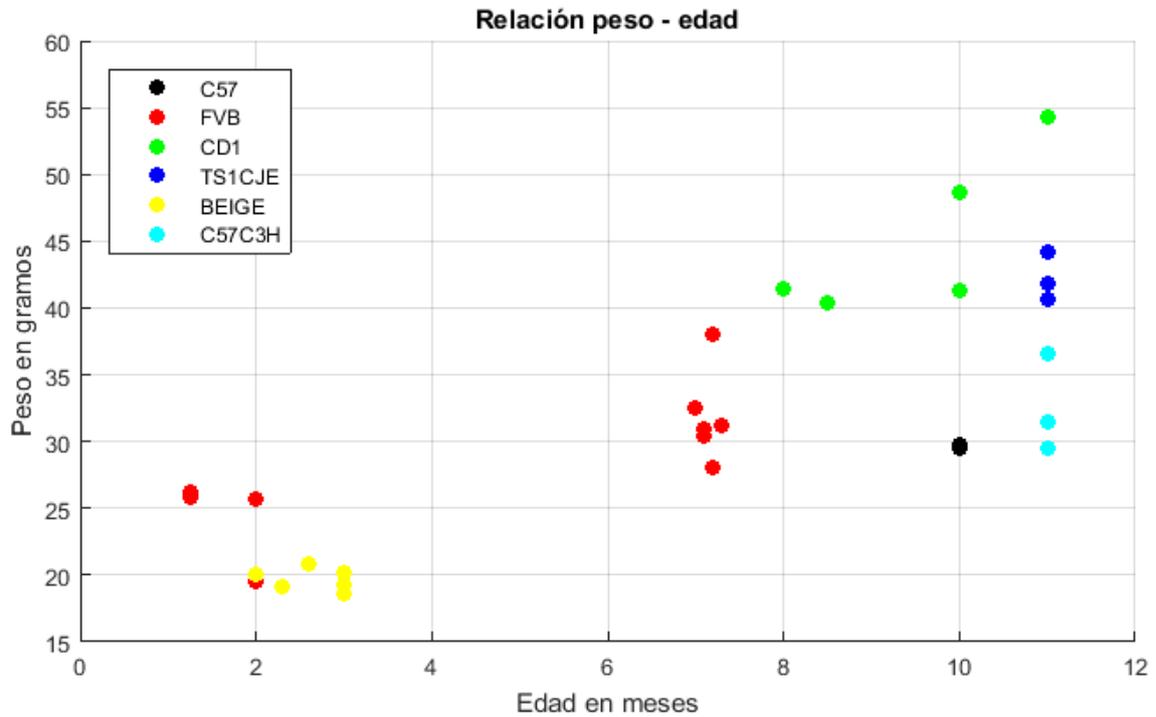
Con los datos obtenidos de los ratones, se pueden trazar comparaciones entre las variables de cada animal, observando qué influencia, si la hubiere, tienen unas sobre las otras. Se ofrecen a continuación las figuras:



112. Relación entre el peso del animal y el tiempo de canulación.

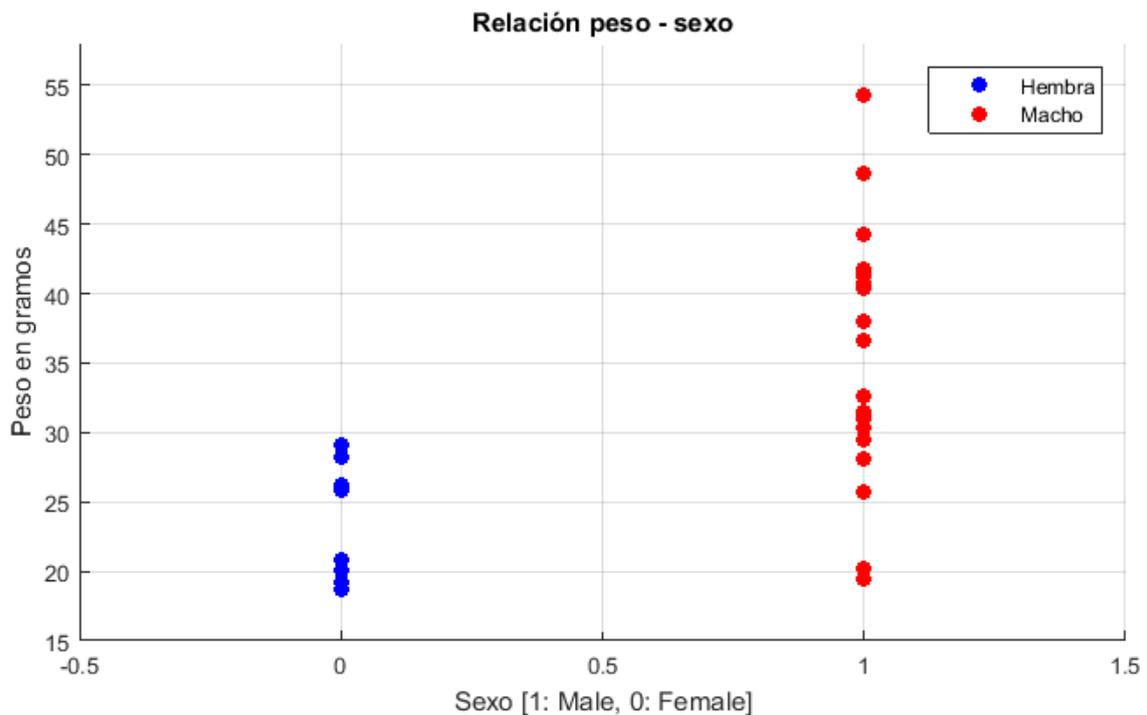
La figura se encuentra separando cepas por colores para hacer un estudio más detallado. Los ratones FVB presentaban una reducción en el tiempo de canulación en función de su tamaño, pues al aumentar su peso y su volumen aumentaba también el grosor de los vasos sanguíneos y facilitaba esto la canulación de la aorta. Los ratones CD1 también presentan una tendencia decreciente con el peso, aunque por lo general su tiempo de canulación fue bajo dado el gran tamaño y grosor de los vasos en esta cepa. TS1CJE mostraba gran variabilidad dada la alta presencia de contenido graso alrededor del corazón. C57-C3H por lo general es similar a CD1. C57 (negro) presenta los mayores tiempos de canulación al ser los primeros ensayos del experimento. Esto es algo interesante también, pues con la práctica se pudo perfeccionar la técnica aún con grosores arteriales pequeños y órganos rodeados de tejido adiposo.

