



Departamento de Tecnología Electrónica
Universidad de Sevilla

**VITRIFICACIÓN MEDIANTE
MICROCAPILARES, ULTRASONIDOS Y
MEDIDAS DE BIOIMPEDANCIA**

TESIS DOCTORAL

Alberto Olmo Fernández

Sevilla

Julio 2010

**VITRIFICACIÓN MEDIANTE
MICROCAPILARES, ULTRASONIDOS Y
MEDIDAS DE BIOIMPEDANCIA**

Memoria presentada para optar al título de
Doctor por la Universidad de Sevilla

Dr. D. RAMÓN RISCO DELGADO Profesor Titular del Departamento de Física Aplicada III de la Universidad de Sevilla y Dr. D. ALBERTO YÚFERA GARCÍA, Profesor Titular del Departamento de Tecnología Electrónica de la Universidad de Sevilla, como su director y tutor, respectivamente

HACEN CONSTAR:

Que esta memoria, titulada “**Vitrificación mediante microcapilares, ultrasonidos y medidas de bioimpedancia**”, presentada por D. Alberto Olmo Fernández, resume su trabajo de Tesis Doctoral y, considerando que reúne todos los requisitos legales, autorizan su presentación y defensa para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, Julio de 2010

Agradecimientos

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a Dr. D. Ramón Risco Delgado, director de esta Tesis Doctoral, por su amistad, entusiasmo y energía, por iniciarme en el mundo de la investigación en un tema tan atrayente como el de la criopreservación de material biológico, por haberme dirigido tan excepcionalmente y por darme la confianza necesaria para llegar hasta aquí. Sin su ayuda y apoyo este trabajo no habría sido posible.

También me gustaría agradecer a Dr. D. Alberto Yúfera García, tutor de esta Tesis Doctoral, su gran ayuda y contribución en el tema de la medida de bioimpedancia, y su supervisión en el desarrollo del trabajo presentado para la obtención del Diploma de Estudios Avanzado. Su amplia experiencia y conocimiento han sido fundamentales para iniciar la nueva línea de investigación que supone la medida de bioimpedancia para la monitorización de crioprotector en protocolos de criopreservación.

Fundamental también para la realización de este trabajo han sido los consejos y la experiencia del Dr. D. Javier Rosell y Dr. D. Pere Riu, del Departamento de Tecnología Electrónica de la UPB. Me gustaría agradecerles su hospitalidad y sus consejos para orientarnos en la medida de concentración de crioprotector.

También agradecer a la Universidad de York, al Dr. David Pegg y Dr. Martin Robinson su hospitalidad, y su ayuda en el tema de los microcapilares y del Liquidus-tracking, compartiendo todo su conocimiento y metodologías. Sin duda, hemos aprendido enormemente durante todos estos años al lado de uno de los grupos de investigación con más experiencia en el campo de la criopreservación en Europa y en el mundo.

Por supuesto, agradecer al Departamento de Tecnología Electrónica de la Universidad de Sevilla su apoyo para la realización del Diploma de Estudios Avanzado y la continuación de éste con la presente Tesis Doctoral.

Me gustaría también agradecer el interés y apoyo recibido en fechas recientes por parte de personalidades tan importantes en el mundo de la criopreservación como Dr. Gregory Fahy

(21CM) o, nuevamente, Dr. David Pegg. (Universidad de York). Confío en que como continuación del trabajo desarrollado puedan surgir colaboraciones internacionales con estos grupos de investigación para la criopreservación de tejidos u órganos. También agradecer a Dr. Tiantian Zhang (Univ. Luton) su interés en los resultados resumidos en esta memoria, en campos tan distintos como la utilización de ultrasonidos y medida de bioimpedancia en criopreservación.

Muchas gracias a la Society for Cryobiology, por la beca que recibí de ellos para el congreso CRYO-2010, donde presenté los últimos resultados de este trabajo, y por su gran hospitalidad. Gracias a todas las instituciones que han financiado esta investigación: a la Universidad de Sevilla, las becas Merck-Serono (2008) y al apoyo de la Junta de Andalucía (Proyectos de excelencia 2008).

A todas las personas del laboratorio de Física Aplicada III de la Universidad de Sevilla que han compartido conmigo algún momento durante el desarrollo de esta investigación, me gustaría agradecer su ayuda, su tiempo o el buen ambiente creado en el laboratorio. A Pablo con el tema de modelado de capilares, Rosario por los experimentos iniciales con capilares de cuarzo, Sandra con su ayuda en los experimentos de recalentamiento de capilares, Carmen con la medida del ángulo de entrada del capilar, Blanca por su ayuda con el modelado en COMSOL de la concentración de crioprotector, y a tantos otros que han compartido mañanas y tardes (incluso noches) en el laboratorio: Oliver, Juan, Aranzazu, Jaime, Cynthia, Bea, Esther, Marialu, Jose Antonio, Ari, David, Javi, y un largo etcétera.

Por último quisiera expresar mi agradecimiento a mis padres, a quienes tanta ilusión hace la presentación de esta Tesis Doctoral, por todo el apoyo que me han dado y siguen dando. A mi hermano (a quien le encanta asistir a las conferencias que presento de criopreservación) y a María, por su gran ayuda en la realización de este trabajo, por el tiempo dedicado y su gran paciencia. A ellos, especialmente, muchas gracias.

Índice

Capítulo 1. Introducción, objetivos y organización de la Tesis	8
Capítulo 2. Introducción a la vitrificación celular con altas velocidades de enfriamiento.....	11
Capítulo 3. Vitrificación mediante microcapilares	14
3.1 Microcapilares de cuarzo	14
3.2 Estudio teórico realizado. Interpretación de los resultados	17
3.2.1. Análisis de transferencia de calor en el proceso de enfriamiento.....	17
3.2.2. Análisis de formación de hielo en el proceso de enfriamiento	22
3.2.3. Resultados y discusión.....	23
3.2.4. Estudio del proceso de recalentamiento.....	25
3.3 Estudio experimental realizado. Mejora del método	27
3.3.1. Convección forzada	27
3.3.2. Ángulo de entrada.....	31
3.3.3. Proceso de recalentamiento.....	32
3.3.4. Microcapilares de otros materiales.	36
3.4 Conclusiones. Potencial del método de vitrificación celular mediante microcapilares... 37	
Capítulo 4. Introducción a la criopreservación de tejidos y órganos.....	40
Capítulo 5. Influencia de los ultrasonidos en la nucleación del hielo.....	47
5.1 Antecedentes	47
5.2.- Materiales y métodos.....	51
5.2.1. Estructura y configuración del Droplet Nucleation Analyzer.....	51
5.2.2. Nucleación en el Droplet Nucleation Analyzer	55
5.2.3. Equipamiento de ultrasonido	57
5.3. Experimentos y Resultados.....	58
5.3.1. Ultrasonidos aplicados durante el proceso de enfriamiento	58
5.3.2. Ultrasonidos aplicados antes del proceso de enfriamiento	62
5.4.- Discusión de los resultados.....	64
5.4.1. Ultrasonidos aplicados durante el proceso de enfriamiento	64
5.4.2. Ultrasonidos aplicados antes del proceso de enfriamiento. Explicación de los resultados de V. K. Lamer y R. Smith-Johannsen	67

Capítulo 6. Monitorización de la concentración de crioprotector mediante medidas de bioimpedancia.....	72
6.1. Modelo teórico del sistema célula- electrodo implementado	73
6.1.1 Interfaz electrodo - Solución iónica.....	74
6.1.2. Impedancia del material biológico.....	76
6.2. Simulaciones realizadas. Objetivos	77
6.2.1. Simulaciones iniciales en fibroblastos	78
6.2.2. Detección de perfusión de crioprotector en fibroblastos y monocapas de células madre mesenquimales	85
6.2.3. Influencia de la temperatura en las medidas de bioimpedancia.....	93
6.3. Conclusiones. Aplicaciones de la medida de bioimpedancia en criopreservación.....	95

Capítulo 1. Introducción, objetivos y organización de la Tesis

La criopreservación tiene como objetivo detener la actividad metabólica de las células mediante las bajas temperaturas, manteniendo la viabilidad y funcionabilidad celular. Esta técnica proporciona innumerables aplicaciones en campos como la medicina (transplantes de piel, córneas, huesos, válvulas, transfusiones sanguíneas), reproducción asistida, agricultura (semillas), ganadería, etc. En el futuro las aplicaciones serán mucho más espectaculares (transplantes de tejidos vascularizados, transplantes de órganos, biobancos, conservación de biopsias y sistemas biológicos para el estudio de enfermedades como el cáncer, ingeniería genética, etc.).

La criopreservación hace uso de las bajas temperaturas para ralentizar y detener las reacciones químicas responsables del deterioro celular, aunque factores como la formación de hielo, la deshidratación celular y la alta concentración de solutos o crioprotectores pueden alterar las membranas o los orgánulos celulares. El proceso de criopreservación de células aisladas está hoy día prácticamente resuelto, salvo algunas excepciones como oocitos o células madre, en los que es necesario conseguir un mayor porcentaje de supervivencia o conservar de forma más adecuada la funcionabilidad celular.

El proceso se complica en el caso de la criopreservación de tejidos u órganos, debido a numerosos factores adicionales como son la diversidad citológica, la formación de hielo extracelular, la conductividad térmica finita del medio, la lenta perfusión del crioprotector o el desconocimiento de la concentración de crioprotector o formación de hielo interior al órgano. En estos casos, la solución adecuada está más lejos de encontrarse, aunque se han conseguido algunos resultados esperanzadores con la criopreservación de determinados tejidos o incluso órganos completos en animales.

Esta Tesis Doctoral parte con el objetivo de abordar tanto la criopreservación celular (mejorando las técnicas actuales para lograr la criopreservación de los tipos celulares todavía hoy día difíciles de criopreservar) como la criopreservación de tejidos y órganos, aportando ideas nuevas que permitan acercarnos a dicho objetivo final. Bajo este título: “Vitrificación

mediante microcapilares, ultrasonidos y medidas de bioimpedancia” se resumen las distintas técnicas de criopreservación de material biológico investigadas, en distintos ámbitos de aplicación. El nexo de unión común de las distintas técnicas es el intento de evitar la formación de hielo en el proceso de enfriamiento, lo que se conoce con el nombre de vitrificación. A continuación se comentan brevemente dichas técnicas, tratando de explicar con ello el título escogido para esta Tesis Doctoral y la estructuración de la misma.

En primer lugar, la vitrificación con altas velocidades de enfriamiento es la técnica de criopreservación celular y de material biológico de pequeños volúmenes más empleada e investigada en la actualidad, en especial para la conservación de aquellos tipos celulares difíciles todavía de criopreservar. Los factores clave que influyen en el éxito de este proceso son el incremento del ritmo de enfriamiento y calentamiento de la muestra biológica, el incremento en la viscosidad de la muestra (mediante el empleo de crioprotectores) y la reducción del volumen a vitrificar. En el capítulo 2 se presenta una introducción al estado del arte de las tecnologías existentes para conseguir dicha vitrificación con altas velocidades de enfriamiento y recalentamiento. El trabajo teórico y experimental realizado con **Microcapilares** para conseguir la vitrificación, primera parte del título, se desarrolla en el capítulo 3, partiendo de los trabajos originales realizados en 2004 en el Massachusetts General Hospital, hasta las últimas mejoras presentadas en 2010.

La vitrificación conseguida durante el desarrollo de esta Tesis mediante la tecnología de microcapilares han dado lugar a las mayores velocidades de enfriamiento conocidas, con la consiguiente reducción en la concentración de crioprotector, obteniendo excelentes resultados en la conservación de oocitos y consiguiendo la vitrificación del mayor organismo pluricelular hasta la fecha, un *C. Elegans* adulto. El grado de madurez de estas tecnologías es tal que las metodologías y técnicas desarrolladas han sido protegidas con 2 patentes, una registrada y otra en proceso de registro.

La estrategia para la criopreservación de tejidos y órganos es necesariamente distinta a la criopreservación de volúmenes pequeños, puesto que conforme la muestra aumenta de tamaño la formación de hielo constituye un problema mayor que en el caso de células aisladas. Como se ha dicho anteriormente, la diversidad citológica, la conductividad térmica finita del medio o la lenta perfusión del crioprotector son factores a tener en cuenta. En el capítulo 4 se

resumen los últimos logros conseguidos y las actuales líneas de estudio en criopreservación de tejidos y órganos. En esta Tesis Doctoral se ha abordado también el gran reto de la conservación de tejidos y órganos, abriendo novedosas líneas de investigación y aportando interesantes resultados.

En primer lugar se ha estudiado la influencia de las ondas de **Ultrasonidos** en la nucleación del hielo, con el objetivo de evitar la formación de hielo en el proceso de enfriamiento de tejidos y órganos y conseguir con ello la adecuada vitrificación de las muestras biológicas. Dichos estudios, que constituyen la segunda parte del título, pueden contribuir a la mejora de los procesos de vitrificación, añadiendo un nuevo efecto para retrasar la formación de hielo con las bajas temperaturas. En el capítulo 5 se explica la metodología desarrollada y los resultados conseguidos, publicados en *International Journal of Refrigeration*, y en *Cryobiology*.

Una segunda estrategia para evitar la formación de hielo en tejidos y órganos ha consistido en el estudio de la mejora de los procesos de vitrificación con una monitorización más adecuada de la cantidad de crioprotector que entra en el material biológico en cada instante, utilizando para ello **Medidas de Bioimpedancia**. Mediante un control adecuado de la concentración de crioprotector se puede conseguir bajar la temperatura del órgano a temperaturas criogénicas, sin necesidad de utilizar altas velocidades de enfriamiento, y evitando los efectos negativos de la toxicidad de crioprotectores. Las medidas de bioimpedancia pueden ser una solución válida para caracterizar la concentración de crioprotector interior a un tejido u órgano. Esto explica la tercera y última parte del título, vitrificación mediante medidas de bioimpedancia, desarrollado en el Capítulo 6, cuyos resultados han sido presentados a recientes congresos (BIODEVICES 2010, CRYO2010 y IEEE EMBC 2010 (IEEE Engineering on Medical and Biological Conference)).

En esta memoria se describen estos avances de forma breve y concisa, adjuntando como anexos las nombradas patentes, artículos en revistas y presentaciones en congresos. Terminada esta Tesis Doctoral se pueden citar importantes éxitos y avances conseguidos, pero aún más importante son las nuevas líneas de investigación abiertas, nuevos retos y nuevas oportunidades de colaboración internacional, que nos acerquen cada vez más al problema de la conservación de tejidos y al problema final de la criopreservación de órganos.

Capítulo 2. Introducción a la vitrificación celular con altas velocidades de enfriamiento.

Dos técnicas son las que actualmente se han desarrollado, con multitud de variantes, con el objetivo de conseguir la criopreservación celular: el enfriamiento lento y la vitrificación.

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

Durante el enfriamiento lento, las células se enfrían por debajo de su punto de congelación y el hielo se siembra en los medios extracelulares. Como el hielo se forma en el medio extracelular, se lleva a cabo un aumento progresivo de la concentración de soluto externa. Consecuentemente, la célula se deshidrata, y se evita la formación de hielo intracelular. Sin embargo esta técnica conlleva algunas desventajas: se piensa que la lesión de la célula es debida a los efectos de las soluciones intracelulares y extracelulares altamente concentradas y/o a las interacciones mecánicas entre la célula y el hielo. Otra desventaja del enfriamiento lento radica en sus limitaciones prácticas: el enfriamiento lento requiere que sean controladas tanto la tasa de enfriamiento como la temperatura de sembrado, una desventaja adicional que puede ser la responsable de los resultados altamente variables de esta técnica.

En los últimos años ha aparecido otra técnica, la vitrificación, que mejora en gran medida la técnica del enfriamiento lento, pues elimina completamente la formación de cristales de hielo, los cuales suponen el mayor obstáculo para la criopreservación de células vivas. Actualmente, se considera la vitrificación como el futuro de la criopreservación celular [1]. Sin embargo, la técnica todavía necesita ser mejorada para muchos tipos celulares, como por ejemplo oocitos, en los que su vitrificación y posterior fertilización ha resultado hasta el momento un número muy bajo de nacimientos de niños [2]. La vitrificación de células madre, otro de los tipos celulares más interesantes de criopreservar, de un gran potencial para la medicina regenerativa, apenas ha empezado a llevarse a la práctica [3] y una gran experimentación será necesaria antes de que pueda ser utilizada eficientemente.

La vitrificación es un proceso mediante el cual un líquido se solidifica en una fase no cristalina (fase vítrea) con un rápido descenso de la temperatura y un aumento en la viscosidad. Varios factores afectan la probabilidad de conseguir una adecuada vitrificación: viscosidad de la muestra, ritmo de enfriamiento y calentamiento, y volumen de la muestra [4].

Con el objetivo de incrementar la viscosidad de la muestra se utilizan los llamados agentes vitrificantes, también llamados crioprotectores, por su relación con la protección celular. Con algunos de ellos, como el dimetilsulfóxido o el etilenglicol se han conseguido buenos resultados [5],[6]. Sin embargo, las altas concentraciones necesarias de estos agentes crioprotectores para alcanzar la vitrificación resultan en una alta toxicidad que impide su viabilidad en muchos protocolos de criopreservación celular.

El incremento del ritmo de enfriamiento y calentamiento aumenta la probabilidad de una adecuada vitrificación, y hace necesario unas menores concentraciones de agentes crioprotectores. La técnica más usada para conseguir altas velocidades de enfriamiento ha sido la inmersión de la muestra en nitrógeno líquido. Es necesario conseguir una eficiente transmisión de calor entre el nitrógeno líquido y el material celular, para maximizar la velocidad de enfriamiento.

Con este objetivo, diferentes contenedores han sido aplicados para introducir células en nitrógeno líquido, entre las que encontramos rejillas de cobre utilizadas en microscopía electrónica [7], capilares OPS [8] (Open Pulled Straws, capilares de PVC convencionales estirados hasta tener un diámetro interior de 0.800 mm y un espesor de la pared de 0.075 mm) o los llamados cryoloops [9], lazos de nylon en los que se suspende una película de solución conteniendo las células. Sin embargo, la velocidad de enfriamiento conseguida mediante estos procedimientos necesita aún una alta concentración de crioprotectores para producir la vitrificación [1]. Para conseguir unos mejores resultados en la vitrificación se puede utilizar nitrógeno líquido subenfriado, llamado “*slush*”, el cual está a una temperatura de -210° C, inferior al nitrógeno líquido, y en el que se consigue disminuir el efecto Leidenfrost (formación de una capa de vapor alrededor de la muestra que impide una eficiente transferencia de calor). La introducción de los contenedores celulares anteriormente nombrados en *slush* suponen una velocidad de enfriamiento de 10.000°C/min o unos 20.000°C/min (dependiendo del autor,

[10],[11] para OPS, y similares resultados para el caso de cryoloops [12] o rejillas de cobre [13]), resultados que, aunque interesantes, siguen sin ser suficientes para conseguir una adecuada vitrificación para muchos tipos celulares.

La probabilidad de una adecuada vitrificación depende, finalmente, del volumen de la muestra. Minimizando el volumen de la muestra se consigue minimizar la cantidad de líquido susceptible de nucleación, y por lo tanto se aumentan las probabilidades de una correcta vitrificación. Con esta filosofía, muy relacionada también con la maximización de la velocidad de enfriamiento comentada anteriormente, nacieron las “técnicas de mínimo volumen”, como Cryotop [14] o, más recientemente, CryoTip [15], que han cosechado algunos éxitos en vitrificación de tipos celulares complicados de criopreservar. Sin embargo, la dificultad para manejar la muestra en dichos contenedores (en el caso de Cryotop), o la necesidad de velocidades de enfriamiento más elevadas (12.000°C/min en el caso de CryoTip, y ligeramente mayores en el caso de Cryotop) hacen necesario la invención de nuevos procedimientos.

En 2004 se probó en el Massachussets General Hospital, en colaboración con Harvard-MIT un nuevo tipo de procedimiento para la vitrificación celular. El procedimiento, publicado por Dr. Ramón Risco et al. [16] logró velocidades de enfriamiento muy superiores a las obtenidas en técnicas anteriores, sirviendo como punto de partida para las posteriores mejoras y nuevas tecnologías desarrolladas en esta Tesis Doctoral.

Capítulo 3. Vitrificación mediante microcapilares

3.1 Microcapilares de cuarzo

La tecnología de microcapilares desarrollada en esta Tesis Doctoral surge en el Massachussets General Hospital, con un procedimiento publicado por Dr. Ramón Risco et al. [16], resumido a continuación.

El proceso de vitrificación consistía en la utilización conjunta de microcapilares de cuarzo, usados normalmente para análisis de difracción de rayos X, como contenedor celular, introducidos en nitrógeno líquido slush (obtenido a partir del cambio de fase de nitrógeno líquido).

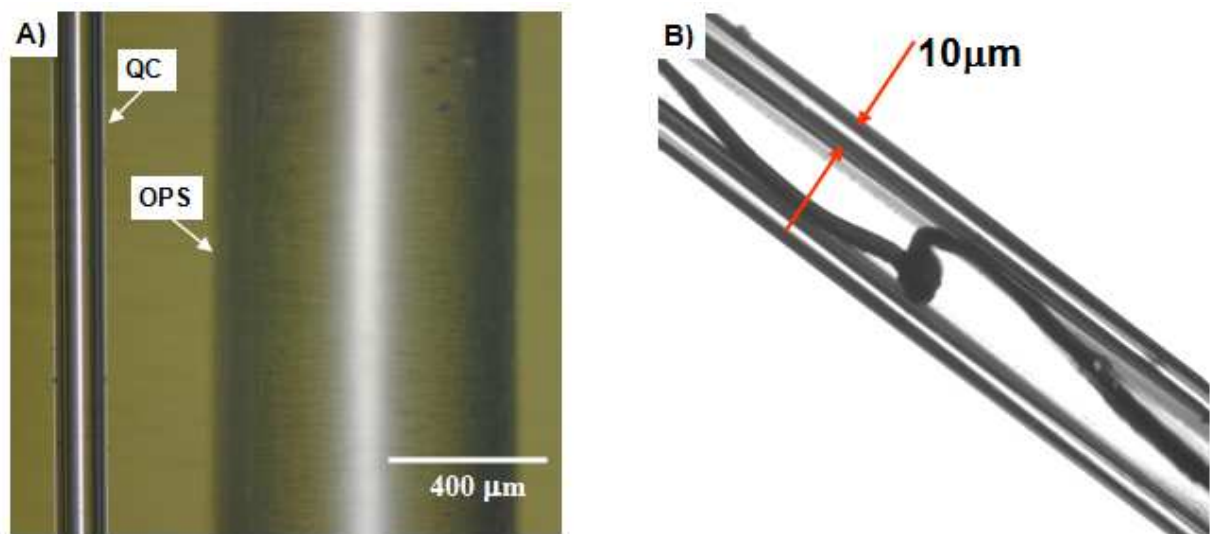


Fig. 1. (A) Comparación entre el tamaño de QC (izquierda) y OPS (derecha). El QC tiene 0.180mm de diámetro interior y 0.010mm de espesor de pared. Esta diferencia geométrica con los OPS tiene consecuencias no solamente en la eficacia de la transferencia térmica sino también en la probabilidad de nucleación del hielo. Las diferencias en el grueso de pared y el material del que están hechos son también muy importantes. (B) Detalle de la unión del termopar dentro del QC.

En el trabajo experimental de Risco et al. fueron comparadas las velocidades de enfriamiento y recalentamiento obtenidas en el caso de los OPS convencionales y de la nueva

tecnología de capilares de cuarzo (QC) + slush. Se comprobó la mejora substancial en estas velocidades obtenida al utilizar QC y nitrógeno slush, alcanzando la vitrificación con una solución no tóxica y de baja concentración, 1.5 M de propanodiol y 0,3M de sacarosa, típicamente no vitrificable, empleada tradicionalmente en “slow freezing” de ovocitos. En la siguiente figura se muestran las historias térmicas completas de OPS y QC, introducidas en nitrógeno líquido y nitrógeno slush, durante un ciclo entero incluyendo enfriamiento y recalentamiento. Se observa la presencia de cristalización del hielo y la fusión de la solución en el caso tradicional de OPS, no presente en el caso de QC, una indicación indirecta de su vitrificación.

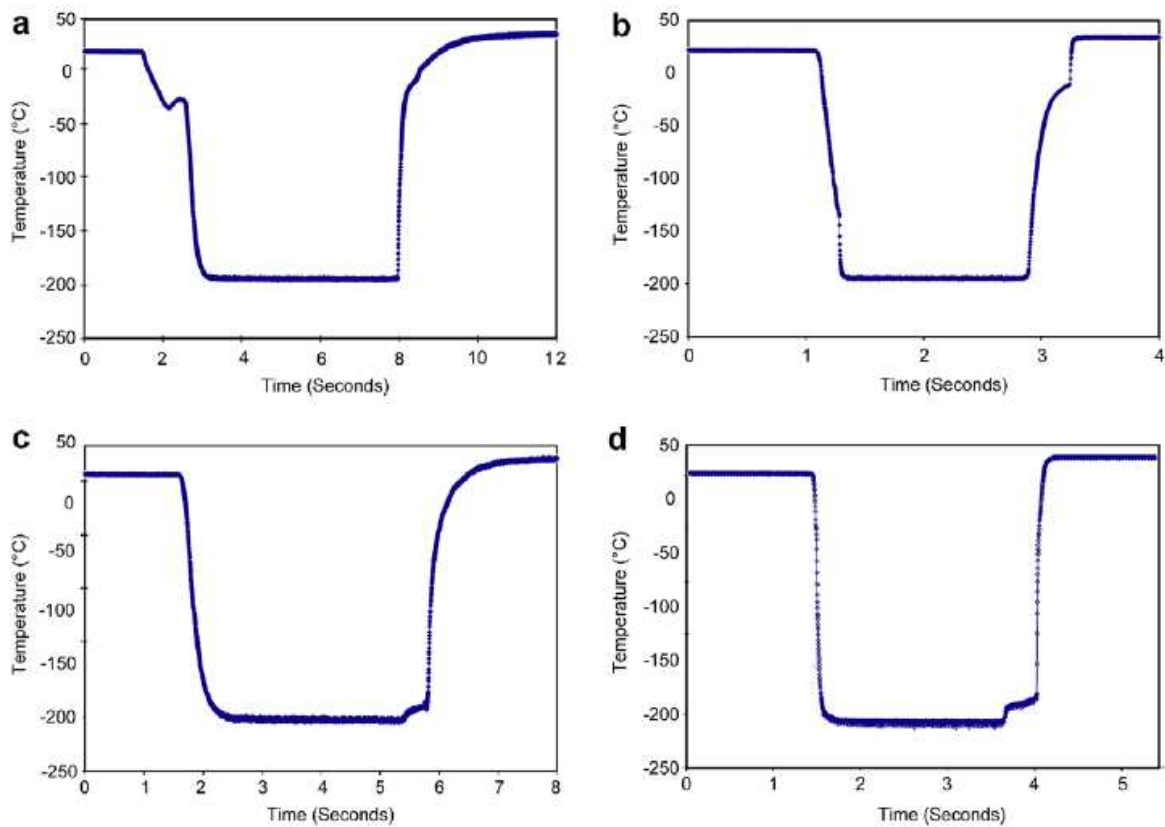


Fig. 2. Historias térmicas en los experimentos realizados por R. Risco et al. a) OPS en LN2 b) QC en LN2 c) OPS en SN2 d) QC en SN2. El capilar se introduce en los cuatro casos en el medio criogénico, se mantiene unos segundos y finalmente es extraído y llevado a temperatura ambiente. Se observa la cristalización de la muestra en el caso a) y las altas velocidades de enfriamiento y recalentamiento obtenidas en el caso d).

En las siguientes gráficas se muestran las velocidades medias de enfriamiento y recalentamiento obtenidas en los 4 casos estudiados, observándose nuevamente la mejora que supone la utilización de capilares de cuarzo y nitrógeno slush.

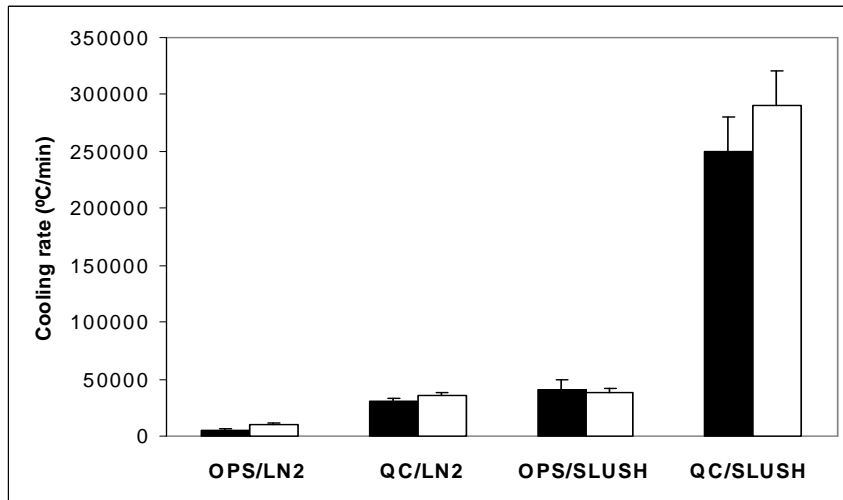


Fig. 3. Velocidades de enfriamiento al criopreservar la muestra dentro de OPS o QC en nitrógeno líquido o nitrógeno slush. Las barras negras son las velocidades de enfriamiento medidas entre 20 °C y -150 °C. Las blancas son las velocidades de enfriamiento medidas entre -20 °C y -150 °C.

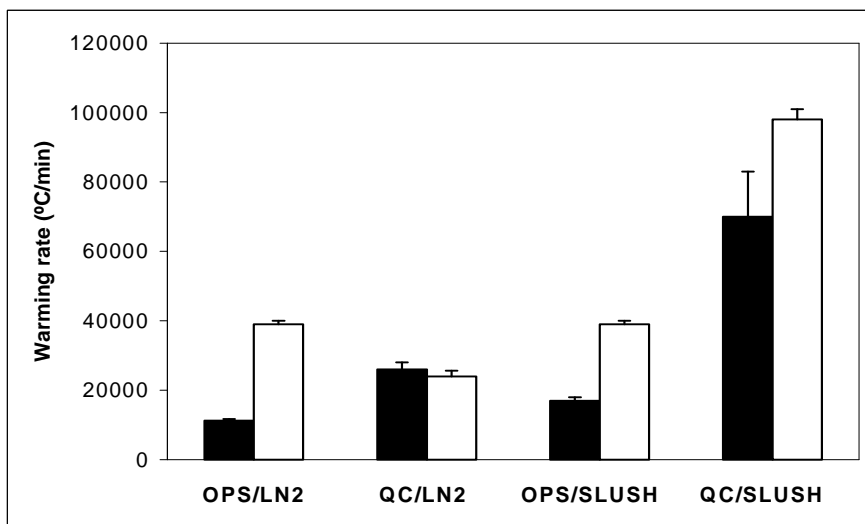


Fig. 4. Velocidades de recalentamiento para OPS y QC cuando se sumergen en un baño de agua a 37 °C después de haber sido introducido en nitrógeno líquido o slush. Las barras negras son velocidades de recalentamiento desde -150 °C a 20 °C. Las barras blancas son velocidades de recalentamiento desde -150 °C a -20 °C. Las ventajas del recalentamiento del QC desde el nitrógeno slush son obvias, considerando la importancia de alcanzar altas velocidades de recalentamiento para evitar la desvitrificación o la recristalización. En el caso del nitrógeno

líquido, la velocidad de recalentamiento para OPS es más alta que para QC (barras blancas) porque el grado de formación de hielo (con una alta difusividad térmica) es mucho más grande en el OPS que en el caso del QC.

Estudios anteriores han intentado alcanzar altas velocidades de enfriamiento y recalentamiento para la vitrificación celular. Sin embargo, ninguno de ellos consiguió las altas velocidades conseguidas en el trabajo de Risco et al., con las consiguientes bajas concentraciones de CPA (1.5 M).

En esta Tesis se analizaron los resultados obtenidos, estudiando en profundidad el procedimiento y proponiendo mejoras sobre el mismo, que permiten elevar aún más las velocidades de enfriamiento y recalentamiento, utilizando concentraciones menores y menos tóxicas de CPA. En el resto del capítulo se exponen las mejoras aportadas a la tecnología, partiendo de un estudio teórico inicial realizado sobre los resultados experimentales comentados.

3.2 Estudio teórico realizado. Interpretación de los resultados

En este apartado se realiza un estudio teórico de la transferencia de calor y de la formación de hielo en los resultados experimentales de Risco et al. [16] (capilares OPS y de cuarzo introducidos en nitrógeno líquido y slush), que supone la base y el punto de partida en la propuesta de nuevas mejoras y avances en la tecnología.

3.2.1. Análisis de transferencia de calor en el proceso de enfriamiento

Para realizar el análisis de transferencia de calor en el enfriamiento de capilares se han utilizado dos modelos: un modelo analítico y otro numérico.

A. Modelo analítico

La teoría de transferencia de calor por conducción establece que si el número de Biot es pequeño ($Bi \leq 0.1$), entonces los gradientes de temperatura dentro del cuerpo son pequeños o despreciables [17]. En este enfoque la temperatura en cualquier punto del cuerpo de la muestra Ω es aproximadamente igual a una temperatura media $\langle T \rangle$ (modelo lumped capacitance), definida como:

$$\langle T \rangle = \frac{\int_{\Omega} T dV}{\int_{\Omega} dV}. \quad (2)$$

Un balance de energía global en el cuerpo, donde la pérdida de calor en la superficie por convección con el medio criogénico es la tasa cambio de la energía interna, nos da la variación de temperatura en el tiempo:

$$\langle T(t) \rangle = T_{\infty} + (\langle T(t=0) \rangle - T_{\infty}) \exp\left(-\frac{\left(\frac{1}{h} + \frac{e}{k_{cont}}\right) t}{\rho_s c_{p,s} L_c}\right), \quad (3)$$

donde ρ_s y $c_{p,s}$ son la densidad y la capacidad calorífica específica de la solución, L_c la longitud característica definida como el ratio entre el volumen del cuerpo y su superficie ($r/2$ para un cilindro de radio r), h el coeficiente convectivo, e el espesor del contenedor y k_{cont} la conductividad térmica del contenedor. La temperatura inicial es $\langle T(t=0) \rangle = 293$ K, y T_{∞} es la temperatura del medio criogénico.

B. Modelo numérico

Se utilizó COMSOL Multiphysics software para resolver el problema de transferencia de calor. La muestra fue modelada como indica la siguiente figura, donde el cilindro interior representa la solución y el cilindro exterior representa el contenedor. Se supuso continuidad dentro de los sub-dominios. Por tanto la simulación numérica considera un campo térmico interno que no tiene en cuenta el modelo de “lumped capacitance”. El modelo matemático para la transferencia de calor por conducción se muestra en la ecuación 4.

$$\rho_j c_{p,j} \frac{\partial T}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(k_j r \frac{\partial T}{\partial r} \right), \quad (4)$$

donde el subíndice j representa o la solución acuosa o el contenedor. La condición de contorno en la superficie exterior era la de transferencia de calor convectiva entre la frontera externa del contenedor y el medio criogénico a una temperatura fija T_∞ .

$$-k_k \left. \frac{\partial T}{\partial r} \right|_{r=r_E} = h (T_{r=r_E} - T_\infty). \quad (5)$$

Cambios de fase

El calor latente liberado en la congelación cuando hay cambio de fase debe ser considerado a la hora de calcular la capacidad calorífica específica e introducirla en las expresiones anteriores. Para ello, utilizamos el método de la capacidad de calor efectiva, la más precisa para simulaciones numéricas [18]. En ella se aproxima la capacidad calorífica específica de la solución como sigue:

$$c_{p,s}(T) = \begin{cases} c_{p,ice} = 2.1 \frac{kJ}{(kg K)}, & T < 268 K \\ c_{eff} = 171 \frac{kJ}{(kg K)}, & 268 K \leq T \leq 270 K \\ c_{p,w} = 4.18 \frac{kJ}{(kg K)}, & 270 K < T \end{cases} \quad (11)$$

Coefficientes de transferencia de calor

La elección de los coeficientes de transferencia de calor también es fundamental en el estudio teórico del enfriamiento de capilares.

Nitrógeno líquido

Para el enfriamiento de capilares OPS y QC en nitrógeno líquido se tuvo en cuenta la formación de la capa de Leidenfrost, capa de vapor formada alrededor de la muestra (el contenedor), al ser introducida en nitrógeno líquido. Cuando las burbujas formadas se desprenden fácilmente del contenedor se produce un muy eficiente proceso de convección por cambio de fase. Sin embargo, en el momento en el que se han producido demasiadas burbujas,

éstas forman una capa de vapor alrededor de la muestra, dificultando la transferencia de calor [19].

Necesitamos comparar el tiempo de respuesta del sistema con el tiempo de formación de las burbujas, para estudiar en el caso de los OPS y los QC en qué régimen calcular el coeficiente convectivo. El tiempo de respuesta se define como $t_r=L_c^2/\alpha$ [17], donde L_c es la longitud característica del contenedor y α la difusividad térmica $L_c^{OPS}=2.37\cdot 10^{-4}$ m, $L_c^{QC}=5\cdot 10^{-5}$ m, y $\alpha^{OPS}=\alpha^{QC}=10^{-7}$ m. Por lo tanto, el tiempo de respuesta para OPS y QC es $t_r^{OPS}=0.5$ s y $t_r^{QC}=0.02$ s respectivamente.

El tiempo de formación de burbujas se puede obtener de la siguiente expresión [20]:

$$t_{bf} = \frac{1}{f} \sim \frac{\sqrt{\frac{\sigma}{g(\rho_l - \rho_v)}}}{\left(\frac{\sigma g(\rho_l - \rho_v)}{\rho_l^2}\right)^{1/4}} \sim 0.01 \text{ s} \quad (13)$$

donde ρ_l y ρ_v son las densidades del líquido y el vapor, respectivamente, σ es la tensión superficial y g la gravedad. Comparando el tiempo de respuesta del sistema t_r con el tiempo de formación de burbujas t_{bf} , encontramos que $t_{bf} < t_r$ para ambos contenedores. Por lo tanto podemos asumir que la transferencia de calor tiene lugar principalmente en régimen de convección forzada por cambio de fase.

El coeficiente convectivo en régimen de convección por cambio de fase (ebullición) puede ser estimado con la siguiente expresión [17] [19]:

$$h_{\min}^{\frac{1}{4}} = \left(\frac{g(\rho_l - \rho_v)\rho_v k_b^3 h_{fg}^*}{D \mu_v \Delta T_{\min}} \right)^{\frac{1}{4}} \quad (15)$$

$$h_{fg}^* = h_{fg} + 0.8 c_{p,v} \Delta T_{\min}$$

donde k_v es la conductividad térmica del vapor, h_{lg} es la entalpía de vaporización, D es el diámetro exterior del contenedor, μ_v es la viscosidad del vapor, ΔT_{min} es el sobrecalentamiento en el punto de Leidenfrost y $c_{p,v}$ es el calor específico isobárico del vapor de nitrógeno.

Los correspondientes coeficientes convectivos para este régimen convectivo son $h_{min}^{OPS}=385 \text{ W}/(\text{m}^2 \text{ K})$ y $h_{min}^{QC}=560 \text{ W}/(\text{m}^2 \text{ K})$.

Nitrógeno slush

El uso de nitrógeno slush (fase subenfriada sólido-líquido) hace que no se forme una capa de vapor, debido al hecho de que esta transferencia de calor causa la descongelación de las partículas sólidas, restringiendo la aparición de burbujas de vapor.

El tiempo de introducción del capilar en el contenedor de slush es ahora importante de determinar, ya que nos permitirá diferenciar entre regímenes de convección libre y forzada. Este tiempo, basándonos en el conocimiento que tenemos del setup original que se utilizó en los experimentos, fue estimado en $t_q=0.02 \text{ s}$.

Comparando este tiempo con los tiempos de respuesta mostrados anteriormente para el caso de los OPS ($t_r^{OPS}=0.5 \text{ s}$), tenemos que la convección libre domina la transferencia de calor, ya que el tiempo de respuesta es mayor que el tiempo de introducción, y por tanto el capilar llega a su posición final en el contenedor antes de que el sistema empiece a reaccionar. En este caso el proceso se rige por la siguiente correlación, donde Ra es el número de Rayleigh [17]:

$$\frac{h_{SN_2}^{OPS} D_{OPS}}{k_{SN_2}} = 0.6 Ra_{D_{OPS}}^{0.25} \quad (16)$$

En el caso de los capilares de cuarzo, el tiempo de respuesta es del mismo orden de magnitud que el tiempo de introducción ($t_r^{QC}=t_q\sim 0.02 \text{ s}$), por lo que es asumido que la

convección forzada rige el proceso de transmisión de calor. El coeficiente de transferencia de calor se obtiene de la siguiente correlación, donde Re y Pr son los números de Reynolds y Prandtl respectivamente [17]:

$$\frac{h_{SN2}^{QC} D_{QC}}{k_{SN2}} = 0.2 Re_{D_{QC}}^{0.8} Pr_{SN2}^{0.33} . \quad (17)$$

Los valores medios obtenidos son $h_{SN2}^{OPS}=4000$ W/(m² K) y $h_{SN2}^{QC}=6000$ W/(m² K). Estos valores serán usados para el estudio de los casos (c) y (d).

3.2.2. Análisis de formación de hielo en el proceso de enfriamiento

Siguiendo análisis previos [21], el número de núcleos de hielo N formados en el intervalo (t_j, t_{j+1}) en la solución con crioprotector puede ser estimado como sigue:

$$N(t_j, t_{j+1}) = \int_{T(t_j)}^{T(t_{j+1})} -J(t_j, t_{j+1}) V_l(t_j, t_{j+1}) \frac{dT}{B} . \quad (6)$$

donde J es la tasa de nucleación y V_l el volumen de solución líquida libre de hielo. La tasa de nucleación fue calculada siguiendo expresiones previas [21] [22]. Se consideró que la nucleación ocurre entre la temperatura de fusión y su temperatura de nucleación homogénea.

Por otro lado, el radio en el tiempo t_{j+1} de un cristal de hielo que se originó en t_j es dado por [21]:

$$r_c(t_j, t_{j+1}) = \left(\int_{T(t_j)}^{T(t_{j+1})} -D_{eff} \frac{dT}{B} \right)^{\frac{1}{2}} , \quad (7)$$

donde D_{eff} es la difusividad efectiva basada en la ecuación de Einstein-Stokes para la difusividad browniana.

$$D_{eff} = \frac{k_b T}{6 \pi a_0 \mu(T)}, \quad (8)$$

siendo k_b la constante de Boltzmann, $a_0=0.282 \cdot 10^{-9}$ m el radio hidrodinámico de la molécula de agua y μ la viscosidad dinámica. Se utilizaron datos experimentales de la solución no congelada residual para expresar la dependencia de μ con la temperatura. [23].

Teniendo en cuenta las expresiones 6 y 7, y suponiendo una forma esférica para el cristal, el volumen total cristalizado se incrementa de la siguiente forma:

$$V_{ice}(t_{j+1}) = V_{ice}(t_j) + \frac{4 \pi}{3} N(t_j, t_{j+1}) r_c^3(t_j, t_{j+1}), \quad (9)$$

donde el volumen inicial es nulo, $V_{ice}(t_0)=0$. Finalmente, la fracción total de volumen cristalizado Y en el proceso de enfriamiento puede ser obtenida de la ecuación de Avrami:

$$Y(t_j) = 1 - \exp\left(-\frac{V_{ice}(t_j)}{V_i(t_0)}\right). \quad (10)$$

3.2.3. Resultados y discusión

Se obtuvieron resultados muy similares con los modelos numérico y analítico a los experimentales, lo que nos permite validar los modelos utilizados.

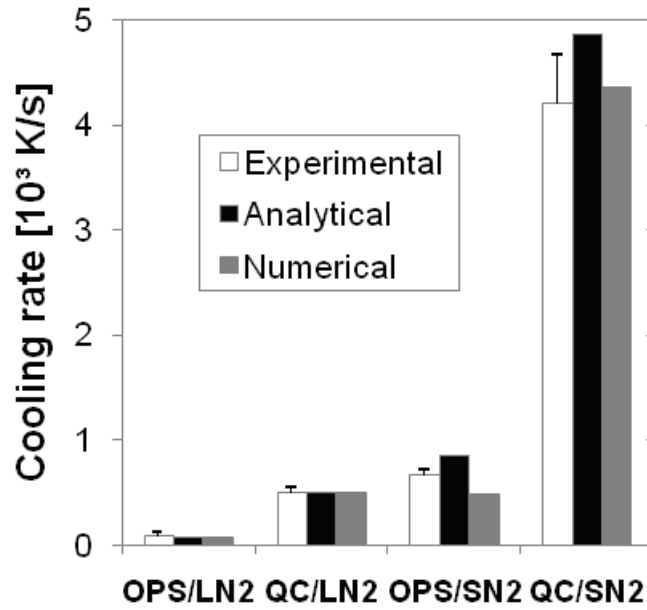


Fig. 5. Comparación entre la velocidad de enfriamiento obtenida con los modelos analíticos y numéricos y los resultados experimentales.

Este estudio permite demostrar la eficacia de los capilares de cuarzo y slush para evitar la formación de hielo, como se muestra en la siguiente figura.

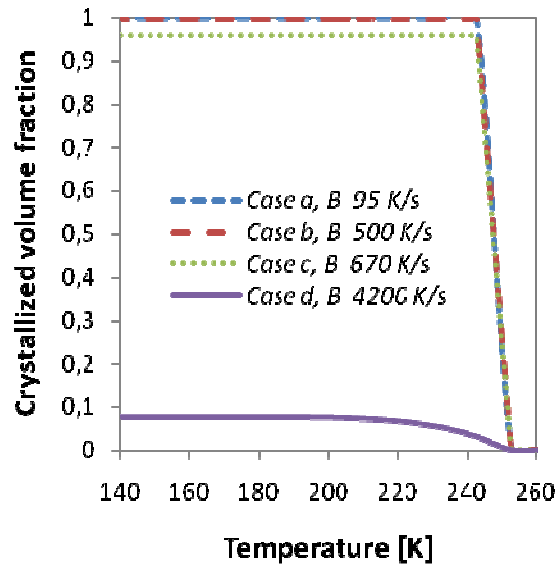


Fig. 6. Fracción de volumen cristalizado total para una solución de crioprotector 1.5 M para los cuatro casos estudiados.

El estudio teórico del enfriamiento de los capilares de cuarzo y OPS nos permite entender las claves de este proceso, para de esta forma proponer mejoras en el mismo, optimizando la tasa de enfriamiento de los capilares.

Entre estas mejoras, se proponen las siguientes:

- Incremento del coeficiente convectivo h : el uso de convección forzada entre el capilar y el fluido criogénico puede mejorar en gran medida la transferencia de calor, tanto en el caso del LN2, en el que también impediría la formación de la capa de Leidenfrost, como en el caso del SN2.

- Mejora del contenedor utilizado. Es necesario reducir el diámetro y el volumen para mejorar el enfriamiento, más que el material utilizado. La siguiente tabla muestra la importancia relativa de cada una de las resistencias térmicas del sistema: conductividad a través de la solución (R_1), conductividad a través de la pared del recipiente (R_2), y transferencia externa de convección (R_3). Todos estos resultados muestran que el aumento de la conductividad térmica de la pared de contenedores no es la mejor manera de aumentar la velocidad de enfriamiento. Los objetivos son aumentar la transferencia por convección y reducir la resistencia térmica de la solución acuosa, reduciendo el diámetro interno.

	OPS/LN2	QC/LN2	OPS/SN2	QC/SN2
R_1/R_{1+2+3}	16 %	14 %	30 %	47 %
R_2/R_{1+2+3}	26 %	1 %	46 %	5 %
R_3/R_{1+2+3}	58 %	85 %	24 %	48 %

Tabla 1. Importancia relativa de las resistencias térmicas en el proceso de enfriamiento de microcapilares. R_1 conductividad a través de la solución. R_2 conductividad a través de la pared del microcapilar, R_3 convección con el medio exterior

3.2.4. Estudio del proceso de recalentamiento

El recalentamiento constituye un proceso esencial para la vitrificación, siendo necesarias velocidades muy altas para evitar la formación de cristales de hielo en los

microcapilares. Del estudio de los resultados experimentales de Risco et al. se han obtenido conclusiones importantes para el proceso general de vitrificación celular.

En primer lugar, se ha identificado el punto señalado en la siguiente figura como la separación entre el recalentamiento del capilar en el aire (al salir del nitrógeno líquido) y el recalentamiento del capilar en el baño a 37°C.

Este punto no fue mencionado en el trabajo de R. Risco et al. [16] y tiene una gran importancia, pues pone de manifiesto el lento proceso de recalentamiento en el aire, algo que ha de ser evitado para lograr impedir la formación de cristales de hielo.

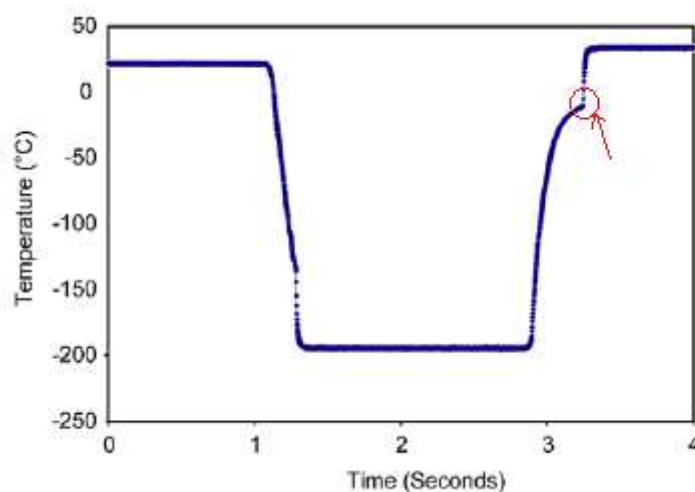


Fig. 7. Historia térmica de QC en LN2. En rojo se muestra el punto donde el capilar pasa del aire a la solución de recalentamiento.

En el caso del recalentamiento a partir de nitrógeno slush se observa como la temperatura se mantiene un tiempo alrededor de -196°C. Esto es debido, según R. Risco et al. al cambio de fase del nitrógeno slush de sólido a líquido. Analizando las gráficas observamos que este cambio de fase tiene lugar precisamente en el lapso de tiempo que va desde que el capilar sale de temperaturas criogénicas hasta que entra en la solución de recalentamiento. Esto constituye una eficiente manera de evitar la formación de hielo en el paso por aire del capilar.

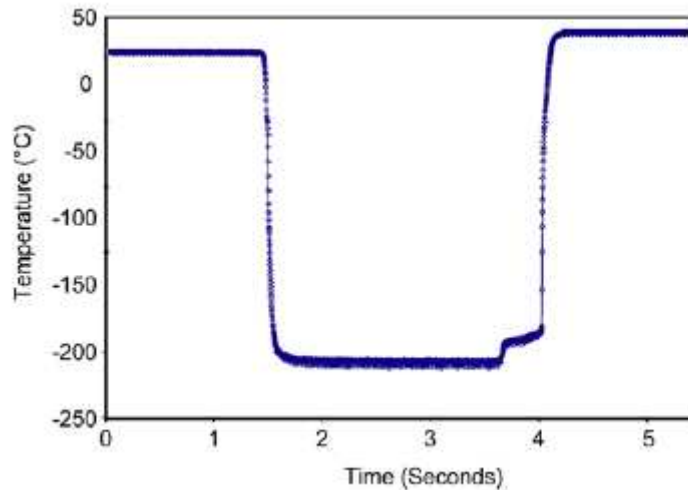


Fig. 8. Historia térmica de QC en SN2. Se puede apreciar como el cambio de fase del SN2 adherido al capilar de sólido a líquido mantiene constante la temperatura del sistema en torno a los -196°C .

Otra de las conclusiones obtenidas del análisis de las historias térmicas y el análisis teórico de la transferencia de calor es el posible uso también de la convección forzada para aumentar el coeficiente de convección h y por consiguiente, la tasa de transferencia de calor. Esta convección forzada puede ser aplicada en la solución de recalentamiento.

En la siguiente sección se muestra el estudio experimental realizado para comprobar empíricamente lo analizado aquí teóricamente, con el objetivo de mejorar el método propuesto por R. Risco et al.

3.3 Estudio experimental realizado. Mejora del método

3.3.1. Convección forzada

El objetivo de la utilización de convección forzada es la de incrementar la velocidad de enfriamiento de las células contenidos en el capilar para conseguir una adecuada vitrificación con bajas concentraciones de crioprotector. La convección forzada se produce como consecuencia del movimiento relativo del capilar de cuarzo con respecto al fluido criogénico. Tiene una doble ventaja con respecto a la simple inmersión:

- 1) Sustitución de capas de fluido refrigerante calentadas por la introducción de la muestra por otras capas más frías y en consecuencia con una mayor capacidad refrigerante.
- 2) Desestabilización y/o eliminación de la capa de vapor de Leidenfrost, en caso de formarse, que impide un buen contacto térmico entre el contenedor celular y el fluido refrigerante.