Las figuras siguientes muestran datos de las cepas en función de su peso y su edad, o bien el peso del animal según su sexo. Se recogieron estos datos para, en futuros ensayos, poder tener un criterio para la elección de una cepa, edad y sexo específicos de los animales que se deseen para conformar nuestra n experimental con las mismas características. La variabilidad de parámetros es buena en una aproximación a la elaboración de una metodología, pero a la hora de realizar experimentos rigurosos se requiere de repetibilidad.



113. Relación edad - peso separado por cepas.

Las cepas CD1, TS1CJE, C57C3H y C57 fueron las que mayor peso presentaron en edad adulta. Al no disponer de ratones BEIGE y FVB de estas edades, se desconoce el peso que podrían alcanzar. Por lo general, Cd1 y FVB son las cepas favoritas para los experimentos.



114. Relación peso - sexo del animal.

REFERENCIAS

- Albiol Tortosa, B. (2019). *Diseño y aplicación de técnicas de vitrificación en equilibrio para la criopreservación de corazón y encéfalo de mus musculus*. Trabajo Fin de Grado, Universitat de Vich, Vich.
- Analog Devices. (s.f.). Single-Lead, Heart Rate Monitor Front End.
- Ávila-Portillo, L. M. (2006). FUNDAMENTOS DE CRIOPRESERVACIÓN - Basic points in cryopreservation. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291-300.
- Bell, R., Mocanu, M., & Yellon, D. (2011). Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 940-950.
- Fahy, G. M. (2009). Physical and biological aspects of renal vitrification. *Organogenesis*, 5(3), 167-175.
- Gibb, A., McNally, L., Riggs, D., Conklin, D., Bhatnagar, A., & Hill, B. (2016). Mice Are a Useful Model for Examining Cardiac Adaptations to Treadmill Exercise. *Frontiers in physiology*, 7, 636.
- Kaese, S. &. (2012). Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size. *Front. Physio*.
- Maas, J. (2018). Temperaturmessung. (T. B. Fachgebiet Elektromechanische Konstruktionen, Ed.) Alemania.
- Ortiz Serrano, J. M. (2019). *Desarrollo de sistemas de perfusión, criopreservación y valoración de corazón. Estudio experimental*. Trabajo Fin de Grado, Sevilla.
- Pérez Aguilar, Á. (2018). *Diseño e implementación de sistema de monitorización y control en temperatura y concentración de crioprotector para criopreservación de órganos*. Trabajo Fin de Máster, Sevilla.
- Risco, R. (2018). Recalentamiento de corazón vitrificado mediante el uso de HIFU y termografía por MRI, y validación de la tecnología de Radiofrecuencia para su uso en criopreservación (Ultrawarming).
- Roca i Acín, J. (2001). *La utilización de animales en experimentación biomédica (I)*.
- Sago, H., Carlson, E., Smith, D., Kilbridge, J., Rubin, E., Mobley, W., & Huang, T. (1998). Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities.
- Shuo-Tsung, C., Yuan-Jie, G., Huang-Nan, H., Woon-Man, K., Kuo-Kun, T., & Shu-Yi, T. (2014). Hiding Patients Confidential Data in the ECG Signal via Transform-Domain Quantization Scheme. *Journal of Medical Systems*, 38(54).

Shupeng, L., Minmin, X., Xiumei, C., & Junyi, H. (2007). The effect of laser acupuncture on hypoxia tolerance and inflammation reaction in mice with optical fiber acupuncture needle intra body. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 10(2).

Sociedad Española de Cardiología. (s.f.). ELECTROCARDIOGRAMA. (F. E. Cardiología, Ed.)

Suda, I., Kito, K., & Adachi, C. (1966). VIABILITY OF LONG TERM FROZEN CAT BRAIN IN VITRO. *Nature*, 268-270.

Tortora, G., & Derrickson, B. (2006). *PRINCIPIOS DE ANATOMIA Y FISIOLOGIA (11ª ED.)* (11ª ed.). PANAMERICANA - UNAM.

Universidad de Granada. (n. d.). DISOLUCIÓN DE GASES EN AGUA. PROCESOS ÁCIDO BASE Y.

University of Nottingham. (s.f.). Cardiology Teaching Package.

Welsch, J. (s.f.). *CD-1 Mice Versus C57BL/6 Mice*. (S. C. Laboratories, Editor)