La convección forzada puede ser implementada de muchas formas, movimiento del capilar, movimiento del fluido refrigerante mediante un estrechamiento del flujo, mediante agitación, etc. La forma técnicamente más sencilla de implementar la convección forzada y más fácilmente repetible es mediante agitación del fluido refrigerante, por lo que ésta ha sido la forma elegida para la realización de los experimentos en el laboratorio.

Experimentos realizados

Se midió la velocidad de enfriamiento de capilares de cuarzo introducidos en nitrógeno líquido, con distintas velocidades de agitación de éste.

Los capilares de cuarzo (Capillary Tube Supplies Ltd. UK) utilizados tenían las siguientes características:

Diámetro interior 0.200 mm,
Espesor de la pared de 0.010 mm

La solución crioprotectora utilizada en el interior del microcapilar fue 1.5 M de 1,2 propanodiol y 0.3 M de sacarosa en PBS (solución tampón que mantiene constante el PH). La medida de temperatura fue realizada con un termopar tipo T (Omega Engineering Inc), de diámetro 0.025 mm, introducido en el capilar con la unión a 0,5 cm del extremo inferior. La Tarjeta de adquisición (Measurement Computing, USB-1208LS) muestreaba a 600 muestras por segundo.

Se utilizó un brazo mecánico para la introducción del capilar en el contenedor de nitrógeno líquido. Este sistema estaba compuesto por una palanca de accionamiento manual que movía un brazo en cuyo extremo está situada una pinza para sujetar el capilar.

Para evitar que el brazo rebote al soltarlo se colocó un imán en el elemento receptor de la caída, de tal forma que al soltar el brazo estos entrasen en contacto y quedasen unidos. Esto era importante para evitar los siguientes efectos:

- Picos de inversión térmica: si el capilar entra y sale del contenedor de nitrógeno, este se calienta y enfría de manera que no se consigue una velocidad uniforme.
- Movimientos oscilatorios dentro del capilar
- Problemas de indeterminación de la velocidad de entrada.

Una de las ventajas de este mecanismo está en la rapidez con la que el capilar entra en el LN2 y en la repetibilidad en la velocidad de entrada, 1250 mm/s, medida con un dispositivo barrera fotoeléctrica de horquilla con contador. (Phywe 11207.30)

Para proporcionar la convección forzada entre el nitrógeno líquido y el capilar se utilizó un agitador compuesto de rotor, pala y potenciómetro para regular con precisión la velocidad de giro.

Para poder medir la velocidad de agitación del nitrógeno utilizó un sensor de efecto Hall. Se colocó un imán en el rotor, el cual era detectado por el sensor Hall a cada giro del rotor. Esta señal llegaba al osciloscopio, en el cual podía observarse la frecuencia de giro, transformándola fácilmente en r.p.m.

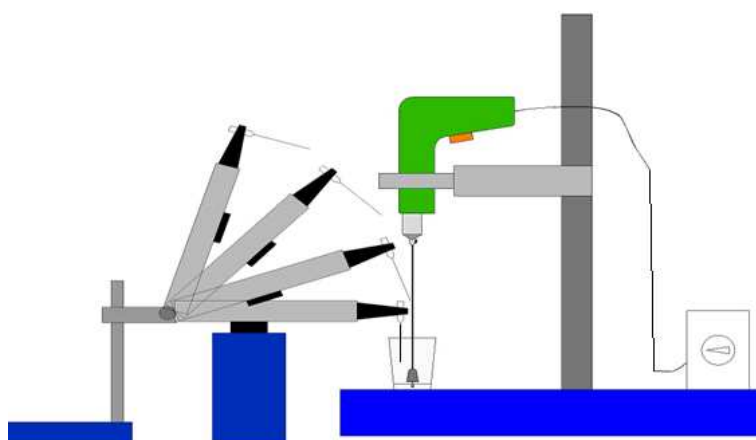


Fig. 9. Esquema del set-up utilizado. Se puede apreciar el movimiento del brazo giratorio.

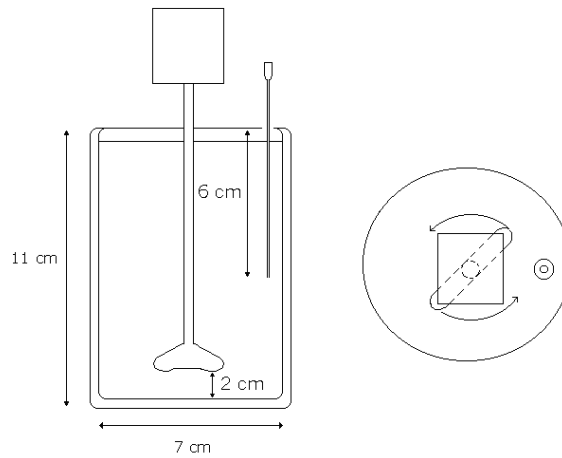


Fig. 10. Dimensiones de la paleta agitadora, del contenedor de nitrógeno y de la longitud de capilar introducida en los experimentos.

En la siguiente figura se muestra se muestra la velocidad de enfriamiento de los capilares de cuarzo al ser introducidos en nitrógeno líquido en el set-up descrito, con distintas velocidades de agitación.

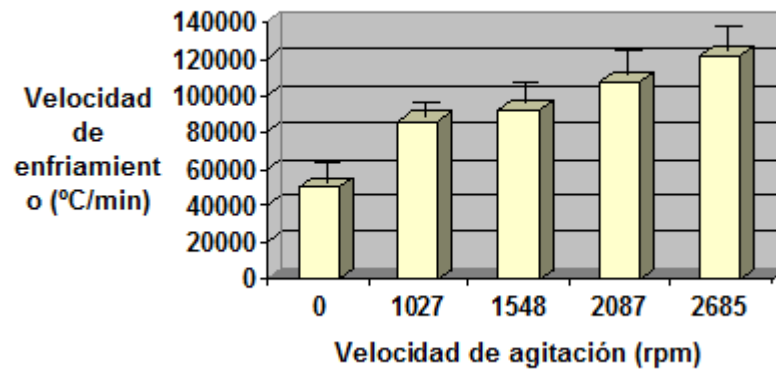


Fig. 11. Velocidad de enfriamiento de los microcapilares de cuarzo al ser introducidos en nitrógeno líquido, con la agitación de éste a distintas velocidades.

Estos resultados sugieren que la velocidad de agitación del líquido refrigerante durante la introducción del capilar de cuarzo conteniendo éste el material celular, debe de ser lo más elevada que permitan los medios técnicos. Este era un resultado previsible, teniendo en cuenta

la baja resistencia de conducción de los capilares de cuarzo. También se prevé la existencia de un máximo, debido a la resistencia térmica de la pared del microcapilar y del medio interno.

3.3.2. Ángulo de entrada

Se pretende determinar el efecto de introducir el microcapilar en la solución criogénica con distintos ángulos de entrada, bajo la hipótesis de que habrá ángulos de entrada del microcapilar que optimicen las velocidades de enfriamiento conseguidas.

Experimentos realizados

Se estudió, con el mismo set-up descrito anteriormente, el efecto de introducir el microcapilar de cuarzo en el nitrógeno líquido con distintos ángulos de entrada. Los capilares de cuarzo utilizados (Capillary Tube Supplies Ltd. UK) tenían las siguientes características:

Diámetro interior 0.200 mm,

Espesor de la pared de 0.010 mm

Se estudiaron ángulos de entrada de 30°, 45°, 60° y 75° con respecto a la vertical. Una vez más, la medida de temperatura fue realizada con un termopar tipo T (Omega Engineering Inc) de diámetro 0.025 mm, introducido en el capilar con la unión a 0,5 cm del extremo inferior. La Tarjeta de adquisición (Measurement Computing, USB-1208LS) muestreaba a 600 muestras por segundo. La solución crioprotectora utilizada en el interior del microcapilar fue 1.5 M de 1,2 propanodiol y 0.3 M de sacarosa en PBS. Se obtuvieron los siguientes resultados:

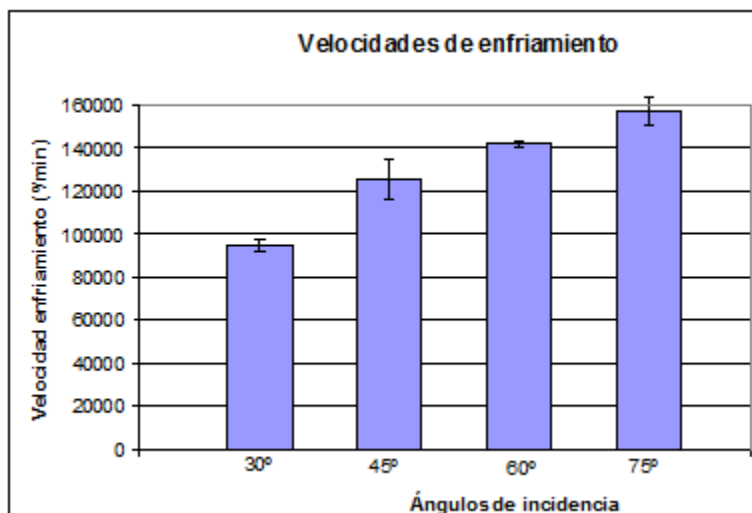


Fig. 12. Velocidad de enfriamiento con distintos ángulos de incidencia del capilar en nitrógeno líquido

Puede concluirse que, si la distancia recorrida por el microcapilar (en el punto exacto donde está la muestra) en el nitrógeno líquido es igual, y se introduce con la misma velocidad, el enfriamiento es más rápido con ángulos cercanos a la horizontal. Esto es así debido a que con el tradicional ángulo de 0° (muestra introducida verticalmente), la muestra está unos centímetros por encima del extremo del capilar, y en su introducción en nitrógeno líquido o slush, el extremo va degradando la calidad del fluido refrigerante antes de que dicho fluido llegue a la altura de la muestra. Con ángulos cercanos a la horizontal conseguimos que el tramo de capilar que contiene la muestra entre en contacto con capas de nitrógeno líquido o slush no degradado, aumentando la velocidad de enfriamiento.

3.3.3. Proceso de recalentamiento.

Del análisis teórico realizado se deduce la importancia de la utilización de nitrógeno slush en el proceso de recalentamiento, con el objetivo de evitar el nocivo efecto del paso del contenedor celular por el aire que separa los contenedores de nitrógeno líquido y de la solución de recalentamiento. Con esto se consigue solucionar los inconvenientes anteriormente comentados en el recalentamiento de muestras celulares vitrificadas, incrementando en gran medida las velocidades del proceso de recalentamiento.

El slush, nitrógeno líquido sub-enfriado, durante el tiempo que transcurre desde que se extrae el capilar de cuarzo de él hasta que se introduce en la solución de recalentamiento mantiene constante la temperatura de la muestra celular a -196°C , como consecuencia del cambio de estado de dicho slush, adherido al capilar de cuarzo, a nitrógeno líquido. Este mantenimiento de la temperatura consigue impedir la formación de hielo (la muestra vitrificada es tan viscosa que a -196°C no puede formar cristales de hielo) y permite que la temperatura de la muestra celular pueda aumentar de forma brusca y repentina al ser introducida en la solución de recalentamiento, como puede apreciarse en la siguiente figura.

El proceso de recalentamiento puede de igual forma mejorarse con el uso de convección forzada comentado en el apartado anterior, como se verá a continuación.

Experimentos realizados

Se realizaron una serie de experimentos iniciales, en los que el microcapilar de cuarzo (con las mismas características que los comentados anteriormente) se extraía de nitrógeno líquido o slush, y se introducía en un baño de agua a 37° con y sin agitación. La solución crioprotectora utilizada en el interior del microcapilar fue 1.5 M de 1,2 propanodiol y 0.3 M de sacarosa en PBS.

La medida de temperatura fue realizada con un termopar tipo T (Omega Engineering Inc), de diámetro 0.025 mm, introducido en el capilar con la unión a 0,5 cm del extremo inferior. La Tarjeta de adquisición (Measurement Computing, USB-1208LS) muestreaba a 600 muestras por segundo.

El mecanismo que llevaba al microcapilar desde el medio criogénico (nitrógeno líquido o slush) hasta la solución de recalentamiento era un mecanismo 3 barras, accionado de forma manual. Para proporcionar la convección forzada en el baño de recalentamiento se utilizó el mismo agitador que en los experimentos antes descritos, compuesto de rotor, pala y potenciómetro para regular con precisión la velocidad de giro.

El procedimiento de fabricación del slush fue mediante una bomba de vacío (Telstar 2F3), que convierte un volumen de 250 ml de nitrógeno líquido en slush en aproximadamente 15 minutos.

La siguiente gráfica muestra los primeros experimentos realizados, en los que se aprecia la diferencia entre recalentar desde nitrógeno líquido y desde slush, y la mejora obtenida en éste último caso.

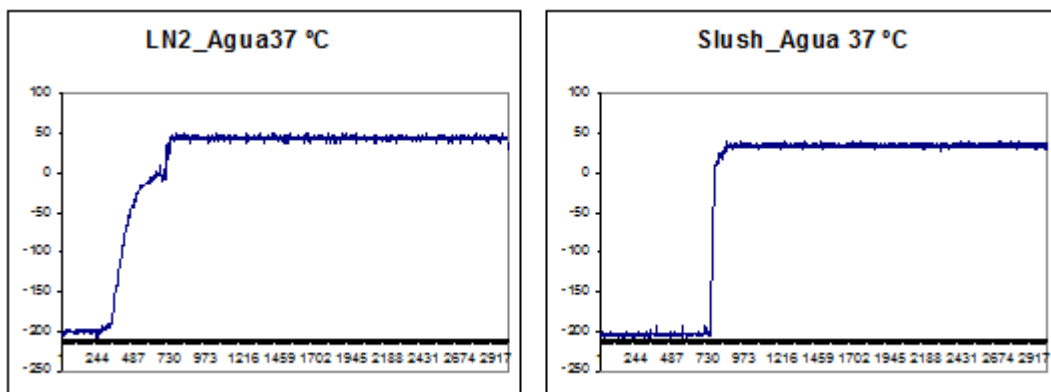


Fig. 13. Recalentamiento del microcapilar desde nitrógeno líquido y desde slush

La siguiente gráfica muestra las velocidades de recalentamiento de los tres experimentos, recalentamiento desde LN2, recalentamiento desde slush y recalentamiento desde slush con agitación del fluido de recalentamiento.

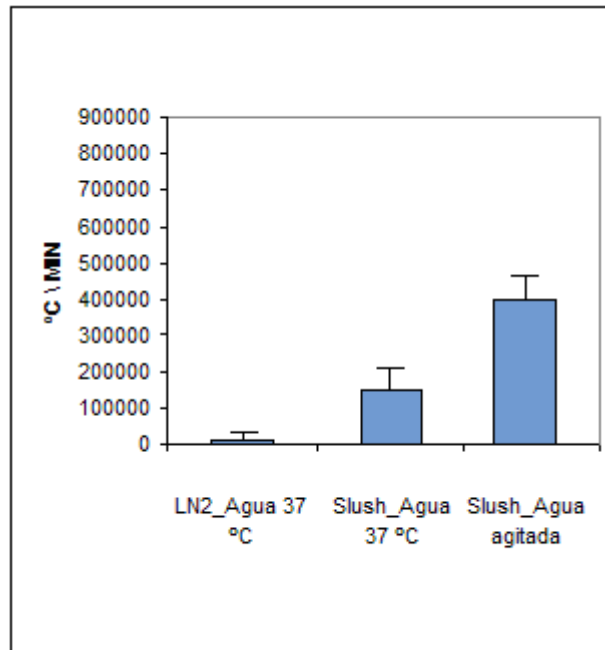


Fig. 14. Velocidades medias de recalentamiento desde -150°C a 20°C. a) desde LN2 a agua 37° b) desde slush a agua 37° y c) desde slush a agua a 37° agitada

Se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El extraer el microcapilar desde nitrógeno slush aumenta la velocidad de recalentamiento, puesto que la temperatura de la muestra se mantiene constante en su paso por el aire.
- El utilizar la convección forzada en la solución de recalentamiento aumenta en gran medida la velocidad de recalentamiento.

A efectos prácticos, para una muestra conservada en nitrógeno líquido habría que sustituir este nitrógeno líquido por nitrógeno slush. No hay problema en realizar dicha sustitución puesto que el nitrógeno líquido slush posee una mayor densidad y el nitrógeno líquido se evapora rápidamente.

El proceso de recalentamiento podría también mejorarse añadiendo partículas de cobre en polvo en el fluido de recalentamiento, para aumentar la conducción térmica.

3.3.4. Microcapilares de otros materiales.

Como puede observarse en la tabla 1, resultado del análisis teórico del proceso de enfriamiento de los microcapilares, el aumento de la conductividad térmica de la pared de los contenedores no es tan relevante en la velocidad de enfriamiento total del sistema, debido al reducido espesor que tienen estos microcapilares. Así, los capilares de cuarzo originalmente usados por Risco et al. pueden sustituirse por otros microcapilares de similares dimensiones, consiguiendo velocidades de enfriamiento y recalentamiento muy parecidas. Estos microcapilares pueden entonces ser fabricados de otro material, como polímeros termoplásticos, que permitan ventajas prácticas sobre los microcapilares de cuarzo, como son el termosellado y una menor fragilidad.

Experimentos realizados

Se estudió la velocidad de enfriamiento de un microcapilar de policarbonato (Paradigm Optics), usado como contenedor celular, al ser introducido en nitrógeno slush. El microcapilar de policarbonato tiene las siguientes características:

Diámetro interior 0.167 mm,

Espesor de la pared de 0.033 mm

La solución crioprotectora utilizada fue 1.5 M de 1,2 propanodiol y 0.3 M de sacarosa en PBS.

La medida de temperatura fue realizada con un termopar tipo T (Omega Engineering Inc), de diámetro 0.025 mm, introducido en el capilar con la unión a 0,5 cm del extremo inferior. La velocidad de entrada del capilar en el nitrógeno slush fue de 1250 mm/s (medida con un dispositivo barrera fotoeléctrica de horquilla con contador, Phywe 11207.30).

El procedimiento de fabricación del slush fue mediante una bomba de vacío (Telstar 2F3), fabricándose un volumen de 50 ml de nitrógeno slush.

El microcapilar fue termosellado, y doblado en forma de bucle (la flexibilidad del capilar lo permite) con el termopar en el extremo inferior (consiguiendo así un efecto similar a la introducción del capilar en horizontal).

Se consiguieron velocidades de enfriamiento de 180.000°/min, demostrando que se pueden obtener velocidades de enfriamiento tan altas como en el caso de los capilares de cuarzo, con la ventaja de una mayor robustez y de la posibilidad de termosellado.

3.4 Conclusiones. Potencial del método de vitrificación celular mediante microcapilares.

Todas estas mejoras estudiadas sobre el trabajo original de Risco et al. (convección forzada, ángulo de entrada, recalentamiento desde slush, utilización de microcapilares de otros materiales con termosellado, etc) han sido recogidas en varias patentes. La primera de ellas (WO/2009/040457) publicada en 2009 (ver anexo I) y la segunda de ellas todavía en proceso de registro.

PATENTSCOPE®

About Patents
PCT Resources
PCT Service Centre
Database Search
PCT Applications
National Collections & PCT
External Databases
Patent Analysis
Glossary
Data Services
Publications
Projects & Programs
Patent Law
Priority Documents

RELATED LINKS

Patent Classification: IPC
Statistics
Life Sciences
WIPO Standards

E-NEWSLETTERS

Subscription

(WO/2009/040457) CELLULAR CRYOPRESERVATION BY MEANS OF VITRIFICATION WITH LOW CONCENTRATIONS OF CRYOPROTECTOR

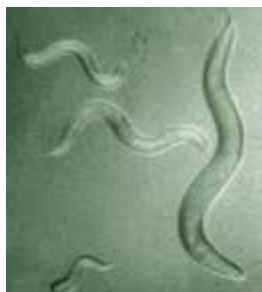
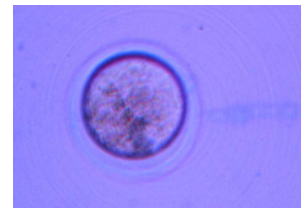
Biblio. Data Description Claims National Phase Notices Documents

Latest bibliographic data on file with the International Bureau

Pub. No.: WO/2009/040457 International Application No.: PCT/ES2008/000608
 Publication Date: 02.04.2009 International Filing Date: 25.09.2008
 IPC: C12N 5/00 (2006.01), A01N 1/02 (2006.01)
 Applicants: UNIVERSIDAD DE SEVILLA [ES/ES]; OTRI-Universidad de Sevilla, Pabellón de Brasil, Paseo de las Delicias s/n, E-41013 Sevilla (ES) (All Except US); RISCO DELGADO, Ramón [ES/ES]; (ES) (US Only); OLMO FERNÁNDEZ, Alberto [ES/ES]; (ES) (US Only); SÁENZ CUESTA, Jaime Luis [ES/ES]; (ES) (US Only).
 Inventors: RISCO DELGADO, Ramón; (ES); OLMO FERNÁNDEZ, Alberto; (ES); SÁENZ CUESTA, Jaime Luis; (ES).
 Priority Data: P200702565 27.09.2007 ES
 Title: (EN) CELLULAR CRYOPRESERVATION BY MEANS OF VITRIFICATION WITH LOW CONCENTRATIONS OF CRYOPROTECTOR
 (ES) CRIOPRESERVACIÓN CELULAR POR VITRIFICACIÓN CON BAJAS CONCENTRACIONES DE CRIOPROTECTOR
 Abstract: (EN) The subject of the present invention concerns a novel cellular cryopreservation method which achieves vitrification of biological samples with presence of low concentrations of cryoprotector. The method is based on use of forced convection for the purpose of increasing heat transfer and attaining very high rates of cooling and reheating which prevent nucleation and growth of ice crystals.
 (ES) El objeto de la presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de criopreservación celular, que consigue la vitrificación de las muestras biológicas con presencia de bajas concentraciones de crioprotector. El procedimiento se basa en el uso de la convección forzada con el objetivo de aumentar

Fig. 15. Patente WO/2009/040457. Criopreservación celular mediante vitrificación con baja concentración de crioprotector.

Esta tecnología ha supuesto un gran avance en la vitrificación, consiguiendo las mayores velocidades de enfriamiento y recalentamiento conocidas hasta la fecha, siendo necesarias las menores concentraciones de crioprotector.



Con esta técnica se han obtenido hasta la fecha resultados muy esperanzadores en la vitrificación de óvulos (100% de supervivencia en ovocitos de ratonas, esperando próximamente probar estos resultados en gametos humanos). También se ha conseguido en el laboratorio la vitrificación del mayor organismo pluricelular hasta la fecha, un *C. Elegans* adulto de cerca de 1mm de longitud.

En conclusión, esta técnica de vitrificación desarrollada consigue los mejores resultados conocidos, en cuanto a velocidad de enfriamiento y baja concentración de CPA utilizado,

teniendo una gran potencialidad para su aplicación en otros tipos celulares difíciles de criopreservar, como es el caso de células madre o cualquier otro material biológico que pueda ser introducido en estos microcapilares.

Capítulo 4. Introducción a la criopreservación de tejidos y órganos.

De las dos técnicas generales vistas de criopreservación, enfriamiento lento y vitrificación, esta última es preferida en sistemas biológicos más complejos, debido a que en estos casos el hielo extracelular formado daña en general las estructuras de los tejidos u órganos.

La vitrificación ha sido tradicionalmente probada con tasas de enfriamiento rápidas y en combinación con una elevada concentración de crioprotectores que provoca un efecto de vitrificado. Sin embargo, en órganos no es posible alcanzar estas altas tasas de enfriamiento, debido a su geometría y a sus propiedades termodinámicas. El principal desafío en la criopreservación de órganos enteros es el de encontrar la mejor composición para una solución crioprotectora que tenga el nivel de toxicidad más bajo posible mientras se realiza la vitrificación.

El grupo de Gregory Fahy [24] (21st Century Medicine), ha apostado por la obtención de compuestos químicos que consigan una baja toxicidad y al mismo tiempo eviten la formación de hielo. V2X, VM3, M22 son ejemplos de soluciones obtenidas, que consiguen mejorar algunas de las propiedades de los crioprotectores tradicionales [24].

Este grupo de investigación ha estudiado igualmente de forma experimental la perfusión de las distintas soluciones dentro del órgano, cuestión esencial para la criopreservación de tejidos y órganos. Es necesario tener en cuenta que a menores temperaturas, una misma concentración de crioprotector resulta menos tóxica. Dicha perfusión es dependiente de la temperatura (a menores temperaturas más difícil resulta la perfusión), siendo necesario controlar la presión del flujo, para no dañar al órgano. En la siguiente figura se muestra el protocolo de perfusión de M22 en riñones de conejo seguido en 2004, que dio lugar a muy buenos resultados [25].

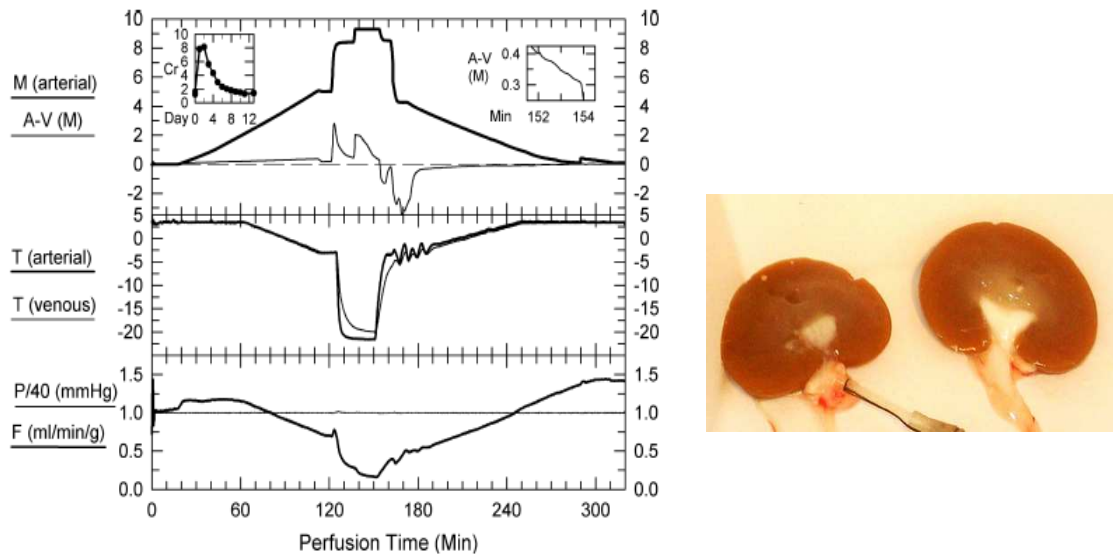


Fig 16. Detalle del protocolo de perfusión de riñones de conejo con la solución crioprotectora M22 usado por Gregory Fahy et al. [25]. El riñón bajaba su temperatura a -22°C , monitorizándose su temperatura (T, arterial y venosa), concentración molar del crioprotector (M, tanto arterial como diferencia arterio-venosa), presión (P, en mm de Hg) y flujo (F, en ml/min/g). La presión se divide por 40 para poder ser mostrada en la misma gráfica que el flujo. El proceso de perfusión duraba unos 300 minutos. Vemos como se realiza la carga de crioprotector de distinta forma en distintos rangos de temperatura, siguiendo su anterior know-how experimental. A la derecha, detalle del corte del riñón, en el que se aprecia la ausencia de hielo, salvo en la pelvis renal. También se muestran los niveles de creatinina producidos después del proceso y del trasplante, como muestra del funcionamiento post-operatorio del órgano. [25]

Gregory Fahy, consiguió en 2005 la vitrificación de un riñón de conejo, bajada a temperaturas criogénicas con el posterior recalentamiento, trasplante y puesta en funcionamiento en el animal. A pesar de la formación interno de hielo en el órgano, éste consiguió con éxito recuperar sus funcionalidades.



Fig 17. Detalle del riñón de conejo vitrificado mostrado por Gregory Fahy en 2005.

Todavía es necesario evitar en mayor medida la formación de cristales de hielo para una mejor conservación de las funcionalidades del órgano, así como extender la metodología a otros tejidos y órganos. Una medida de la distribución de la concentración de crioprotector interior a estos tejidos u órganos on-line sería muy interesante a la hora de mejorar los protocolos utilizados.

Otra técnica, la de Liquidus Tracking, explicada en la sección siguiente y basada en el control del proceso de enfriamiento, complementa los avances en la obtención de soluciones crioprotectoras. Esta técnica ha obtenido también muy buenos resultados en criopreservación de cartílago, pudiendo complementar las técnicas y soluciones crioprotectoras utilizadas por Gregory Fahy et al.

Técnica de Liquidus Tracking.

Farrant y Huggins en 1956, ambos de forma independiente, analizaron un camino hacia la criopreservación de órganos que evita de forma total la formación de hielo incluso a temperaturas muy bajas. El método descrito por Farrant permitió que tanto el útero de un ejemplar adulto de cobaya como el corazón de una rana pudieran ser criopreservados adecuadamente [26]. En colaboración con Farrant, el equipo de Mill Hill en Londres, y Adem y Harness construyeron el primer equipo capaz de perfundir un órgano entero con un agente crioprotector y eliminarlo posteriormente de un forma adecuada y bien documentada [27].

Demostraron que era posible aumentar la concentración de crioprotector (DMSO) con incrementos durante el proceso de enfriamiento por lo que se impedía la formación de hielo a la vez que las muy altas concentraciones de DMSO requeridas a muy bajas temperaturas eran sólo alcanzadas a estas bajas temperaturas.

Sin embargo esto resultaba en un sistema ternario DMSO-agua-NaCl de difícil manejo experimental, debido al cuidado que se requiere en el diagrama de fases, ya que las perturbaciones debidas al cambio de condiciones de contorno en concentración y temperatura puede derivar en cruzar antes de lo debido la línea del eutéctico, dañando irreversiblemente la muestra.

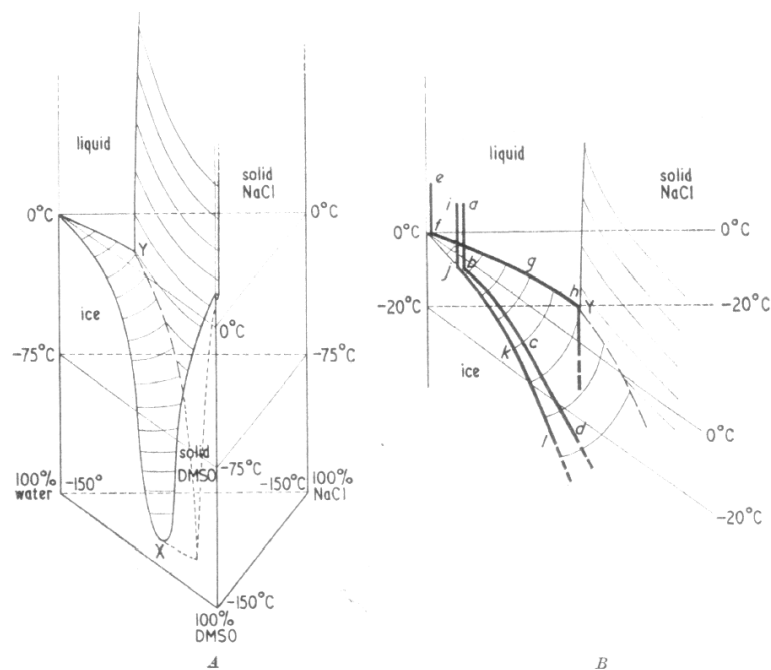


Fig. 18. Sistema ternario DMSO-agua-NaCl, tal como aparece en la publicación de Farrant, mediante la que se propone conseguir evitar la formación de cristales de hielo [26].

Este trabajo sin embargo sirvió de base para otros estudios, como los realizados por Elford y Walter, que demostraron la recuperación de músculo liso después de enfriarlo a -79°C con incrementos por pasos de la concentración de DMSO manteniendo las concentraciones de sal isotónicas [28].

El grupo del profesor David Pegg en la Universidad de York ha mejorado este método, mejorando el control y estudiando las distintas tolerancias a las que un órgano puede prestarse ante un daño osmótico debido al crioprotector, denominando “Liquidus tracking” al método [29,30]. Esto ha conducido a un mejor entendimiento del concepto de vitrificación de un órgano, o preservación libre de hielo en un estado amorfo.

El método del profesor Pegg ha sido probado con éxito en la criopreservación de cartílago articular, y la extensión de esta técnica representa una posibilidad optimista de lograr la criopreservación de órganos vascularizados.

En la siguiente figura se muestra la filosofía de la técnica del Liquidus Tracking, consistente en incrementar la concentración de crioprotector conforme baja la temperatura de la muestra, siguiendo las curvas de equilibrio del crioprotector. También se muestra un esquema del sistema de control de temperatura y de control de concentración de crioprotector utilizado.

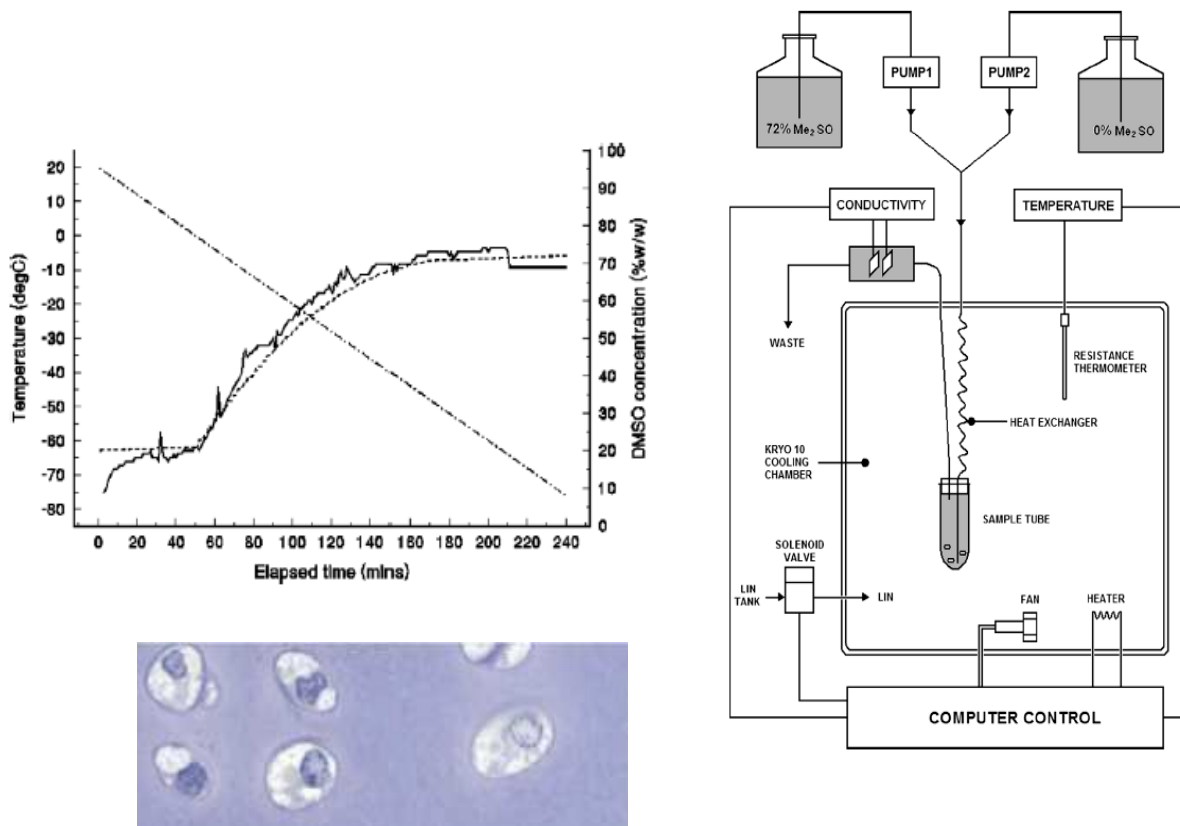


Fig 19. Control de la temperatura y concentración de crioprotector en el Liquidus Tracking y detalle del resultado de vitrificación de cartílago [6,7]. Se escogió una tasa de enfriamiento de 0.2°C/min para mantener el tiempo del proceso global de alrededor de 5 h. Observamos como se consiguió mantener la concentración de crioprotector (Me2SO) cerca de su punto de equilibrio, para cada temperatura. La medida de la concentración de crioprotector se realizaba mediante un conductímetro, que relacionaba la medida de conductividad de la solución saliente de la muestra con la concentración de crioprotector, utilizando esta medida para el control de la entrada de Me2SO. Observamos un detalle de la muestra de cartílago a 22°, después de haber bajado hasta -196°. No se observan daños en las células, debido a que se ha evitado la formación de hielo.

La utilización de esta técnica en otro tipo de tejidos o en órganos requeriría de mejores técnicas de medida de la concentración de crioprotector en el interior del material biológico, puesto que la información obtenida a partir de la solución resultado de la perfusión es bastante limitada, en cuanto al conocimiento de la distribución espacial de la concentración de crioprotector en tejidos y órganos, y en cuanto al conocimiento de la formación de hielo en éstos.

Mejoras propuestas para la vitrificación de tejidos y órganos.

En cualquier protocolo de criopreservación, sobre todo en el caso de tejidos y órganos, es necesario evitar la formación de cristales de hielo, como ha quedado demostrado en las referencias anteriores [25,26,28,29,30].

Para conseguir evitar la formación de hielo, se estudian en esta Tesis dos métodos distintos: en primer lugar se analiza la influencia de las ondas ultrasónicas para evitar o retrasar la formación de cristales de hielo, y por otra parte se estudia el uso de medidas de bioimpedancia para monitorizar la concentración de crioprotector, y de esta forma controlar mejor protocolos de criopreservación.

La utilización de ultrasonidos para evitar la formación de cristales de hielo en el enfriamiento de agua parte de los trabajos experimentales de V. K. Lamer et al. y Robert-Smith Johannsen, donde se obtuvo un retraso importante en la formación de cristales de hielo, sin haber dado una posible explicación. En esta Tesis se han reproducido estos experimentos y se ha tratado de buscar dicha explicación y su importancia para mejorar los protocolos de criopreservación.

Por otra parte, se ha estudiado, mediante simulaciones con COMSOL Multiphysics Software, la eficiencia de utilizar medidas de bioimpedancia para determinar la concentración de crioprotector en el interior de tejidos y órganos, para de esta forma controlar mejor los procesos de criopreservación y evitar la formación de hielo. Se han estudiado fibroblastos 3T3 y monocapas de células madre mesenquimales, fundamentales en el transporte de bioreactores y en ingeniería de tejidos.

Capítulo 5. Influencia de los ultrasonidos en la nucleación del hielo.

5.1 Antecedentes

Los ultrasonidos han sido extensamente empleados para modificar la nucleación de distintos materiales. Desde hace muchas décadas se emplea por ejemplo para cambiar la estructura y aspecto de ciertos metales influyendo en su proceso de cristalización.

El control de la formación de hielo es una cuestión de gran importancia en criopreservación, siendo interesante estudiar la posibilidad de evitar la formación de cristales de hielo en el interior de tejidos y órganos mediante el uso de ultrasonidos.

Todavía no se comprende de una forma completa esta influencia de las ondas ultrasónicas en la nucleación y crecimiento de cristales de hielo. Los primeros trabajos que se publicaron sobre la influencia de los ultrasonidos en la nucleación del hielo, datan del año 1947. Sus autores fueron Victor K. Lamer y James W. Yates, de la Universidad de Columbia. Sus resultados fueron contrastados un año más tarde por Robert Smith-Johannsen. Ambos artículos fueron publicados en la prestigiosa revista Science [31][32].

En 1947, Victor K. Lamer y W. Yates estudiaron la forma de variar el tiempo de nucleación de soluciones acuosas de tiosulfato de sodio y HCl mediante distintos tratamientos de la muestra de agua. Los resultados de tratar el agua con ultrasonidos, publicados en Science, fueron sorprendentes, aunque no lograron su explicación.

Al aplicar ondas ultrasónicas de 400 khz al agua durante 2-4 minutos resultó en un sorprendente retraso del tiempo de nucleación desde los 47 minutos de media hasta las 3-7 horas.

Estos resultados no pudieron ser explicados, y V. K. Lamer y W. Yates postularon la existencia de unos “unknown nuclei” que el tratamiento con ultrasonidos eliminaría.

“Experiments are in progress to test various hypotheses of the nature of the nucleation process”, concluye el artículo.

Estos resultados fueron confirmados un año más tarde por Robert-Smith Johannsen en un paper que fue publicado también en la revista Science. En este caso, las ondas ultrasónicas aplicadas fueron de 1 Mhz, y la aplicación de este campo de ultrasonidos durante 30 segundos resultaba en un importante retraso en la temperatura de nucleación del agua (de unos -19° a unos -30°). El agua retenía esta propiedad incluso durante dos meses conservada en el mismo recipiente. R. Smith-Johannsen tampoco pudo explicar estos sorprendentes resultados.

Hay muchos detalles en estos experimentos que no fueron comentados en sus trabajos, como las intensidades de ultrasonidos empleados, y estos artículos, a pesar de la importancia que podrían tener en criopreservación, han pasado inadvertidos a lo largo de estos años.

La mayor parte de la investigación reciente sobre la influencia de los ultrasonidos en la nucleación del hielo se centra en la cavitación, al ser éste uno de los fenómenos que provocan los ultrasonidos que más claramente influye en la formación de hielo.

Recibe el nombre de cavitación la formación de burbujas en líquidos debida a la acción de fuerzas mecánicas como ultrasonidos. Es necesario un umbral de intensidad determinado (alrededor de $1\text{W}/\text{cm}^2$) para que se haga visible este proceso de cavitación en el agua pura. También se puede distinguir entre cavitación estable (cuando la burbuja pulsa alrededor de un radio de equilibrio durante muchos ciclos acústicos) y cavitación transitoria (cuando la burbuja crece extensivamente y finalmente colapsa) [33].

Parece probado que la cavitación favorece la formación de hielo, con un gran número de experimentos realizados e incluso modelos teóricos que explican este proceso. Chalmers publicó en 1964 el que se piensa fue el primer trabajo sobre la sonocrystalización del hielo [34]. (los anteriores artículos de V. K. Lamer y R. Smith-Johannsen han pasado, como dijimos anteriormente, completamente inadvertidos). Chalmers escribió en su trabajo que la nucleación del hielo ocurría a temperaturas más altas en presencia de ultrasonidos. También expuso la teoría original del proceso de sonocrystalización.

Desde entonces, la literatura sobre los efectos experimentales de los ultrasonidos ha estado dominada por el incremento en la temperatura de nucleación del hielo causada por los ultrasonidos.

Se han escrito dos modelos teóricos que tratan de explicar la influencia de la cavitación en la nucleación del hielo, los modelos de R. Hickling y de J. D. Hunt y K. A. Jackson.

De acuerdo con el modelo de R. Hickling [35], las presiones que ocurren durante la fase final del colapso de una burbuja de cavitación incrementa la temperatura de equilibrio de congelación del agua, causando por tanto la nucleación del hielo.

De acuerdo con otro modelo (J.D Hunt, K.A Jackson) [36], esta nucleación la causan las presiones negativas que siguen el colapso de la burbuja de cavitación.

Tanto en uno como en otro modelo, la nucleación se ve favorecida por el proceso de cavitación, y este favorecimiento se ve también reflejado en muchos trabajos experimentales actuales [37],[38],[39],[40],[41], como los mostrados en las siguientes figuras.

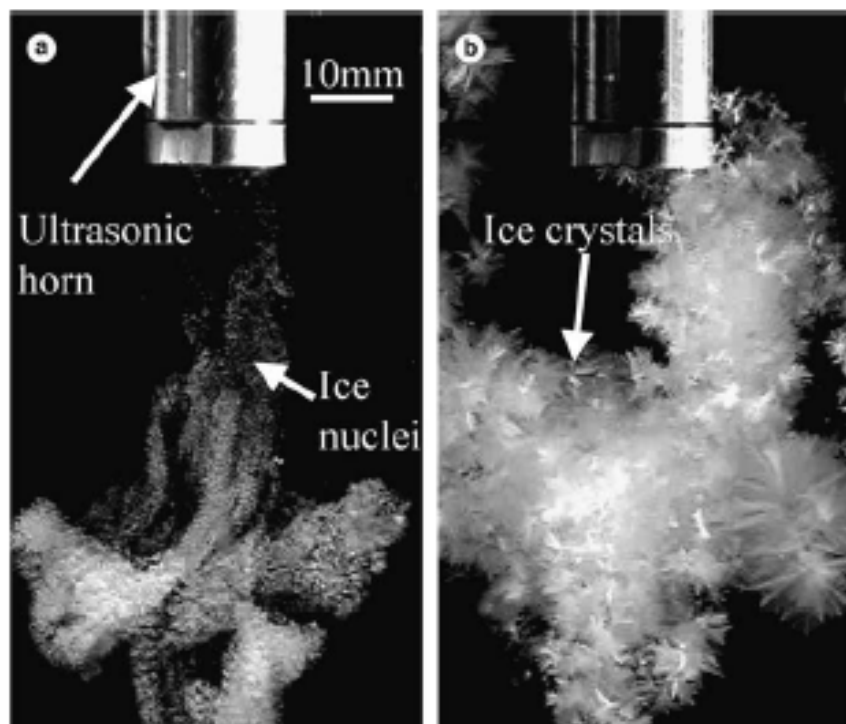


Fig 20. Cristalización inducida por cavitación [R. Chow. The sonocrystallization of ice in sucrose solutions: primary and secondary nucleation]

Rachel Chow concluye en sus estudios que la temperatura de nucleación del hielo aumenta con el incremento de potencia de las ondas ultrasónicas, siempre en un nivel superior al del umbral de cavitación.

Tanto la cavitación estable como la transitoria parecen ser importantes para la nucleación del hielo, favoreciendo este proceso, ya sea en una solución acuosa sin presencia de hielo (lo que llama nucleación primaria) como en una solución acuosa con núcleos ya presentes (nucleación secundaria).

Como parece probado, la cavitación producida por los ultrasonidos favorece la nucleación del hielo. Sin embargo, muy poco se ha escrito sobre la influencia de ultrasonidos a niveles de intensidad menores de cavitación, y los resultados obtenidos por los diversos autores son bastante contradictorios.

A niveles de intensidad de ultrasonidos menores de los que producen la cavitación encontramos los trabajos experimentales de T. Hozumi [42], que informó de los distintos efectos que obtuvo en la cristalización del agua la aplicación de ultrasonidos. La intensidad de las ondas ultrasónicas aplicadas fue de 0.13 W/cm^2 y 0.28 W/cm^2 , y en ambos casos encontró que la nucleación del hielo fue diferente respecto al caso en el que no se aplicaron ultrasonidos.

Por otra parte, R. Chow afirma en varios de sus artículos que la aplicación de ultrasonidos a niveles menores de cavitación no produce ningún efecto apreciable en la nucleación del hielo [38]. En su trabajo “The importance of acoustic cavitation in the sonocrystallization of ice – high speed observations of a single acoustic bubble”, (IEEE Ultrasonics Symposium, 2003), aplicaba un campo ultrasónico de 27 khz para encontrar que la temperatura de nucleación del hielo no variaba con respecto a la formación de hielo sin ultrasonidos.

Estos resultados, contradictorios a los de T. Hozumi, no han sido contrastados por ningún otro trabajo experimental, al estar la mayoría de estos centrados, como dijimos anteriormente, en el estudio de la influencia de la cavitación en la formación de hielo.

En la siguiente sección se comentan los materiales y métodos utilizados para estudiar en el laboratorio la influencia de los ultrasonidos en la nucleación del hielo, con el objetivo de hallar un procedimiento útil para evitar la formación de hielo en tejidos y órganos.

5.2.- Materiales y métodos

El material utilizado para la realización de estos experimentos fue un instrumento construido en el laboratorio, cuyo funcionamiento se basa en una técnica similar a la Calorimetría de Escaneo Diferencial (Differential Scanning Calorimetry, DSC) llamada Análisis Térmico Diferencial (Differential Thermal Analysis, DTA), que se explica en el siguiente subapartado.

El análisis térmico diferencial es una técnica utilizada para el estudio de las reacciones endotérmicas o exotérmicas que se producen en reacciones químicas, procesos de cambios de fase o cambios estructurales que se producen en una muestra durante un proceso de calentamiento o enfriamiento. Esta técnica consiste en la medida de la diferencia de temperatura entre la muestra y una referencia, a las que se aplica un calentamiento o un enfriamiento exactamente igual. Cuando este proceso es exactamente igual, las diferencias de temperatura entre la muestra y la referencia vienen dadas por los cambios de fase y otros procesos térmicos.

5.2.1. Estructura y configuración del Droplet Nucleation Analyzer

El Droplet Nucleation Analyzer se utilizó para estudiar la temperatura y tiempo de nucleación de muchas muestras de forma simultánea. De igual forma, puede estudiarse el proceso de descongelación, aunque debido a las características aleatorias del proceso de nucleación es aquí donde podemos sacar mayor provecho de nuestro aparato. Su diseño se basa en el anterior aparato construido por el Dr. Roger Worland, utilizado para estudiar la supervivencia de microorganismos a bajas temperaturas [44].

El Droplet Nucleation Analyzer basa su funcionamiento en el efecto peltier, que es la transformación de energía eléctrica en diferencia de temperaturas y viceversa. Es decir, al aplicar una intensidad a una placa peltier se consigue que, por así decirlo, se “bombee” el calor de una cara de la placa a la otra. Por otra parte, al aplicar una diferencia de temperaturas entre las dos caras de la placa peltier, se producirá un voltaje de salida (es el efecto inverso al anterior). Utilizaremos este efecto Peltier en ambos sentidos en nuestro aparato.

Dos placas peltier, junto con un refrigerador y alimentadas convenientemente con un generador de corriente eléctrica, se utilizan para decrementar la temperatura del sistema, desde temperatura ambiente hasta aproximadamente unos -25°C . El ritmo de enfriamiento depende (suponiendo un flujo de agua constante) de la intensidad que alimenta a los peltiers.

Otras dos placas peltier se utilizan para detectar las reacciones endotérmicas o exotérmicas que ocurren en su superficie. Es necesario el uso de dos peltiers en la detección para que el único evento que se detecte sea la absorción o expulsión de calor debida al cambio de estado de la muestra, que se coloca sobre solamente una placa peltier (y distinguirlo de las diferentes temperaturas que se dan en las dos caras del peltier en el proceso de enfriamiento o calentamiento).

Por otra parte, era necesario que ambos peltiers sensores fuesen enfriados exactamente de la misma forma, de otra forma la detección del calor latente de fusión de las muestras podría ser confundida con los procesos de enfriamiento o calentamiento.

En las siguientes figuras se observan imágenes y esquemas del aparato.

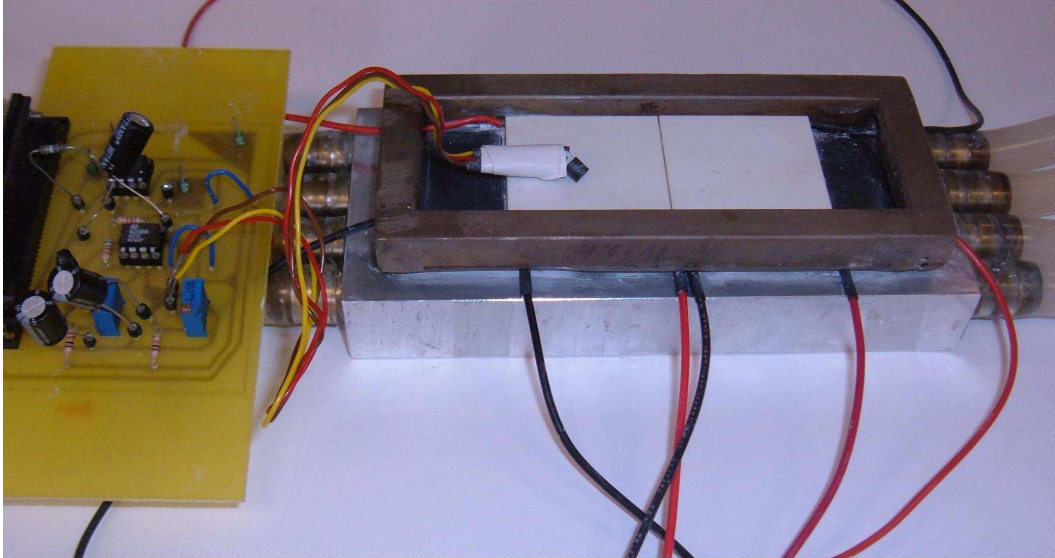


Fig. 21. Droplet Nucleation Analyzer En la imagen se puede observar el instrumento utilizado

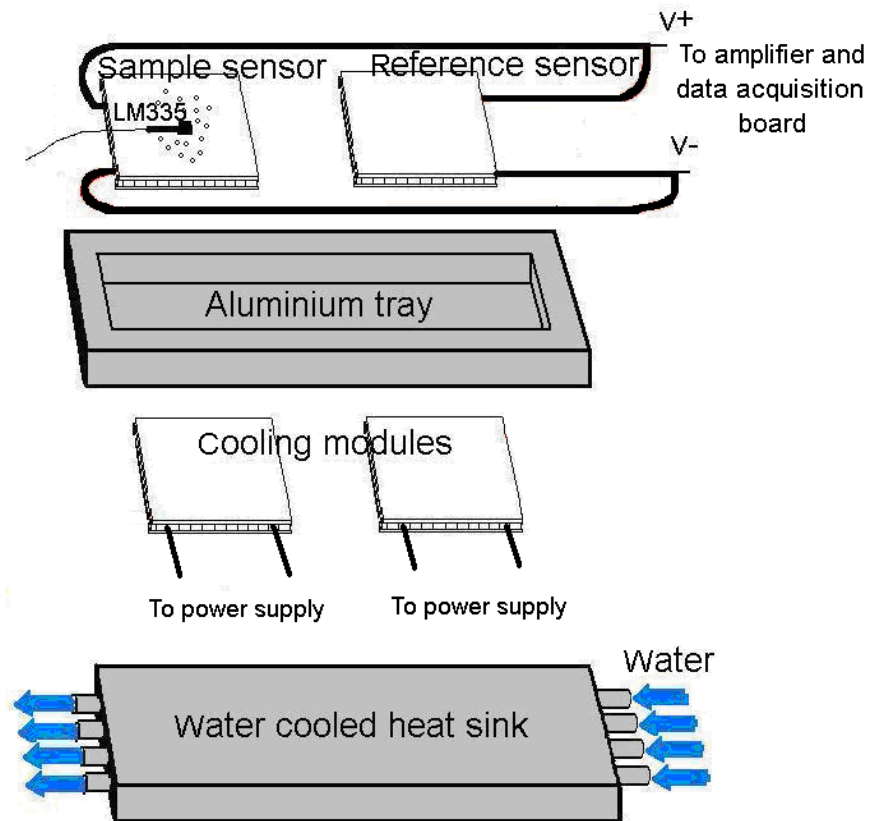


Fig. 22. Droplet Nucleation Analyzer. Las dos placas peltier de abajo, junto con el refrigerador sirven para enfriar el sistema. La bandeja de aluminio uniformiza la temperatura, de forma que los peltier sensores se enfríen de la misma forma. Los dos peltiers sensores están conectados positivo con negativo, para cancelar cualquier

variación en la temperatura que no provenga de las reacciones de cambio de estado ocurrientes en la muestra, que se sitúa en sólo una de los dos peltier sensores

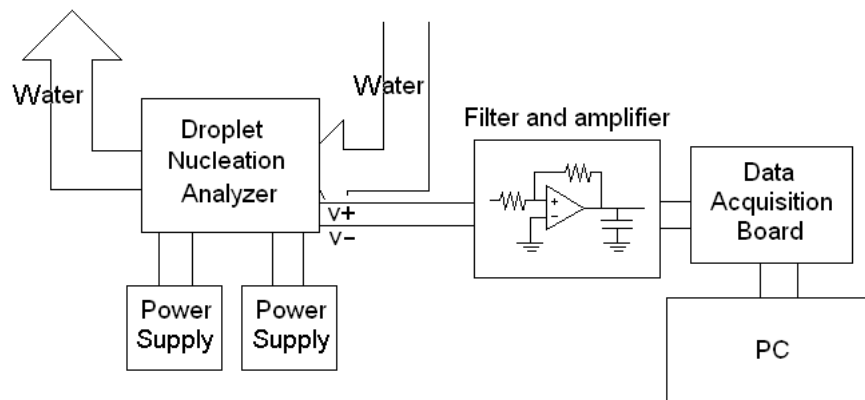


Fig. 23. Setup completo utilizado en los experimentos. Dos fuentes de alimentación eran necesarias ser conectadas a los peltier que enfriaban. El ritmo de enfriamiento se controla mediante la intensidad que se les suministraba a las mismas. La señal de salida del Droplet Nucleation Analyzer era filtrada y amplificada, y almacenada en el ordenador mediante una tarjeta de adquisición de datos. Mediante el software implementado se podía controlar parámetros tales como la tasa de adquisición o la sensibilidad.

La temperatura de la superficie de los peltiers en donde se colocaba la muestra se obtenía con un sensor de temperatura LM335 (Nacional Instruments).

Durante cada enfriamiento, tanto la temperatura del sistema como la señal de detección de la congelación de las gotas son capturadas por una tarjeta de adquisición y enviadas a un PC, donde se implementó un programa en HP VEE 5.0. La típica gráfica obtenida por el aparato se muestra en la siguiente figura.

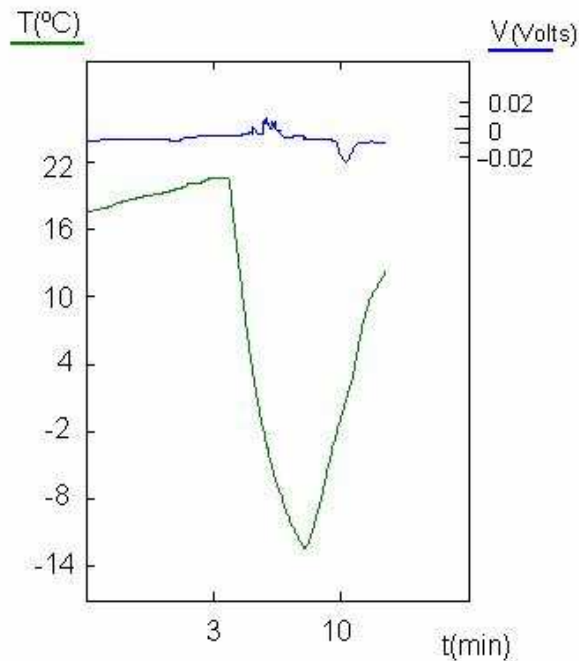


Fig. 24. Señales capturadas por el Droplet Nucleation Analyzer. La línea verde representa la temperatura del sistema, que puede decrecer desde temperatura ambiente a unos -25°C (en este experimento el enfriamiento se interrumpió en -14°C). La línea azul representa el voltaje equivalente al calor de fusión liberado por las gotas en su cristalización

La línea verde representa la temperatura del sistema, que decrece a unos 7°C por minuto. La línea azul representa la detección de la congelación de las muestras. El área encerrada por los picos y la horizontal representa el calor latente de fusión desprendido por las gotas en la cristalización. El proceso de descongelación también es recogido por el instrumento, con picos de la línea azul ahora en sentido inverso.

5.2.2. Nucleación en el Droplet Nucleation Analyzer

La nucleación de las gotas de muestra ocurrentes en el aparato es del tipo heterogénea. El ángulo de contacto entre la superficie del Peltier y la gota de muestra determina la

temperatura de nucleación. Éste ángulo de contacto es difícil de medir y depende de la naturaleza de la muestra que se coloque en el instrumento.

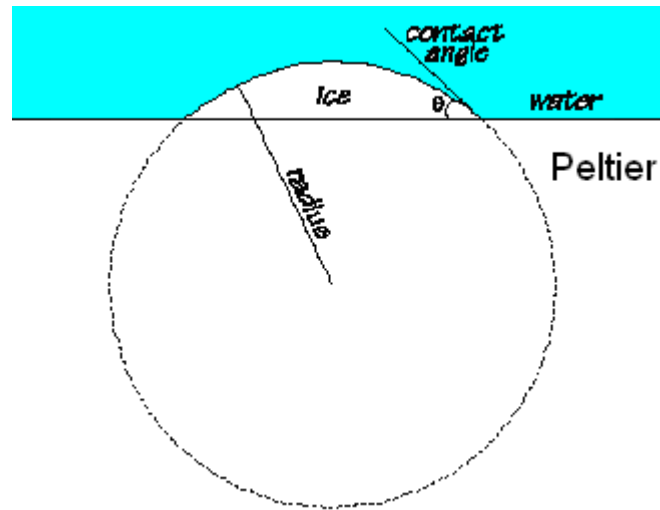


Fig. 25. Nucleación en el Droplet Nucleation Analyzer

Esta temperatura de nucleación media también se observó que dependía de otros factores, como son:

- Tamaño de las gotas de muestra: Volúmenes grandes de la muestra incrementan la temperatura de nucleación.
- Ritmo de enfriamiento: Ritmos de enfriamientos elevados decrementan la temperatura de nucleación (fácilmente comprensible si se tiene en cuenta la naturaleza estocástica del proceso de nucleación)
- Superficie de contacto: Se construyeron otras superficies de contacto con aluminio muy pulido que se situaron entre la superficie del peltier y la muestra a congelar. Con cada superficie de contacto se obtenía una temperatura de nucleación media característica, correspondiendo las temperaturas más bajas a las superficies más pulidas.

En todos los experimentos realizados con el Droplet Nucleation Analyzer, el aparato demostró su excelente:

- Sensibilidad: La sensibilidad de este instrumento en la presente configuración es suficiente como para identificar la nucleación de una gota de un tamaño mínimo de 0.3µl, discerniéndola del ruido externo (proveniente por ejemplo de la condensación de vapor de agua). Esta sensibilidad, incluso, podría ser adaptada para volúmenes de gotas menores.
- Precisión: El aparato es capaz de detectar la temperatura de nucleación con una precisión de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
- Repetibilidad: aunque difícil de medir en procesos de congelación, las medias y desviaciones estándar de los experimentos realizados dan en su mayor parte resultados bastante buenos. La descongelación siempre tiene lugar a los 0°C , como cabría esperar.

Se llevaron a cabo dos series de experimentos distintos para estudiar la influencia de los ultrasonidos en la nucleación del hielo. En primer lugar, se estudió la influencia de ultrasonidos a niveles menores del umbral de cavitación aplicados durante el proceso de congelación. Por otra parte, se trató de repetir los experimentos de V. K. Lamer y R. Smith-Johannsen.

5.2.3. Equipamiento de ultrasonido

El equipamiento de ultrasonido utilizado en los experimentos estaba compuesto por un generador de ultrasonidos (Phywe 117493.44) con cabezal incluido y una sonda (Phywe 11744.00) conectada a un osciloscopio para la medición de las ondas ultrasónicas.

El generador de ultrasonidos produce tanto ondas ultrasónicas sinusoidales como pulsos ultrasónicos, si bien sólo las ondas sinusoidales fueron utilizadas en nuestros experimentos. La frecuencia de estas ondas está fijada en 800 khz, pudiendo variar la amplitud.

5.3. Experimentos y Resultados.

5.3.1. Ultrasonidos aplicados durante el proceso de enfriamiento

Con la realización de estos experimentos se pretendía arrojar alguna luz sobre las contradicciones comentadas anteriormente en el estudio de la influencia de los ultrasonidos a niveles de intensidad menores de cavitación en la nucleación de hielo.

Para el estudio de la influencia de ondas ultrasónicas en la nucleación del agua se diseñaron esta serie de experimentos. Cada experimento consistía de dos enfriamientos de una muestra de 15 gotas de agua. El primer enfriamiento se realizaba con la influencia del campo de ultrasonidos. El segundo se realizaba sin la presencia de ultrasonidos.

La aplicación de ultrasonidos durante el proceso de enfriamiento se muestra en las siguientes figuras.

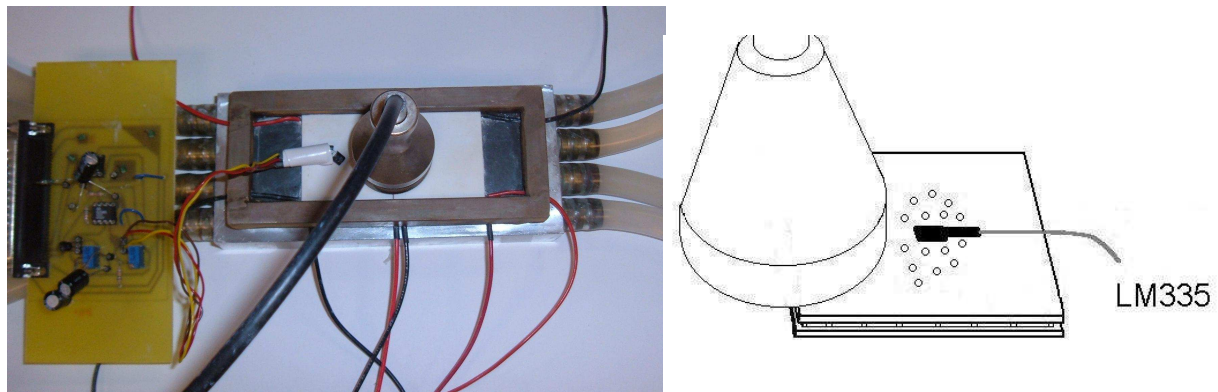


Fig. 26. Aplicación de ultrasonidos en el Droplet Nucleation Analyzer. El cabezal de ultrasonidos se colocó entre las dos placas peltier sensores

Como puede apreciarse, se colocó el cabezal de ultrasonidos entre ambas placas peltier. Como era necesario que los dos peltiers sensores se enfriasen exactamente igual, se hubo de tener un cuidado extremo en la colocación de este cabezal.

Las gotas se colocaban en una placa peltier, rodeando al sensor de temperatura. Se tuvo especial cuidado en que las gotas que rodeaban al sensor de temperatura estuviesen lo bastante próximas como para que no hubiese diferencia de temperaturas entre ellas. Para ello se emplearon los sensores de termopar tipo T.

Al colocar el cabezal de ultrasonidos en esa posición, aplicando una potencia de 11.34 W, las gotas sólo recibían aproximadamente $0,15 \text{ W/cm}^2$, aproximadamente, al ser medidos con la sonda Phywe. Con esta intensidad de ultrasonidos recibida, no se producía cavitación, como podía ser observado a simple vista, y se observaba que en la cubierta de metacrilato se formaba una capa de vapor de agua que será comentada con más detalle en el capítulo 7.

Los ultrasonidos provocan calentamiento, por lo que era necesario compensar este aumento de la temperatura con una mayor intensidad en los peltiers que enfrían. Era necesario comprobar que el enfriamiento había sido exactamente igual, comparando los enfriamientos como muestra la siguiente figura.

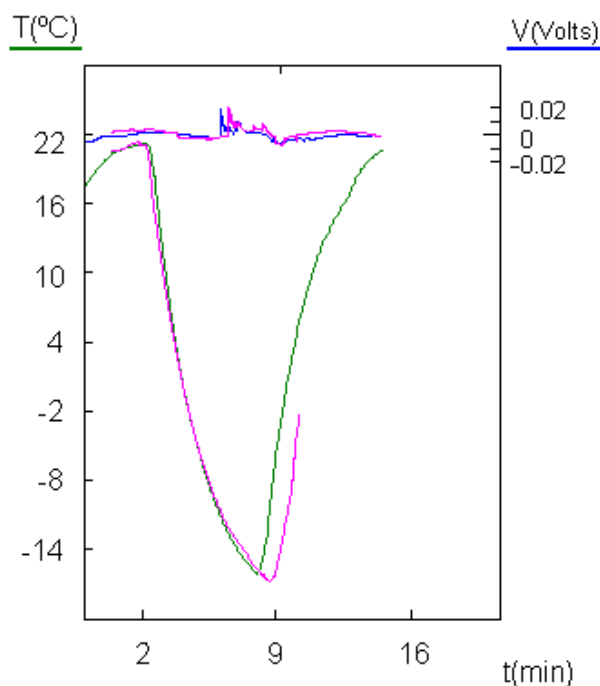


Fig. 27. Comparación de ritmos de enfriamiento. La línea rosa representa el enfriamiento sin la presencia de ultrasonidos, solapada con el primer enfriamiento, en presencia de ultrasonidos. El enfriamiento ha sido igual.

En esta figura la línea rosa representa el enfriamiento sin la presencia de ultrasonidos, mientras que las líneas azul y verde representan el enfriamiento con ultrasonidos. Se puede comprobar que el enfriamiento ha sido igual.

De igual forma, era necesario que las gotas de agua estuviesen colocadas en la misma área de la superficie del Peltier. Como fue comprobado con el termopar tipo T, al enfriar con el cabezal de ultrasonidos la temperatura variaba en algunos grados entre distintas zonas del peltier.

Como puede verse en las siguientes gráficas, no se obtuvo ninguna diferencia significativa al emplear ultrasonidos durante el enfriamiento y no emplearlos.

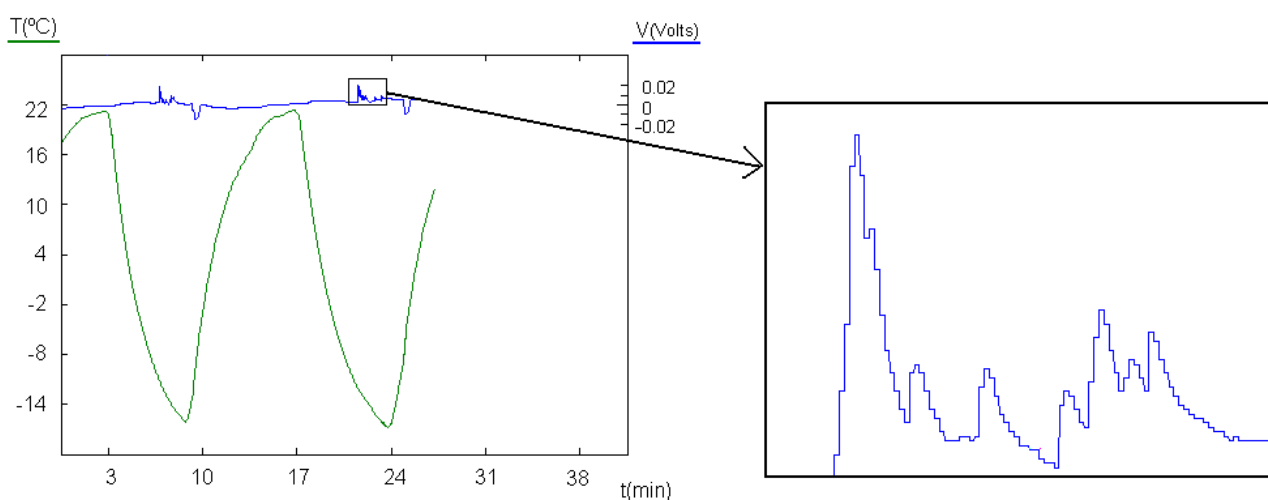


Fig. 28. Típica gráfica obtenida en cada experimento. Detalle de la nucleación de las gotas. Vemos en la gráfica de la izquierda los dos enfriamientos que componen cada experimento. El primero de ellos se realiza con la presencia de ondas ultrasónicas. El segundo de ellos se realiza sin ultrasonidos. A la derecha podemos ver un detalle de la nucleación de las gotas, que podrían ser individualmente identificadas.

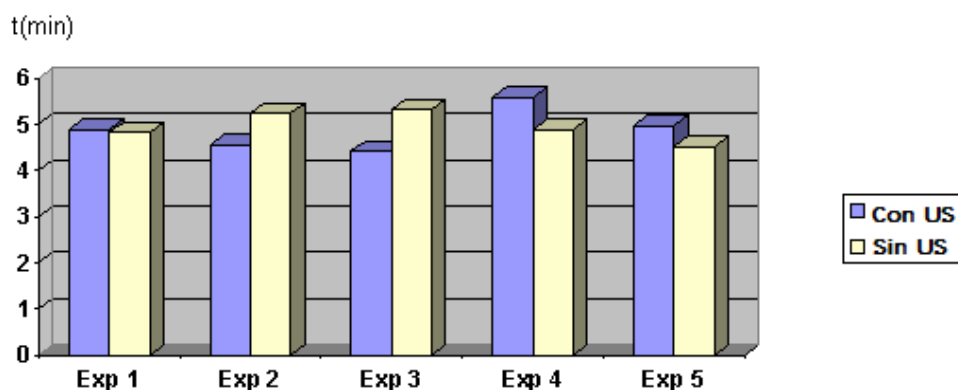


Fig. 29. Tiempo medio de congelación para cada experimento

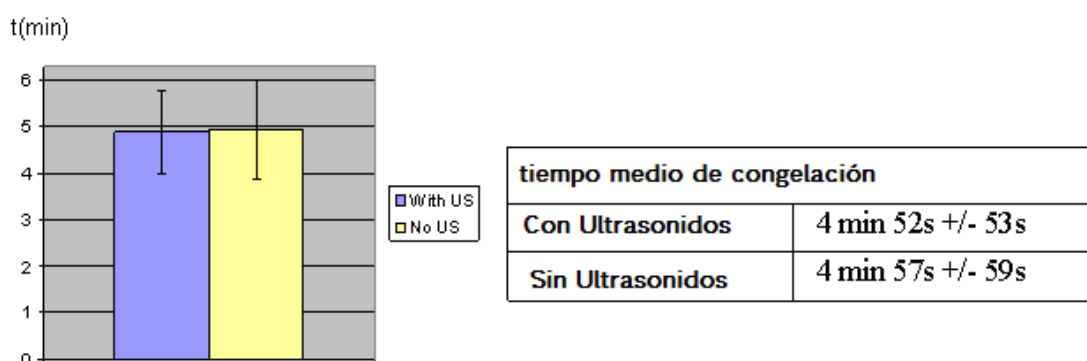


Fig. 30. Tiempo medio de congelación para todos los experimentos

En el Anexo II (Use of a Droplet Nucleation Analyzer in the study of water freezing kinetics under the influence of ultrasound waves) se comenta con un mayor detalle los experimentos realizados.

Se realizaron cerca del centenar de experimentos, a pesar de que en el artículo sólo se comentan los últimos experimentos realizados, por ser los más fiables. Se probaron distintas muestras de agua, destilada y desionizada (HPLC- Sigma). También se probaron distintas posiciones del cabezal de ultrasonidos, para comprobar si las ondas longitudinales tenían algún efecto visible. Todos los experimentos realizados apuntan en la misma dirección, la no influencia de los ultrasonidos en la nucleación del agua, a niveles de intensidad menores que el de cavitación. No pudieron llevarse a cabo estudios de la cavitación puesto que la pérdida de

las ondas ultrasónicas que producía el aparato, para todas las posiciones del cabezal de ultrasonidos, impedía llegar a los niveles de intensidad necesarios para la cavitación.

5.3.2. Ultrasonidos aplicados antes del proceso de enfriamiento

Con esta segunda tanda de experimentos se pretendía comprobar los resultados experimentales de V. K. Lamer y R. Smith-Johannsen, que podrían ser de gran interés para la criopreservación.

Cada experimento consistía en otros dos enfriamientos de 20 gotas del mismo agua HPLC. Antes del segundo enfriamiento, se introducía la muestra de agua en un campo de ultrasonidos durante 3 minutos a la máxima potencia que nuestro generador de ultrasonidos podía conseguir, en la que la cavitación era perfectamente visible. Otras 20 gotas tratadas con ultrasonidos se volvían a enfriar en nuestro Droplet Nucleation Analyzer.

Como puede apreciarse en las siguientes gráficas, tampoco se obtuvo ningún efecto apreciable de los ultrasonidos, contradiciendo aparentemente los experimentos de Lamer y Smith-Johannsen.

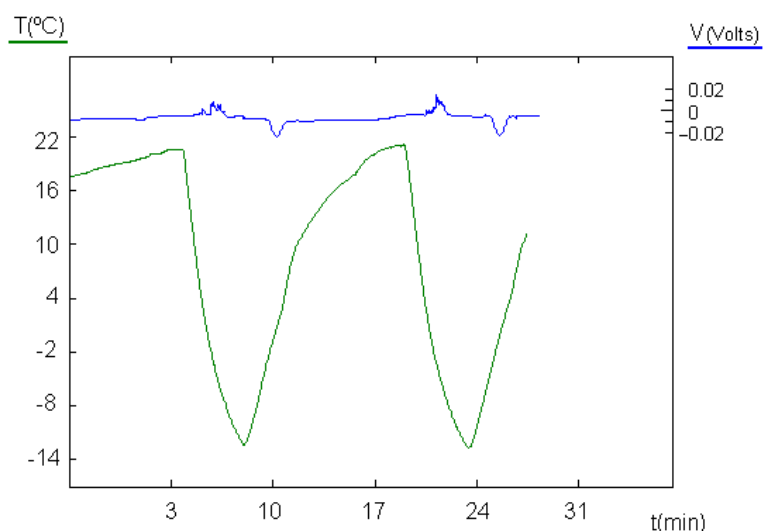


Fig. 31. Típica gráfica obtenida. El segundo enfriamiento tiene lugar tras hacer pasar el agua por el tratamiento de ultrasonidos

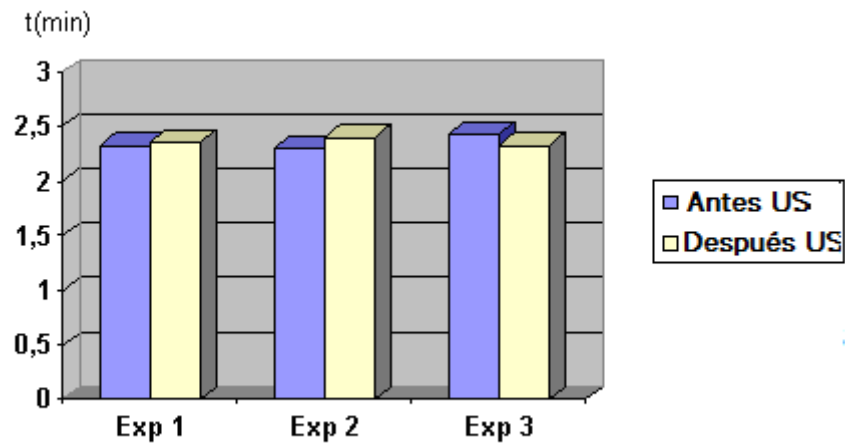


Fig. 32. Tiempo medio de congelación para cada experimento

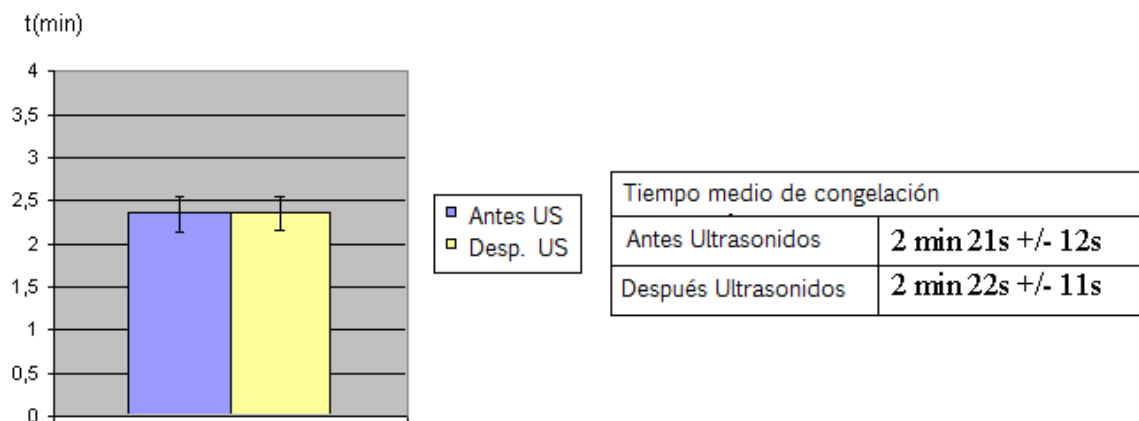


Fig. 33. Tiempo medio de congelación para todos los experimentos

En el Anexo II (Use of a Droplet Nucleation Analyzer in the study of water freezing kinetics under the influence of ultrasound waves) se comentan también con un mayor detalle los experimentos realizados.

De igual forma, aparte de los experimentos comentados en el artículo, se realizaron otros 50 o 60 experimentos, con otros tipos de agua (destilada, desionizada), diferentes tamaños (hasta 1 ml) y otras superficies de contacto con las gotas, como metales muy pulidos. El tratamiento con ultrasonidos también fue muy variado, variando todo el rango de intensidad

y tratando el agua durante diferentes tiempos (desde 30 segundos hasta 6 minutos). Los resultados siempre han sido claros y bastante repetibles, y apuntan en la misma dirección que los comentados en el artículo.

5.4.- Discusión de los resultados

5.4.1. Ultrasonidos aplicados durante el proceso de enfriamiento

La no influencia aparente de los ultrasonidos durante el proceso de nucleación del hielo (a la frecuencia que usamos, 800 Khz y a niveles de intensidad menores del umbral de cavitación), parecen ir en la línea de los resultados experimentales obtenidos por R. Chow, contradiciendo los resultados obtenidos por T. Hozumi.

Sin embargo, se ha realizado un estudio teórico para explicar algún posible efecto que los ultrasonidos pudiesen ocasionar en la nucleación del hielo, a otra frecuencia distinta a la empleada en estos experimentos. Teóricamente podría ser posible impedir la nucleación de hielo mediante la acción de las ondas ultrasónicas durante el proceso de enfriamiento como se explica a continuación.

Para la formación de un embrión de hielo estable, que continúe creciendo, es necesario que se unan un número suficiente de moléculas de agua que es función de la temperatura. La expresión del radio crítico necesario para que el embrión de hielo sea estable nos la da la ecuación de Kelvin

$$R^* = \frac{2\sigma T_f}{L_f \Delta T} \quad (11)$$

Donde σ es la tensión superficial, T_f es la temperatura de equilibrio y L_f es el calor latente de fusión. Usando un valor de 2056.07 J/m^2 para σ , podemos dibujar el radio crítico en función de la temperatura.

Critical radius (μm)

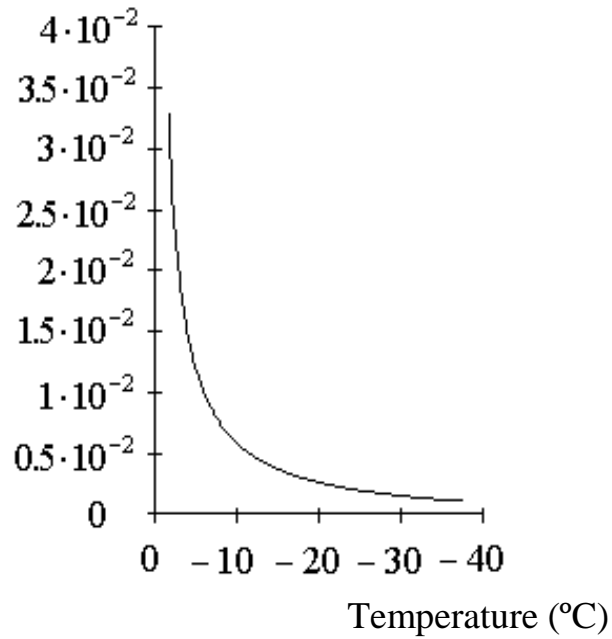


Fig. 34. Radio crítico en función de la temperatura. Vemos que el radio crítico decrece con la temperatura. A menor temperatura será más fácil encontrar un núcleo de moléculas de agua estable

Si la frecuencia de resonancia del cristal crítico se acerca a la frecuencia de ultrasonidos empleada, los ultrasonidos podrían impedir en cierta forma la adhesión de nuevas moléculas al núcleo de hielo, con lo que sería posible en teoría impedir el crecimiento de éste.

La frecuencia de resonancia del cristal de hielo es

$$F = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{AY}{ml_0}} \quad (12)$$

donde A es el área transversal del cristal, Y es el módulo de Young, m es la masa del cristal y l_0 es la longitud del cristal.

Para un cristal de hielo de $6 \times 6 \times 6$ moléculas como una primera aproximación, teniendo en cuenta que el hielo Ih a -20°C tiene un volumen por molécula de $32.53 \times 10^{-30} \text{ m}^3$ [43] y una densidad de 919.7 Kg/m^3 , la masa calculada del cristal es $7.25 \times 10^{-24} \text{ Kg}$, la longitud del cristal (l_0) es $180 \times 10^{-10} \text{ m}$ y el área transversal (A) es $3.68 \times 10^{-16} \text{ m}^2$.

El valor que usaremos para el módulo de Young es $93.3 \times 10^8 \text{ N/m}^2$, que corresponde al hielo policristalino a -16°C .

Por tanto, la frecuencia de resonancia, calculada de (11) resulta:

$$F = 2.6 \cdot 10^{10} \text{ Hz} \quad (13)$$

La frecuencia del campo de ultrasonidos utilizada en nuestros experimentos (800 Khz) es considerablemente más baja que la frecuencia calculada, lo que podría explicar los resultados obtenidos con nuestro Droplet Nucleation Analyzer. $2.6 \times 10^{10} \text{ Hz}$ es también mayor que todas las frecuencias de ultrasonidos empleadas en experimentos hasta la fecha, pero los límites actuales (debido a limitaciones prácticas en la generación de vibraciones mecánicas) se sitúan en 20 Ghz , por lo que experimentos a las frecuencias calculadas en (13) podrán ser pronto posibles.

Para impedir el crecimiento del núcleo de hielo sería también preciso que entrase rápidamente en resonancia con el campo ultrasónico aplicado, y que la oscilación de este núcleo fuese la suficiente como para impedir la adhesión de nuevas moléculas de agua, por lo que no se puede tener por el momento la certeza de que éste método sea efectivo para impedir la nucleación del hielo.

5.4.2. Ultrasonidos aplicados antes del proceso de enfriamiento. Explicación de los resultados de V. K. Lamer y R. Smith-Johannsen

Los resultados obtenidos con nuestro Droplet Nucleation Analyzer difieren claramente de los obtenidos por V. K. Lamer y R. Smith-Johannsen en sus trabajos experimentales [31],[32].

Aparte de los experimentos explicados en la sección anterior, se intentó obtener sus mismos resultados cambiando parámetros como volumen de las gotas de agua, tipo de agua (normal, destilada, deionizada, ultrapura HPLC), ritmo de enfriamiento y superficie de separación entre la muestra y el peltier (se probó con diferentes superficies de aluminio muy pulido). También se probó a variar el tratamiento con ultrasonidos utilizando varios niveles de potencia (sin y con cavitación visible) y tiempo de tratamiento (desde 30 segundos hasta 6 minutos). En todos los casos los resultados fueron negativos, obteniendo iguales resultados para el tiempo y temperatura de nucleación del hielo antes y después del tratamiento con ultrasonidos, con una gran repetibilidad.

Sin embargo, el prestigio de las revistas en donde fueron publicados los trabajos experimentales de V. K. Lamer y R. Smith-Johannsen y la coincidencia entre ambos (aparte de su gran interés para la mejora de la criopreservación) nos llevaron a realizar un estudio más detallado de este fenómeno.

Este estudio nos llevó a la relación de dos fenómenos que podrían explicar los resultados obtenidos por estos dos grandes científicos, que en su momento no pudieron explicar lo sucedido en sus experimentos. Hablamos del efecto de degasificación que producen los ultrasonidos en el agua y el efecto de las burbujas de aire en la nucleación del agua.

Influencia de la gasificación en la nucleación del hielo

Tradicionalmente se pensaba que las burbujas de aire disueltas en agua no actúan como centros de nucleación. Sin embargo, años más tarde se comprobó como el estado de gasificación del agua juega un importante papel en el proceso de nucleación.

En nuestra investigación sobre el efecto de los ultrasonidos en la nucleación del hielo encontramos artículos como el de S. Takeya [46] y el de X. Zhang [47], en los que se muestra como la degasificación del agua produce una probabilidad de nucleación mucho menor que el agua sin ser sometida al proceso de degasificación.

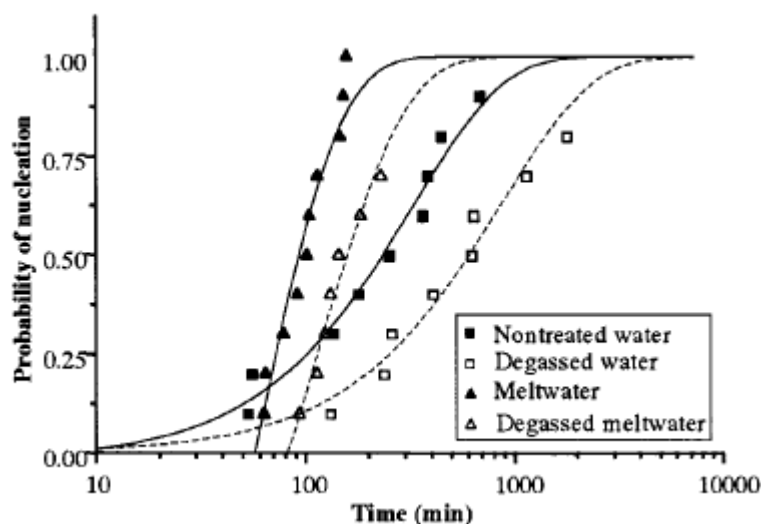


Fig. 35. Probabilidad de nucleación en función del tiempo para distintas muestras de agua. [46]. Obsérvese que la probabilidad más baja de nucleación se da para agua degasificada.

Estos últimos resultados son de por sí muy interesantes para los intereses de la criopreservación y abren nuevas líneas de investigación para el futuro. Mediante la degasificación del agua se podría intentar evitar la formación de hielo, mejorando las actuales técnicas de criopreservación.

Ultrasonidos y degasificación

Llegados a este punto de la investigación, se pensó que los experimentos realizados por Victor K. Lamer y por R. Smith-Johannsen podrían estar relacionados de alguna manera con estos últimos experimentos, por lo que se buscó información sobre la forma de degasificar el agua.

Los métodos que se han empleado tradicionalmente en la degasificación del agua han sido la degasificación térmica (se degasifica el agua calentándola) y la degasificación mediante vacío. Sin embargo, hay una tercera forma de degasificar líquidos que viene a respaldar nuestra hipótesis: la utilización de ultrasonidos.

El proceso de degasificación del agua que producen los ultrasonidos se puede resumir en los siguientes puntos [48],[49]:

1.- Las microburbujas de aire contenidas en el agua crecen por difusión de gas desde el líquido al interior de éstas.

En presencia de un campo de ondas ultrasónicas, sobre todo a niveles de cavitación, (aunque no es imprescindible), se favorece la difusión de gas desde el líquido hacia la burbuja.

Durante la pulsación de la burbuja que producen los ultrasonidos, la superficie de la burbuja expandida es mucho mayor que cuando está comprimida. Por tanto, la cantidad de gas que entra en la burbuja durante su extensión es mayor que la cantidad de gas que escapa durante la compresión. Además, el espesor de la capa de difusión que rodea a la burbuja disminuye en su extensión, favoreciendo igualmente la entrada de gas en la burbuja.

El ritmo de crecimiento depende del tamaño inicial de la burbuja, la intensidad de las ondas ultrasónicas y de su frecuencia.

2.- Formación de burbujas de aire mayores

Las microburbujas de aire sometidas a la acción pulsante del campo ultrasónico se unen y forman macroburbujas, debido a la acción de fuerzas de Bjerknes, al desarrollo de microflujos que se forman en la vecindad de las microburbujas pulsantes, y a la acción de la presión de radiación acústica.

Las fuerzas de Bjerknes son fuerzas de interacción que aparecen entre dos burbujas que pulsan a la misma frecuencia en un fluido incompresible. Si vibran en fase, esta fuerza de interacción

es positiva, y da lugar a una atracción entre las burbujas. Si vibran en antifase tiene lugar la repulsión entre ellas. Las vibraciones en fase se dan cuando las burbujas tienen el mismo radio, que es el caso más común en los procesos de degasificación.

Los flujos acústicos que producen los ultrasonidos (acoustic streaming, movimiento unidireccional del líquido) influyen en el proceso de formación de burbujas mayores de dos formas: 1) pueden variar la velocidad trasnacional de las burbujas, y 2) la probabilidad de coalescencia de burbujas puede incrementarse en virtud del gradiente de velocidad producido en el líquido.

La presión de radiación acústica es la presión estacionaria y unidireccional que se ejerce sobre una superficie expuesta a una onda sonora. Esto crea en el volumen del líquido una distribución de burbujas por tamaño en planos definidos, llamados nodos y antinodos de la onda, y de esta forma favoreciendo igualmente la probabilidad de coalescencia de burbujas.

3.- Degasificación

Las macroburbujas escapan del líquido por flotación, subiendo a la superficie con una velocidad de ascensión que depende de su radio. La presión de radiación acústica incrementa el ritmo de ascensión de la burbuja en una cierta cantidad, aunque este incremento es sólo significativo para burbujas del tamaño de resonancia o similar.

La degasificación de líquidos mediante ultrasonidos se lleva a cabo independientemente de que haya o no **cavitación**. Sin embargo, el desarrollo de cavitación en un cierto rango de intensidades promueve la liberación acelerada de gas del líquido, debido tanto a un incremento en el número de núcleos a partir de los cuales se desarrolla el proceso explicado anteriormente como a una intensificación de los efectos de difusión en la interfaz burbuja-agua.

Hemos supuesto tres fases del proceso de degasificación por simplicidad. En realidad, sin embargo, estos procesos ocurren paralelamente, complicando el problema.

Explicación de los experimentos

Podría existir una relación entre los antiguos experimentos de V.K. Lamer y R. Smith-Johannsen y la degasificación del agua. El uso de las ondas ultrasónicas a niveles de cavitación podría producir la degasificación del agua y el consiguiente retardo en el tiempo y temperatura de nucleación. Estas pequeñas burbujas de aire, que durante tanto tiempo ni se observaban, ni se pensaban que influían en la nucleación del agua, podrían ser aquellos “*unknown nuclei*” que Victor K. Lamer intuía que eliminaban los ultrasonidos pero no llegaba a comprender.

En nuestros experimentos, la nucleación heterogénea producida en la interfaz peltier-gota de agua estaría ocultando los efectos conseguidos por los ultrasonidos sobre la muestra de agua y podría estar produciendo esta aparente contradicción con los resultados de estos dos científicos.

Al haber una gran falta de detalles en relación a los experimentos realizados por V. K. Lamer y R. Smith-Johannsen, no podemos afirmar rotundamente que la degasificación del agua fuese la causante de esos efectos. Llama la atención que V. K. Lamer intentase con anterioridad retrasar la nucleación del agua mediante la degasificación del agua mediante calentamiento, sin resultado alguno (algo que contradice los trabajos nombrados anteriormente). Es posible que con el empleo de ultrasonidos consiguiese una degasificación más eficiente que con el calentamiento.

Será necesario, para comprobar nuestra hipótesis, plantear otra serie de experimentos con otro set-up, como pueden ser las emulsiones de agua en aceite (método tradicional de estudiar la nucleación homogénea).

Este trabajo ha originado un paper aceptado para publicación en la revista *Cryobiology* (ver anexo III, *Cryopreservation and Ultrasounds: Why dig up the past?*)

Capítulo 6. Monitorización de la concentración de crioprotector mediante medidas de bioimpedancia

En el capítulo 4 vimos como existen técnicas que permiten la vitrificación de tejidos y órganos sin necesidad de emplear velocidades de enfriamiento muy elevadas, inviables en este tipo de material biológico. En estos casos es de suma importancia monitorizar con precisión la concentración de crioprotector que es perfundida en el interior del tejido o del órgano.

Muchos parámetros biológicos y procesos pueden ser detectados y controlados mediante la medida de su bioimpedancia, con la ventaja de ser una técnica no invasiva y relativamente barata. El crecimiento de la célula, los cambios en la composición celular o los cambios en la ubicación de la célula son sólo algunos ejemplos de procesos que pueden ser detectados por microelectrodos mediante cambios de impedancia. [50][51][52].

En este capítulo 6 se resume el estudio realizado de la utilización de medidas de bioimpedancia en criopreservación. Mediante la utilización de medidas de bioimpedancia se pretende conseguir un control más adecuado de la cantidad de crioprotector que entra en el material biológico en cada instante, de forma no invasiva, complementando los métodos vistos anteriormente para evitar la formación de hielo en tejidos y órganos en sus procesos de criopreservación.

Se ha estudiado, mediante simulaciones con COMSOL Multiphysics Software, la eficiencia de utilizar medidas de bioimpedancia para determinar la concentración de crioprotector en el interior de fibroblastos 3T3 y monocapas de células madre mesenquimales. Se ha estudiado la influencia de la frecuencia utilizada, geometría de los electrodos e influencia de la temperatura en las medidas de bioimpedancia.

El capítulo comienza con el estudio del modelo teórico del sistema célula – electrodo, necesario para la construcción de modelos teóricos más complejos y para las posteriores simulaciones realizadas.

6.1. Modelo teórico del sistema célula- electrodo implementado

Los modelos eléctricos célula-electrodo son claves para la correspondencia entre simulaciones y comportamiento real de los sistemas, y por lo tanto, para la decodificación correcta de los resultados obtenidos experimentalmente, lo que se conoce en general como el problema de reconstrucción. [59], [60].

En primer lugar se hizo una amplia revisión de los modelos celulares existentes, tanto para el material biológico como para la interfaz electrodo-electrolito, de suma importancia para la impedancia total. Se han estudiado en profundidad los siguientes subsistemas: interfaz electrodo-electrolito, separación electrodo – célula, interfaz célula – electrolito, membrana celular, interior celular. En la siguiente figura (extraída del modelo de Joye et al. [61]) podemos ver esquemáticamente estas zonas.

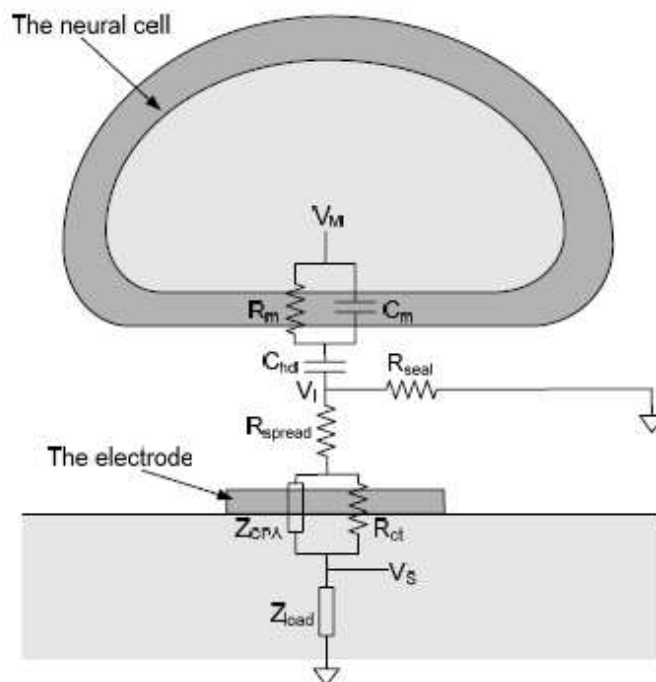


Fig. 36. Modelo completo electrodo-célula en Joye et al, 2008.

6.1.1 Interfaz electrodo - Solución iónica

La impedancia de los electrodos en líquidos iónicos ha sido ampliamente estudiada. Cuando un sólido (incluyendo metales, semiconductores y aislantes) se sumerge en una solución iónica o electrolito, los iones en la solución pueden reaccionar con el electrodo y los iones sólidos del electrodo pueden añadirse a la solución, dando lugar a complejas reacciones en la interfaz, y desarrollándose una interfaz electrificada o doble capa en la interfaz de las dos fases.

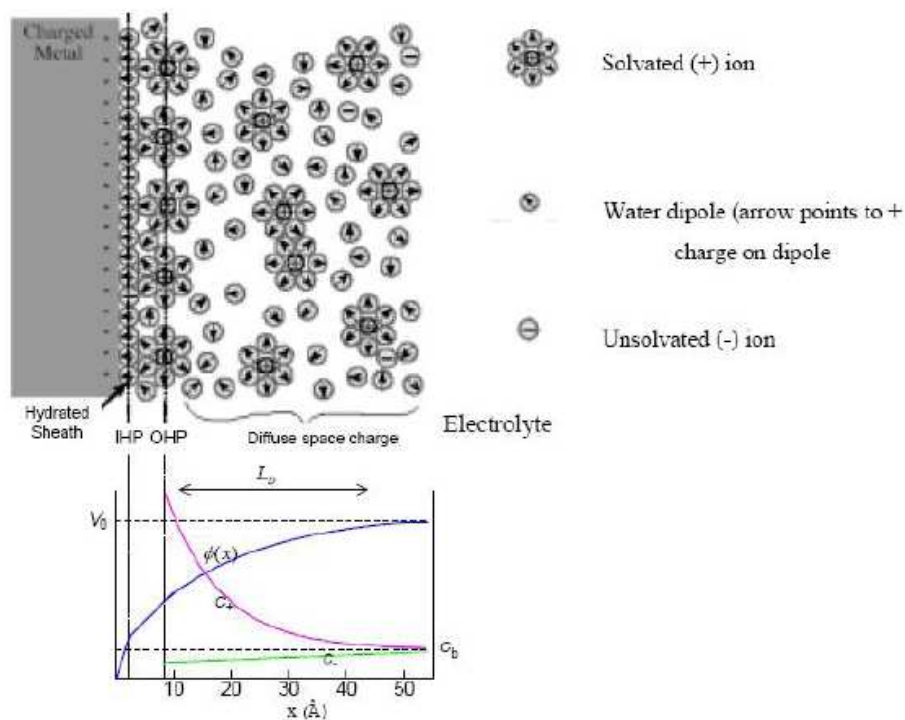


Fig. 37. Modelo interfaz electrodo – electrolito. Se aprecia el significado físico de la doble capa. En la figura inferior se representa la variación del potencial eléctrico con la distancia.

Este complejo sistema puede ser modelado usando elementos circuitales pasivos, como ha sido descrito en numerosos textos de biomedicina y electroquímica. Nosotros vamos a centrarnos en la respuesta de un electrodo metálico sumergido en una solución iónica, analizando cada uno de los elementos que conforman dicha doble capa.

Cuando una corriente sinusoidal suficientemente pequeña se aplica al electrodo en equilibrio, el potencial del electrodo será modulado por un sobrepotencial sinusoidal. Dentro

del rango de comportamiento lineal, el fasor que relaciona el sobrepotencial de salida con la corriente de entrada define la impedancia de polarización AC. Durante la pequeña perturbación de corriente, tienen lugar tanto transferencia de carga debido a las reacciones químicas como difusión de masa en la superficie del electrodo. [60].

La interfaz electrificada puede ser considerada como la conexión en serie de dos capacidades de placas paralelas del espesor de la capa compacta (electrodo-IHP) y de la capa difusa (IHP-OHP) respectivamente con un dieléctrico acuoso. Esta es la capacitancia interfacial electrodo-solución de la doble capa (C_1). Además de la capacitancia de doble capa C_1 , la interfaz electrodo-solución tiene una impedancia farádica que representa la barrera al flujo de corriente entre el electrodo y la solución, incluyendo una pequeña tasa de transporte de masa y de transferencia electrónica en la superficie del electrodo.

Estos fenómenos están representados en la siguiente figura, en donde la impedancia farádica está en paralelo con la capacitancia de doble capa. La corriente que circula a través de la interfaz electrificada se encontrará una resistencia R_{ct} causada por la transferencia electrónica en la superficie del electrodo y una impedancia Warburg Z_w debido a la difusión limitada de masa de la superficie del electrodo a la solución. Como resultado, en el circuito equivalente, la resistencia de transferencia electrónica R_{ct} está en serie con la impedancia de transferencia de masa limitada Z_w . Según la corriente se propaga hacia el seno de la solución, el electrodo tiene una resistencia en serie determinada por la conductividad de la solución, representada como la resistencia de propagación, R_s en el circuito equivalente.

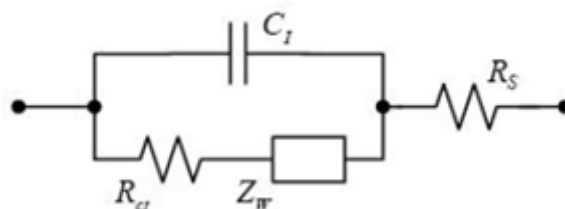


Fig. 38. Circuito equivalente de la interfaz electrodo – solución. C_1 es la capacitancia de la doble capa: la impedancia farádica incluye Z_w , la impedancia de Warburg y R_{ct} , la resistencia de transferencia de carga. R_s es la resistencia de propagación.

6.1.2. Impedancia del material biológico

La célula es la unidad básica de los tejidos vivos. Su estructura básica (una membrana bicapa de fosfolípidos que separa el medio intracelular de medio extracelular) determina la impedancia eléctrica del tejido desde algunos Hz a varias decenas de MHz. (Ivorra)

Desde el punto de vista eléctrico, el medio extracelular se puede considerar como un electrolito líquido (solución iónica). De lejos, los iones más importantes son Na^+ (~ 140 mM) y Cl^- (~ 100 mM). Por lo tanto, las propiedades eléctricas dependen de todos los parámetros físicos o químicos que determinan su concentración o movilidad.

La concentración iónica del medio intracelular es similar a la concentración del medio extracelular (180 mEq / L frente a 153 mEq / L). En este caso, los portadores de carga eléctrica importantes son K^+ , proteínas y ácidos orgánicos + HPO_4^{-2} + SO_4^{-2}

Aparte de los iones y otras moléculas cargadas, dentro de la célula es posible encontrar numerosas estructuras de membrana con una respuesta eléctrica completamente diferente. Estas membranas están formadas por materiales dieléctricos y su conductividad es muy baja. Por lo tanto, la impedancia del medio intracelular debe ser una mezcla de propiedades conductivas y capacitivas. Sin embargo, por simplificación, se acepta generalmente que el medio intracelular se comporta como un conductor puramente iónico

La membrana celular tiene un papel pasivo (separando los medios extra e intracelular) y activo (para controlar el intercambio de diferentes especies químicas). La parte pasiva de la membrana celular es la membrana bicapa lipídica. Esta película (~ 7nm de espesor) permite que los lípidos y moléculas de agua pasen a través de ella, pero, en principio, está completamente cerrada para los iones. Su conductancia eléctrica intrínseca es muy baja y puede ser considerada como un dieléctrico. Por lo tanto, la estructura formada por el medio extracelular, la membrana celular y el medio intracelular es una estructura conductor-dieléctrico-conductor y se comporta como una capacidad (~ 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$).

Dentro de los componentes activos de la célula tenemos los canales iónicos y las bombas de iones. Los canales iónicos son estructuras porosas que permiten que algunos iones

fluyan desde el exterior hacia el interior de la célula o viceversa. Estas estructuras son selectivas a los iones y pueden ser abiertas o cerradas por algunas señales eléctricas o químicas. Las bombas de iones son estructuras de consumo de energía que fuerzan a algunos iones a fluir a través de la membrana. Además de crear una diferencia de voltaje DC través de la membrana, son responsables de mantener la presión hidrostática celular y problemas en su funcionamiento causan edemas celulares.

El circuito equivalente de la membrana se modela frecuentemente como una resistencia R_m en paralelo con una capacitancia C_m .

Al igual que la doble capa formada en la interfaz electrodo-electrolito también se forma otra importante doble capa en la interfaz célula-electrolito, en el que el componente principal es una capacidad, C_{hd} (la capacitancia interfacial célula-electrolito) [60]. Para ver la definición de estos parámetros, al igual que la definición de los parámetros antes nombrados, se puede consultar las distintas referencias citadas. En las próximas secciones describiremos en detalle el modelo utilizado y los valores de los parámetros concretos para la realización de nuestras simulaciones.

6.2. Simulaciones realizadas. Objetivos

Para simular las medidas de bioimpedancia en estos modelos se suelen utilizar elementos finitos con programas tales como FEMLAB. El uso del modo de cálculo DC en estado estacionario es posible mediante la asignación de una conductividad compleja. Este trabajo presenta un método alternativo para la simulación de las interfaces electrodos - célula con el análisis de elementos finitos basado en COMSOL. Se utiliza el modo cuasiestático de COMSOL, el cual también tiene en cuenta también los campos magnéticos para el cálculo de la impedancia eléctrica.

Entre los objetivos que perseguíamos con la realización de las simulaciones tenemos:

- Construir un modelo fiable, que permita simular con COMSOL una gran variedad de situaciones experimentales
- Estudiar la viabilidad de la técnica de medida de bioimpedancia para la medida de concentración de crioprotector
- Optimizar esta técnica, estudiando la influencia de la frecuencia, geometría de los electrodos o temperatura en la medida de bioimpedancia.

6.2.1. Simulaciones iniciales en fibroblastos

El modelo utilizado por Huang et al. [59] fue inicialmente explorado. En su trabajo se modelaban fibroblastos 3T3 de ratón, los cuales se unen estrechamente a las superficies y tienen normalmente una separación con la superficie de la célula de unos $0.15\mu\text{m}$. Las células tienen alrededor de 5 micras de altura y, desde una vista superior, son de forma irregular, con aproximadamente 30-50 micras de extensión. Se consideró una célula circular 30 micras de diámetro, centrada en un electrodo sensor cuadrado de 32 micras por lado. El electrodo de detección fue rodeado por otro electrodo de área mucho mayor.

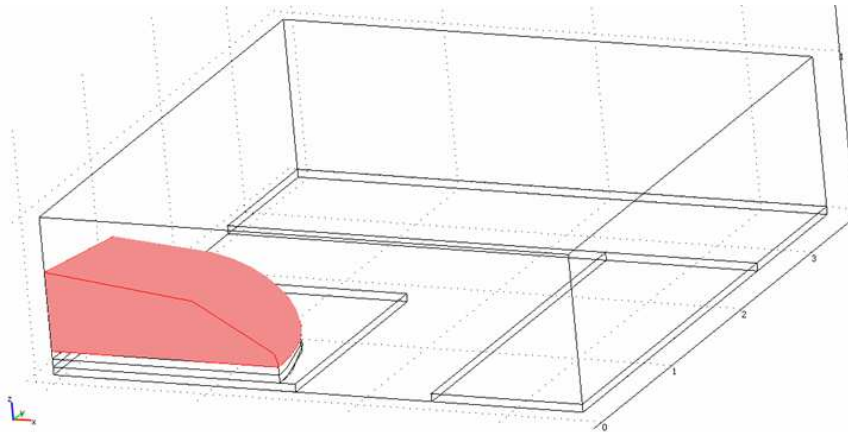


Fig. 39. La geometría del modelo simulado en COMSOL. Sólo un cuarto del sistema electrodo-célula fue simulado, sin pérdida de generalidad.

Los fibroblastos de ratón 3T3 poseen en una fina membrana celular, de aproximadamente 8 nm de espesor que rodea el interior de alta conductividad de la célula. La capacidad de la membrana de la célula es de aproximadamente $C_{\text{mem}} = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [100]. El

medio de cultivo celular simulada por Huang et al. es muy iónico y posee una conductividad de aproximadamente 1,5 S / m. El medio de cultivo celular llena el espacio de aproximadamente 2 nm de espesor entre los electrodos de la célula y forma una doble capa eléctrica (Helmholtz más capa difusa) entre la mayor parte del medio y el electrodo. Se hicieron algunas aproximaciones en el trabajo de X. Huang para facilitar la resolución del problema por FEMLAB. Sólo una cuarta parte de los electrodos fue simulado, sin pérdida de generalidad. Como el problema se caracteriza por una amplia gama de escalas de distancia, era difícil de resolver mediante técnicas de elementos finitos, por lo que se hicieron los siguientes ajustes:

Doble capa eléctrica.

La doble capa eléctrica fue sustituida con la región de 0,5 micras de espesor con la misma impedancia de contacto específico

$$\sigma_{dl} + j2\pi f \varepsilon_{dl} = t \cdot \left[\frac{(2\pi f)^{1/2}}{K} + \frac{j(2\pi f)^{1/2}}{K} + jC_1 2\pi f \right] \quad (14)$$

donde σ_{dl} y ε_{dl} son la conductividad y la permitividad dieléctrica, t es el espesor de la región, C_1 es la capacidad de la interfase por unidad de superficie, que consiste en la combinación en serie de la capa de Helmholtz y la doble capa difusa, y K es una constante.

En nuestro trabajo, se utilizó la misma geometría de su simulación, y los valores de la conductividad y la permitividad de la doble capa eléctrica fueron calculados con la misma expresión (14), con los mismos valores de K y C_1 mencionados en el artículo [59].

Gap electrodo-célula

El espacio electrodo - célula fue sustituido en el modelo de Huang por una región de 0.5 μm de espesor con la misma conductividad, es decir

$$\sigma_{gap} = \frac{t_{cell-electrode}}{t} \cdot \sigma_{medium} \quad (15)$$

donde $T_{\text{cell-electrodo}}$ es el espesor del gap y t es de nuevo $0.5\mu\text{m}$.

La capacidad membrana celular – electrólito no se consideró en el modelo de Huang, pero es importante, y lo tendremos en cuenta en nuestro modelo, ya que modela la región de carga (también llamado de la doble capa eléctrica) que se forma en el electrolito en la interfase con la célula. La capacidad C_{hd} se define como la serie de tres capacidades: [61].

$$\begin{aligned} C_{h1} &= \frac{\epsilon_0 \epsilon_{\text{IHP}}}{d_{\text{IHP}}} A_{\text{ce}} \\ C_{h2} &= \frac{\epsilon_0 \epsilon_{\text{OHP}}}{d_{\text{OHP}} - d_{\text{IHP}}} A_{\text{ce}} \\ C_d &= \frac{q \sqrt{2 \epsilon_0 \epsilon_d K T z^2 n^0 N}}{K T} A_{\text{ce}} \end{aligned} \quad (16)$$

donde A_{ce} es la superficie de la membrana adjunta, ϵ_0 es la permitividad dieléctrica del espacio libre; ϵ_{IHP} y ϵ_{OHP} son, respectivamente, interior y exterior de Helmholtz plano relativo constante dieléctrica; d_{IHP} es la distancia del plano interior de Helmholtz a la membrana; d_{OHP} es el distancia del plano exterior de Helmholtz a la membrana; ϵ_d es la capa difusa constante dieléctrica relativa; K es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta; q es la carga del electrón, z es la valencia de los iones en disolución; N_0 es la concentración masiva de iones en disolución, y N es el número de Avogadro.

Para C_{hd} , se consideran los valores que figuran en el informe de Joye. En particular, se supone que $\epsilon_{\text{IHP}} = 6$, $\epsilon_{\text{OHP}} = 32$, $d_{\text{IHP}} = 0,3 \text{ nm}$, $d_{\text{OHP}} = 0,7 \text{ nm}$, $z = 1$, $T = 300 \text{ K}$, y $N_0 = 150 \text{ mm}$. El área de la membrana es en nuestro caso, $A_{\text{ce}} = 706.86\text{e-}12 \text{ m}^2$. Los valores se obtuvieron los siguientes:

$$C_{\text{H1}} = 0.125\text{pF}; C_{\text{H2}} = 0.5\text{pF}; C_d = 2.22\text{pF} \quad (17)$$

y la capacidad serie total fue de $C_{\text{HD}} = 1.54\text{pF}$.

Comparando la impedancia de esta capacidad con la misma expresión que antes (16), y modelando de nuevo esta capa como una capa de 5 micras de espesor ($K = 1413\text{e-}6$), se obtuvo $\epsilon = 0.0011\text{e-}6$, que corresponde a $\epsilon_r = 124,29$, valor que se ha insertado en COMSOL.

Membrana celular

El circuito equivalente de la membrana se adjunta fue modelada como una resistencia R_m en paralelo con una capacidad C_m , en una forma similar a la publicada por Joye et al. Estos parámetros se definen como

$$\begin{aligned} R_m &= \frac{1}{g_{mem} \cdot A} \\ C_m &= c_{mem} \cdot A \end{aligned} \quad (18)$$

donde A es el área de la membrana adjunto (en nuestro caso $706.86e = A-12 \text{ m}^2$), $G_{mem} = 0,3 \text{ mS/cm}^2$ es la conductividad de la membrana locales y C_{mem} ($1 \text{ } \mu\text{F/cm}^2$) es la capacidad de la membrana por unidad de área [61].

Haciendo uso de la expresión siguiente se puede calcular la conductividad y la permitividad de la membrana celular de la impedancia.

$$Z = \frac{1}{K(\sigma + j\omega\epsilon)} \quad (19)$$

donde K es el factor geométrico ($K = \text{área} / \text{longitud}$). En nuestro caso un valor de 5 micras se ha tomado como la longitud. (Este valor corresponde al grosor de la capa de membrana representada en COMSOL). El valor de los resultados de $K = 1413e (-6)$, y los valores obtenidos para la conductividad y permitividad son $\sigma = 1.5E-6$ y $\epsilon = 5.001e (-9)$ ($\epsilon_r = 565$).

Conductividad celular y del medio.

La conductividad de la célula y el medio también se establece en $1,5 \text{ S / M}$ en nuestro trabajo, al igual que en el trabajo de Huang et al.

Como puede verse en la figura 39, se simuló sólo una cuarta parte de los electrodos de la célula. Los electrodos fueron modelados sin espesor. La primera capa modelada en la parte superior de la superficie del electrodo es la doble capa eléctrica, de 0,5 micras de espesor, que

puede verse en la figura. En la parte superior de la doble capa eléctrica, la separación entre electrodos de la célula se modela con otra capa de 0,5 micras. Esta capa incluye la simulación de la capacidad entre membrana celular y electrólito. En la parte superior de la misma tenemos finalmente la membrana celular, también modelada como otra capa de 0,5 micras, y el resto de la célula. Para cada capa, es necesario introducir en COMSOL los valores de conductividad y permitividad calculados antes.

Todas las superficies tenían una condición de contorno de aislamiento ($n \cdot J = 0$), con excepción de las superficies que separan las diferentes capas y sub-dominios en el modelo, que se fijaron como continuidad ($n \cdot (J_1 - J_2) = 0$) y las superficies inferiores de los dos electrodos, que se fijaron a un potencial eléctrico de 1V y 0V.

El módulo cuasi-estático de COMSOL se ha utilizado para realizar las simulaciones de elementos finitos. En este modo, es posible obtener la solución para el potencial eléctrico a diferentes frecuencias. Las simulaciones fueron realizadas en un Intel (R) Core (TM) 2 Duo CPU de 2,26 GHz. Los tiempos de solución variaban con la frecuencia, de 3 a 6 minutos. En la figura 40 podemos ver la solución para el potencial eléctrico a la frecuencia de 100 Hz y 10000Hz.

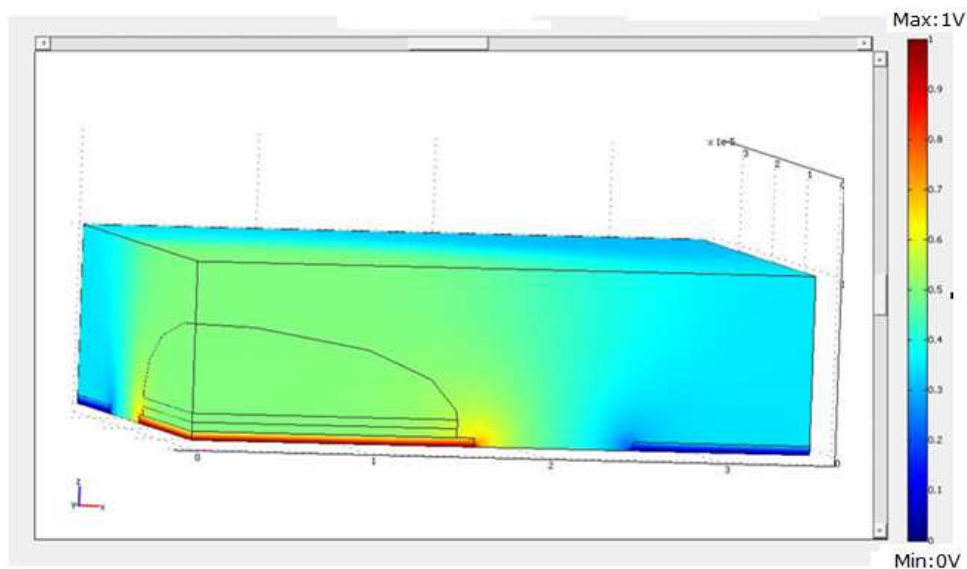


Fig. 40. solución de potencial eléctrico a 100Hz.

Se hicieron dos series de simulaciones con este modelo mejorado, con una frecuencia desde 100 Hz a 10^6 Hz, con y sin la presencia de la célula.

Una vez que la solución para el potencial eléctrico fuese encontrado por COMSOL, se utilizó la Integración de Contorno (Boundary Integration) para encontrar el paso de la corriente eléctrica a través del electrodo. Con esto el valor de la impedancia eléctrica se calcula teniendo en cuenta que la diferencia de voltaje entre los electrodos fue 1V y que la impedancia se había dividido por 4 (ya que sólo una cuarta parte de los electrodos fue simulado.) Los valores obtenidos se muestran en la figura 3.

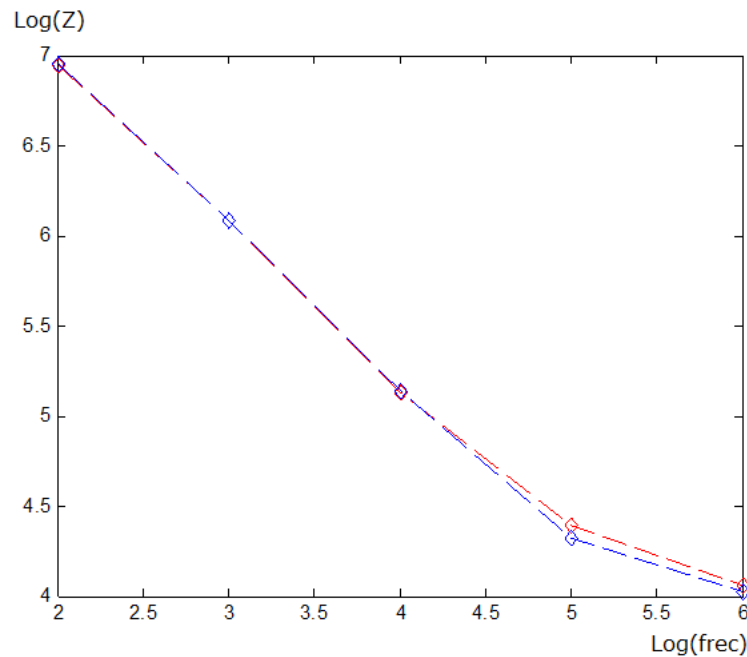


Fig. 41. Impedancia del sistema con la célula (línea roja) y sin ella (línea azul).

La impedancia medida varía en varios órdenes de magnitud en el rango de frecuencia simulada, que está de acuerdo con trabajos anteriores [60],[59]. Podemos ver cómo la presencia de la célula cambia la impedancia medida, con el mayor cambio en una frecuencia cercana a 10^5 Mhz. Esto también coincide con el informe de Huang et al [59].

Otra forma de presentar los mismos datos, pero observando los cambios de impedancia del electrodo de una manera más significativa, es calculando la impedancia normalizada, que se define como

$$r = \frac{Z_{cell} - Z_{no.cell}}{Z_{no.cell}} \quad (20)$$

donde Z_{cell} y $Z_{no.cell}$ son las magnitudes de impedancia con y sin célula, respectivamente. El cambio de impedancia normalizada del sistema con la célula de 30 μm de diámetro modelo se representa en la figura 42 (línea azul).

A fin de medir la sensibilidad del sistema de medición con los cambios en la dimensión de la célula, hemos repetido los cálculos mostrados en las anteriores secciones para otros tamaños de la célula. Los parámetros de la membrana celular y la interfaz célula-electrolito para las células se volvieron a calcular para 15 micras y 20 micras de diámetro, insertada en COMSOL, y se realizaron nuevas simulaciones. Los resultados también se muestran en la figura 42.

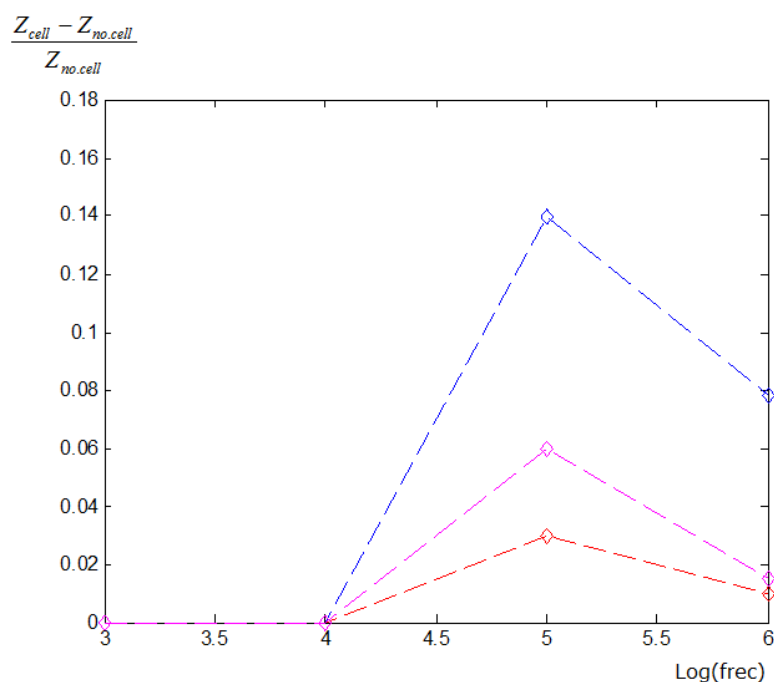


Fig. 42. Impedancia normalizada del sistema, de una célula de 30 μm de diámetro (línea azul), 20 μm de diámetro (línea magenta) y 15 μm de diámetro (línea roja).

Observamos como el sistema es sensible a estas diferencias en el tamaño celular. A la misma frecuencia, la impedancia normalizada r aumenta con la dimensión de la célula, siendo un excelente indicador del solapamiento de área entre la célula y el microelectrodo, permitiendo la medida del tamaño celular y/o densidad celular. Los picos de impedancia normalizada indican la frecuencia óptima para las medidas. Es de 0.03 para células de 15 μm

de diámetro, y de 0.14 para células de 30 μm de diámetro a unos 10^5 Hz. Para medidas de densidad celular, se puede definir un parámetro para el porcentaje de área del microelectrodo cubierto por la célula.

Estas curvas caracterizan la sensibilidad del sensor, sirven para validar el modelo y son muy útiles en el diseño preliminar de microelectrodos. Estos primeros resultados fueron publicados en **BIODEVICES 2010** [62] (ver anexo IV)

6.2.2. Detección de perfusión de crioprotector en fibroblastos y monocapas de células madre mesenquimales

Con la realización de estas simulaciones, se pretende estudiar teóricamente la perfusión de crioprotector dentro de fibroblastos 3T3, similares a las primeras simulaciones, y dentro de monocapas de células madre mesenquimales (MSC). En el protocolo de Vitricación mediante Equilibrio, el crioprotector se añade en distintos pasos, o gradualmente, a un medio iónico que contiene la célula, y perneando progresivamente el interior celular. En nuestras simulaciones seguiremos esta misma metodología, aumentando la concentración de crioprotector tanto en el exterior como en el interior celular.

Caracterización dieléctrica del crioprotector

Como hemos visto anteriormente, para caracterizar electromagnéticamente un elemento en COMSOL, utilizando el modelo cuasiestático de campos eléctricos, se necesita conocer la permitividad relativa (adimensional) y la conductividad (S/m). Como simplificación, ya que los iones dominantes en un sistema biológico son los de Cl^- y Na^+ , consideraremos que tanto el medio intracelular como el extracelular estarán compuestos originalmente por una disolución de 150 mM de NaCl en agua pura.

Una dificultad que nos encontramos a la hora de caracterizar una mezcla de DMSO/Agua/NaCl es la falta de datos. Los estudios sobre los crioprotectores se realizan principalmente a GHz, donde su comportamiento es el factor dominante en las características eléctricas del sistema, mientras que nuestro rango de estudio son los Hz- MHz, y como los

parámetros eléctricos son muy dependientes de la frecuencia no es posible extrapolar los datos. También nos encontramos el problema de que dichos estudios se han realizado sobre crioprotectores puros o distintas concentraciones de DMSO y Agua, pero nunca utilizando salino. Debido a esto, los datos del sistema ternario NaCl-DMSO-Agua serán una composición de las características eléctricas de distintas mezclas de DMSO y Agua, al que se le añadirá un factor de corrección debido a la presencia de electrolitos.

Gracias al artículo de Kaatze [40] obtenemos los datos de la permitividad compleja del sistema DMSO/Agua a distintas concentraciones (que sean de nuestro interés se encuentran 0, 1.002, 3.00, 5.00, 7.27 y 9.89 M) y a una temperatura de 25°C. Utilizando los parámetros que aparecen en el trabajo de Kaatze para las concentraciones 0, 1.002, 3.00, 5.00, 7.27, 9.89 molar, se calculó la permitividad compleja de la mezcla DMSO/Agua, separando la parte real y la parte imaginaria (y por lo tanto permitividad relativa y conductividad) para posteriormente añadir el efecto que produce la concentración iónica tanto en la permitividad como en la conductividad. Se puede utilizar una ecuación para describir la permitividad ϵ'_r de los electrolitos disueltos y del solvente acuoso puro (ϵ'_1) en términos de un decremento dieléctrico, como sigue:

$$\epsilon'_r = \epsilon'_1 - \delta c \quad (21)$$

donde δc es la suma de los decrementos debidos a los cationes y los aniones. Por otro lado, la conductividad AC total de un material, en este caso del crioprotector, viene dado por

$$\sigma(w) = \sigma_1 + w \epsilon_0 \epsilon'' \quad (22)$$

donde σ_1 es la conductividad que surge debido a los movimientos inducidos por el campo eléctrico de los diversos iones en el electrolitos, que puede obtenerse a través de

$$\sigma_1 = \sum m_i \cdot \sigma_{mi} \quad (23)$$

donde m_i es la concentración molar de iones del tipo i con una conductividad molar σ_{mi} .

Simulaciones realizadas en COMSOL Multiphysics software

Se utilizó el mismo modelo de las simulaciones anteriores para fibroblastos 3T3. En el caso de las simulaciones en monocapa de células madre, el modelo fue adaptado a las nuevas dimensiones (monocapa de 1cm^2 sobre un electrodo central del 1cm^2 , con una separación de $9\ \mu\text{m}$ entre este electrodo y el contraelectrodo que lo rodea. Se modelaron las características celulares de las células madre de forma similar a las características de los fibroblastos 3T3.

En fibroblastos 3T3 se simuló a una frecuencia de 100Khz , pues esta fue la frecuencia que demostró una mayor sensibilidad en simulaciones anteriores. Para el caso de monocapa de células madre, al cambiar la geometría, se volvió a estudiar la dependencia con la frecuencia, haciendo un barrido en frecuencia desde 100Hz hasta 10Mhz .

Los valores resultantes para el crioprotector, así como para las distintas capas que conforman el modelo que se introdujeron en COMSOL fueron los siguientes.

Crioprotector			Doble capa electrodo-electrolito		Doble capa membrana-electrolito		Gap célula-electrodo	
[M]	σ	ϵ_r	σ	ϵ_r	σ	ϵ_r	σ	ϵ_r
0	$1.4006 \cdot 10^{-4}$	$8.3192 \cdot 10^3$	1.83	76.71	$6.8854 \cdot 10^3$	10^{-7}	0.549	23.013
1.002	$1.3890 \cdot 10^{-4}$	$8.2625 \cdot 10^3$	1.6998	76.2174	$6.8464 \cdot 10^3$	10^{-7}	0.5099	22.8652
3	$1.3600 \cdot 10^{-4}$	$8.1366 \cdot 10^3$	1.4402	75.8315	$6.7595 \cdot 10^3$	10^{-7}	0.4321	22.7494
5	$1.3191 \cdot 10^{-4}$	$7.9744 \cdot 10^3$	1.1803	75.1858	$6.6468 \cdot 10^3$	10^{-7}	0.3541	22.5557
7.27	$1.2470 \cdot 10^{-4}$	$7.7119 \cdot 10^3$	0.8854	73.4317	$6.4628 \cdot 10^3$	10^{-7}	0.2656	22.0295
9.89	$1.0872 \cdot 10^{-4}$	$7.1971 \cdot 10^3$	0.5450	69.2086	$6.0962 \cdot 10^3$	10^{-7}	0.1635	20.7626

Tabla 2. Conductividad eléctrica y permitividad relativa resultante para el crioprotector y para las distintas capas del sistema electrodo – célula en el modelo.

Se simuló en COMSOL el proceso de adición de crioprotector, para fibroblastos 3T3 y monocapas de células madre, a las frecuencias comentadas, en una serie de pasos:

1. 0M Concentración interior / 0M Concentración exterior
2. 0M Concentración interior / 1.002M Concentración exterior
3. 1.002M Concentración interior / 1.002M Concentración interior
4. 1.002M Concentración interior / 3M Concentración exterior
5. ...

siguiendo las molaridades correspondientes a la tabla 2.

Resultados

Los resultados obtenidos para la Simulación de perfusión en fibroblastos se muestran en las siguientes figuras y en la siguiente tabla

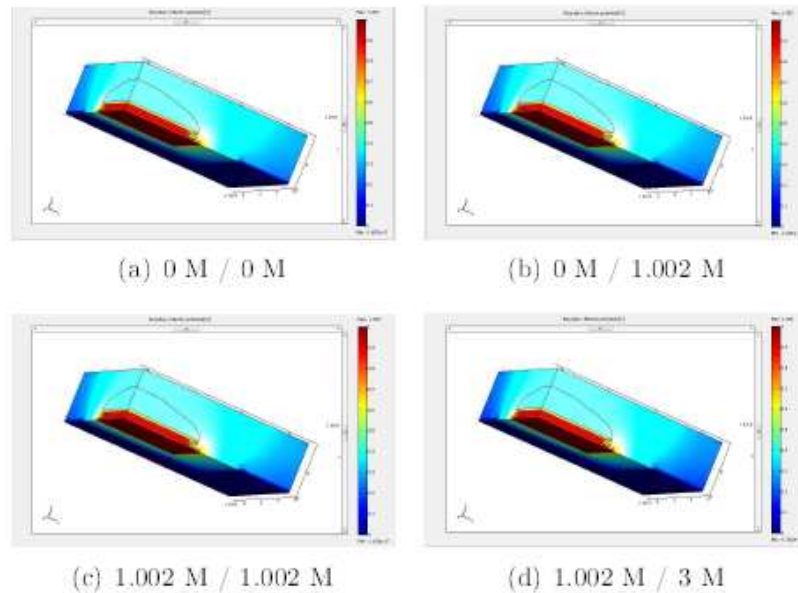


Fig. 43. Resultado para el potencial encontrado por COMSOL en el caso de fibroblastos, a 100Khz, en distintos pasos de concentración interior / exterior de Me2SO. (en los 4 pasos iniciales).

Concentración in- tra/extracel.	Intensidad (A)	Z	Impedancia Com- pleja (KΩ)
0M/0M	$1.5548 \cdot 10^{-6} + 4.9676 \cdot 10^{-6}i$	$4.8029 \cdot 10^4$	14.3461-45.8359i
0M/1.002M	$1.5786 \cdot 10^{-6} + 4.8912 \cdot 10^{-6}i$	$4.8642 \cdot 10^4$	14.9399-46.2905i
1.002M/1.002M	$1.5789 \cdot 10^{-6} + 4.8900 \cdot 10^{-6}i$	$4.8652 \cdot 10^4$	14.9489-46.2980i
1.002M/3M	$1.6421 \cdot 10^{-6} + 4.7077 \cdot 10^{-6}i$	$5.0142 \cdot 10^4$	16.5142-47.3442i
3M/3M	$1.6430 \cdot 10^{-6} + 4.7050 \cdot 10^{-6}i$	$5.0164 \cdot 10^4$	16.5382-47.3598i
3M/5M	$1.7274 \cdot 10^{-6} + 4.4590 \cdot 10^{-6}i$	$5.2280 \cdot 10^4$	18.8856-48.7502i
5M/5M	$1.7285 \cdot 10^{-6} + 4.4555 \cdot 10^{-6}i$	$5.2312 \cdot 10^4$	18.9203-48.7703i
5M/7.27M	$1.8476 \cdot 10^{-6} + 4.0453 \cdot 10^{-6}i$	$5.6214 \cdot 10^4$	23.3541-51.1336i
7.27M/7.27M	$1.8493 \cdot 10^{-6} + 4.0397 \cdot 10^{-6}i$	$5.6270 \cdot 10^4$	23.4218-51.1637i
7.27M/9.89M	$1.9774 \cdot 10^{-6} + 3.2268 \cdot 10^{-6}i$	$6.6059 \cdot 10^4$	34.5159-56.3246i
9.89M/9.89M	$1.9792 \cdot 10^{-6} + 3.2159 \cdot 10^{-6}i$	$6.6205 \cdot 10^4$	34.7003-56.3827i

Tabla 3. Intensidad e impedancia resultante (módulo y parte real e imaginaria) de la simulación del sistema electrodo – célula para el caso de fibroblastos, a 100Khz.

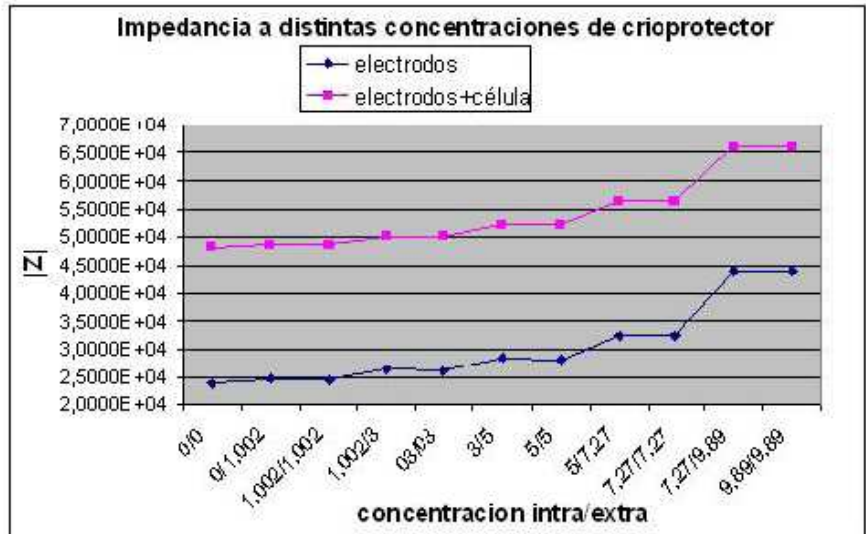


Fig. 44. Impedancia obtenida del sistema de electrodos y del sistema electrodos – célula a distintas concentraciones de crioprotector intracelular / extracelular al fibroblasto, desde 0M hasta 9.89M, a 100Khz.

Los resultados obtenidos para monocapas de células madre se observan en las siguientes figuras y en la siguiente tabla.

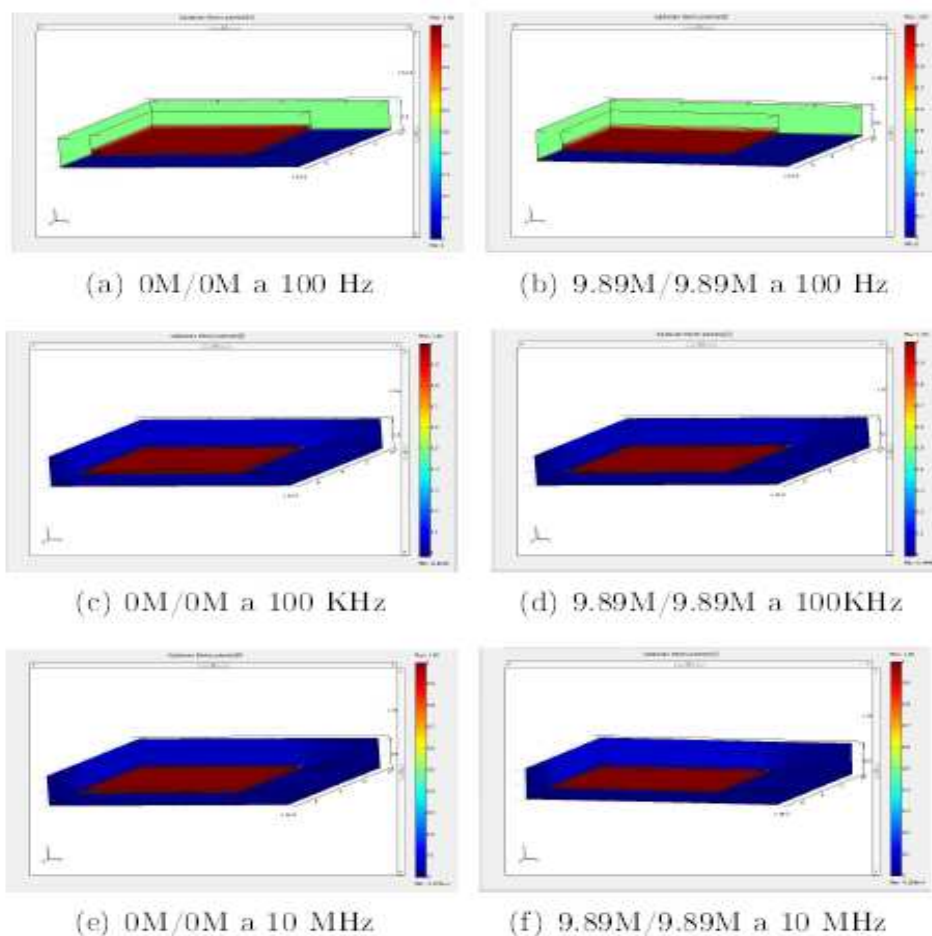


Fig. 45. Resultado para el potencial encontrado por COMSOL en el caso de monocapas MSC, a 100Khz, en distintos pasos de concentración interior / exterior de Me₂SO.

Concentración intra/extra.	100 Hz		100 KHz		10 MHz	
	Z=R+jX ($\times 10^2$)	Z ($\times 10^3$)	Z=R+jX	Z	Z=R+jX ($\times 10^{-2}$)	Z ($\times 10^{-2}$)
0M/0M	5.842430-5.187763i	0.781325	0.169325-3.653816i	3.657737	3.026927-5.011141i	5.854385
0M/1.002M	5.948599-5.304244i	0.797000	0.170114-3.679233i	3.683163	3.199912-5.106367i	6.026145
1.002M/1.002M	5.948628-5.304496i	0.797019	0.170134-3.679449i	3.683380	3.199976-5.106453i	6.026251
1.002M/3M	6.209396-5.573863i	0.834413	0.174893-3.737021i	3.741111	3.626474-5.333470i	6.449590
3M/3M	6.209426-5.574140i	0.834434	0.174889-3.737584i	3.741673	3.626633-5.333710i	6.449878
3M/5M	6.573382-5.918954i	0.884553	0.186394-3.814457i	3.819009	4.220014-5.637559i	7.042058
5M/5M	6.573726-5.919233i	0.884597	0.186341-3.815107i	3.819655	4.220207-5.637934i	7.042475
5M/7.27M	7.223269-6.477709i	0.970239	0.215254-3.947592i	3.953457	5.274736-6.143783i	8.097463
7.27M/7.27M	7.224099-6.478376i	0.970345	0.215163-3.948483i	3.954341	5.274932-6.144474i	8.098116
7.27M/9.89M	8.778347-7.695226i	1.167373	0.302117-4.244635i	4.255373	7.822860-7.218102i	10.644160
9.89M/9.89M	8.779713-7.697245i	1.167608	0.301913-4.246275i	4.256994	7.822818-7.219388i	10.645001

Tabla 4. Impedancia resultante (módulo y parte real e imaginaria) de la simulación del sistema electrodo – monocapa MSC, a 100Hz, 100Khz y 10Mhz, en distintos pasos de concentración interior / exterior de Me₂SO.

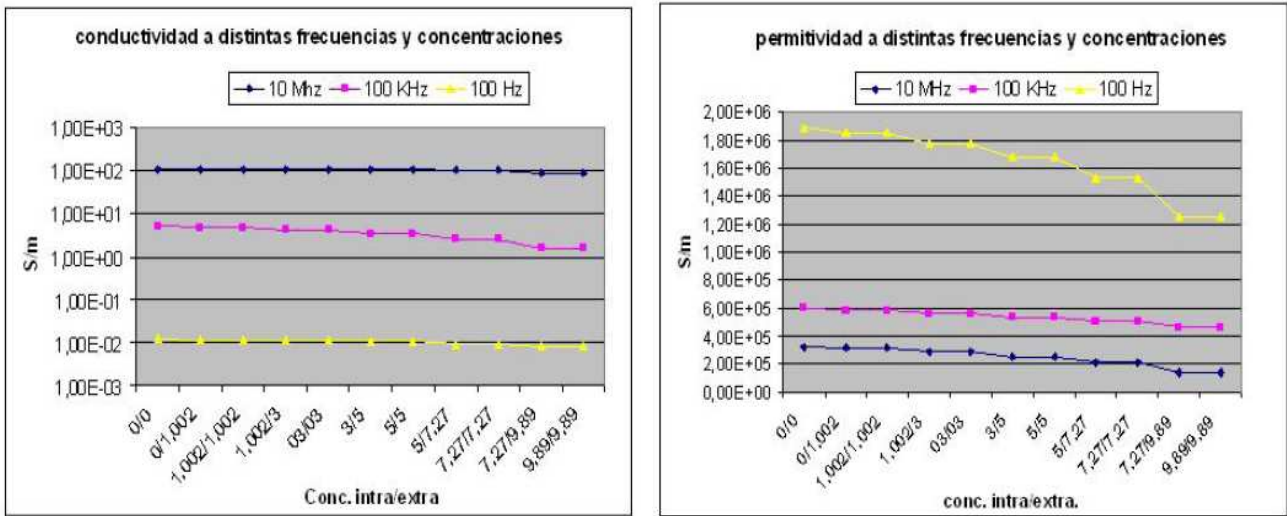


Fig. 46. Gráfica de la impedancia resultante (conductividad y permitividad) de la simulación del sistema electrodo monocapa MSC, a 100Hz, 100Khz y 10Mhz, en distintos pasos de concentración interior / exterior de Me₂SO.

Se puede observar, tanto en el caso de los fibroblastos, como en el caso de la monocapa de células madre que el sistema es sensible a la variación de concentración de crioprotector, aunque es necesaria una mayor sensibilidad para detectar de forma más precisa la concentración de crioprotector en el interior celular.

Comparando estos resultados con el único trabajo experimental de medidas de bioimpedancia aplicadas a la medida de concentración de crioprotector conocido hasta la fecha, realizado por Robert Wang, Tiatian Zhang et al. [58], podemos ver como su sistema, que realizaba medidas de bioimpedancia en embriones de pez cebra, obtenía una mayor sensibilidad. La siguiente figura muestra alguno de los resultados obtenidos.

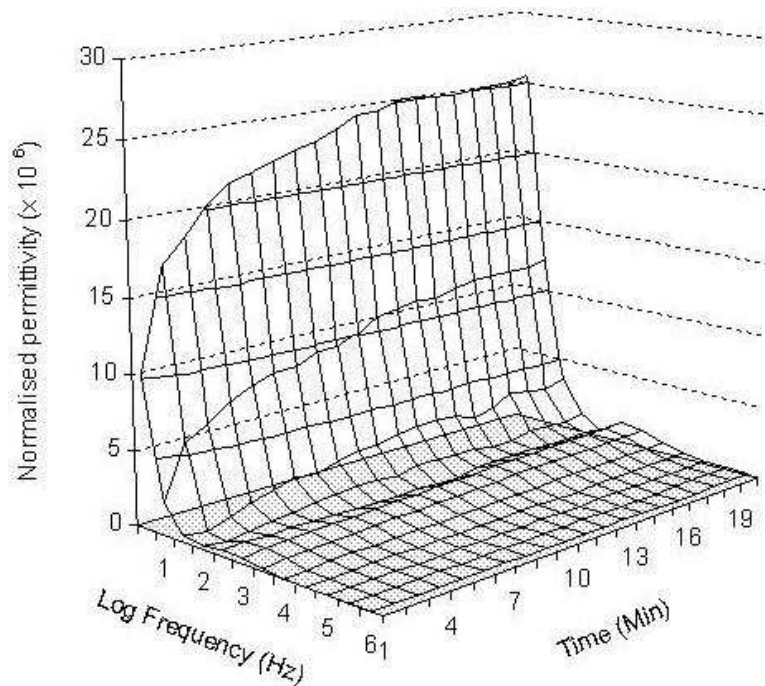


Fig. 47. [58]. Presentación tridimensional de la permitividad normalizada medida en los embriones de pez cebra a los 20 minutos de estar sumergidos en una concentración 2M metanol, al rango de frecuencia dado de 10Hz a 1Mhz.

Podemos ver como la permitividad del sistema evoluciona a lo largo del tiempo, mostrando una mayor sensibilidad al paso de CPA del exterior al interior celular. Esto puede ser debido a la geometría del sistema utilizado, puesto que consistía en 2 electrodos enfrentados. En nuestras simulaciones un gran porcentaje de la corriente entre electrodos fluye a través del gap electrodo – célula, sin penetrar dentro de la célula, no detectando con mucha sensibilidad los cambios en la concentración de crioprotector interior de ésta.

Los resultados obtenidos en nuestras simulaciones están en la línea de los resultados obtenidos por Tiantian Zhang:

- Para medidas de conductividad, 100 KHz parece ser la frecuencia óptima, más sensible a los cambios de crioprotector.
- Para medidas de permitividad se obtiene una mayor sensibilidad a frecuencias más bajas (unos 100 Hz).
- Se extiende el estudio teórico de esta técnica a otros sistemas de otras geometrías, como monocapas de células.

6.2.3. Influencia de la temperatura en las medidas de bioimpedancia.

La temperatura influye en la conductividad y la permitividad eléctrica; al perder los iones la movilidad con la disminución de la temperatura disminuye la conductividad eléctrica, aumentando la permitividad relativa. En un rango acotado de temperaturas, la conductividad eléctrica se puede aproximar como directamente proporcional a la temperatura, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\sigma_{T'} = \frac{\sigma_T}{1 + \alpha(T - T')} \quad (24)$$

donde $\sigma_{T'}$ es la conductividad eléctrica a una temperatura T' , σ_T es la conductividad eléctrica a una temperatura T medida, α es la pendiente de compensación de temperatura del material, T es la temperatura absoluta medida, y T' es la temperatura. Esta ecuación no es válida para temperaturas inferiores a 0°C , y no hay datos experimentales se pueden encontrar para los agentes crioprotectores a temperaturas criogénicas.

Los cambios en la permitividad dieléctrica son más difíciles de determinar. Estos cambios dependen en gran medida el material específico y, en la literatura sólo se dispone de algunas obras de referencia que miden la permitividad dieléctrica de los agentes crioprotectores. Estas medidas se hicieron con el objetivo de estudiar el recalentamiento electromagnético, con lo que estas mediciones se realizaron en frecuencias más altas que las utilizadas en EIS.

La temperatura también influye en las interfaces de los electrodos, que, a primera vista, podrían representar un problema para el uso de medidas bioimpedancia en protocolos de criopreservación. Si nos fijamos en la doble capa en la interfase electrodo-electrolito, encontramos que los cambios de temperatura afectan a algunos de sus parámetros, como la constante K_w [$\Omega \cdot \text{s}^{-1/2} \text{cm}^2$] de la impedancia de Warburg, cambiando la electroquímica y la movilidad de los iones implicados en la reacción de transferencia de carga, como puede verse en la siguiente ecuación:

$$k = \frac{RT}{F^2} \left(\frac{1}{C_{bulk}^R \sqrt{2D_R}} + \frac{1}{C_{bulk}^O \sqrt{2D_O}} \right) \quad (25)$$

C representa la concentración de las especies en el medio, y los superíndices O y R indican que dichas especies se encuentran en su forma Oxidada o Reducida, respectivamente. D es el coeficiente de difusión de la especie, F es la constante de Faraday, R es la constante de los gases ideales y T es la temperatura en grados Kelvin.

La capacidad de interfaz por unidad de superficie de C_I antes comentada, resultante de la combinación en serie de la capacidad de la capa doble de Helmholtz (C_H) y la capacitancia de la capa difusa (C_G), también está influenciado por los cambios de temperatura, como puede verse en la siguiente ecuación de C_G .

$$C_G = \frac{dq}{d\phi} = \left(\frac{d\phi}{dq} \right)^{-1} = \frac{\epsilon \epsilon_0}{L_D} \cosh \left(\frac{z\phi}{2V_t} \right) \quad (26)$$

donde ϵ_0 es la permitividad del espacio libre, ϵ es la constante dieléctrica relativa del agua, z es la carga de los iones, ϕ es la distribución potencial, V_t es el potencial térmico, dependiente de la temperatura (25,9 mV a 300 K) y L_D es la longitud de Debye, dependiente de los cambios de temperatura, como se muestra en la ecuación siguiente.

$$L_D = \sqrt{\frac{RT\epsilon\epsilon_0}{2z^2 F^2 C_{bulk}}} \quad (27)$$

Finalmente, la temperatura puede influir en la resistencia a la transferencia de carga R_{ct} , como vemos en la siguiente ecuación.

$$R_{ct} = V_t / zJ_0 \quad (28)$$

donde J_0 es la densidad de corriente y V_t es de nuevo el potencial térmico, dependiente de la temperatura.

6.3. Conclusiones. Aplicaciones de la medida de bioimpedancia en criopreservación.

La medida de bioimpedancia constituye una técnica de utilidad para la monitorización de la concentración de crioprotector en protocolos de criopreservación. El sistema simulado es sensible a la variación de concentración de crioprotector, aunque es necesaria una mayor sensibilidad para detectar de forma más precisa la concentración de crioprotector en el interior celular. Es importante de igual forma optimizar la geometría de los electrodos.

Para medidas de conductividad, 100 KHz parece ser la frecuencia óptima, con una mayor sensibilidad a los cambios de crioprotector, tanto para la geometría del fibroblasto como para la de monocapa. Para medidas de permitividad se obtiene una mayor sensibilidad a frecuencias más bajas, de unos 100 Hz.

En el caso de células aisladas o monocapas de células como las estudiadas, la geometría de dos electrodos enfrentados, como en el trabajo de Robert Wang, Tiatian Zhang et al. [58], a las frecuencias comentadas anteriormente, parece ser la opción más adecuada.

Los cambios en las medidas de bioimpedancia con la temperatura pueden ser difíciles de simular y pueden requerir un trabajo experimental para encontrar la influencia exacta en las mediciones. Sería necesario realizar una buena calibración del sistema para corregir esta influencia de la temperatura.

Como conclusión final, la medida de bioimpedancia puede ser una buena opción para monitorizar la concentración de crioprotector en el interior de tejidos y órganos en protocolos de criopreservación. Puede proporcionar una monitorización de este crioprotector de forma económica y no invasiva, y puede ser especialmente interesante en el caso de monocapas de células, como es el caso de las monocapas de células madre utilizadas en los bioreactores o las utilizadas en ingeniería de tejidos. Se espera como continuación del trabajo desarrollado en esta Tesis la construcción de un setup experimental donde probar la monitorización de crioprotector en dichas monocapas.

Referencias

- [1] Gábor Vajta, Masashige Kuwayama, Improving cryopreservation systems, *Theriogenology* 65 (2006), 236-244.
- [2] David K. Gardner, *In vitro fertilization, a practical approach*, Taylor & Francis; Édition : 1 (2006).
- [3] S.S. Gouk, C.K.F. Tan, M.P. Hande, A. Poonepalli, G.S. Dawe and Lilia L. Kuleshova, Protein- and serum-free vitrification of neural stem cells, *Cryobiology*, Volume 53, Issue 3, (2006), 389.
- [4] S. Llavin, A. Arav, Measurement of essential physical properties of vitrification solutions, *Theriogenology* (2007); 67; 81-89.
- [5] Rall WF, Fahy GM: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 by vitrification. *Nature* (1985);313:573-575.
- [6] T. Takahashi, A. Hirsh, E. F. Erbe, J. B. Bross, R. L. Steere and R. J. Williams Vitrification of human monocytes, *Cryobiology*, Volume 23, Issue 2, (1986), 103-115.
- [7] Martino A, Songsasen N, Leibo S. P, Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling, *Biol Reprod* (1996);54;1059-1069.
- [8] Vajta, G, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H, Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method, *Cryo-Letters* (1997);18;191-195.
- [9] Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK, Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique, *Fertil Steril*, (1999);72;1073-1078.
- [10] M.A.Nowshari and G. Bren, Effect of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on the development of mouse pronuclear stage embryos, *Human Reproduction* 15 (2001), 2368-2373.
- [11] G. Vajta, P. Holm, T. Greve and H. Callesen, Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method, *Acta Vet.Scand.* 38 (1997) 349-352
- [12] T. Mukaida, S. Nakamura, T. Tomiyama, S. Wada, M. Kasai and K. Takahashi, Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with us of a cryoloop containerless technique, *Fertil. Steril.* 76 (2001) 618-620.
- [13] P. L. Steponkus, S. P. Myers and D. V. Lynch, et al, Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos, *Nature* 345 (1990) 170-172.
- [14] Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo S. P, Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes, *Reprod Biomed Online*, (2005);11;300-308.
- [15] Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O, Vitrification of human embryos using the CryoTip method, *Reprod Biomed Online*, in press

- [16] R. Risco, M. Doughty, H. Elmoazzen, X. He, M. Toner. Thermal performance of quartz capillaries for vitrification. *Cryobiology* 55 (2007) 22-229.
- [17] C. A. Jeffery, P. H. Austin. Homogeneous nucleation of supercooled water: results from a new equation of state. *Journal of Geophysical Research* 102(D21), (1997) 25.269–25.279.
- [18] T. Jin, J-P. Hong, H. Zheng, K. Tang, Z-H. Gan. Measurement of boiling heat transfer coefficient in liquid nitrogen media by inverse heat conduction method. *Journal of Zhejiang University SCIENCE A* 10(5) (2009) 691-696.
- [19] N. Zuber. Nucleate boiling. The region of isolated bubbles and the similarity with natural convection. *International Journal of Heat and Mass Transfer* 6 (1963) 53.
- [20] J.W. Westwater, J.J. Hwalek, M.E. Irvlmgz .Suggested standard method for obtaining boiling curves by quenching. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals* 25 (1986) 685-692.
- [21] V. Berejnov, N.S. Hussein, O.A. Alsaied, R.E. Thorne. Effects of cryoprotectant concentration and cooling rate on vitrification of aqueous solutions. *Journal of Applied Crystallography* 39 (2006) 244-251.
- [22] G.J. Morris, M. Goodrich, E. Acton, F. Fonseca. The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions. Effects on cryopreservation. *Cryobiology* 52 (2006) 323-334.
- [23] P. Lamberg, R. Lehtiniemi, A.M. Henell. Numerical and experimental investigation of melting and freezing processes in phase change material storage. *International Journal of Thermal Sciences* 43 (2004) 277–287.
- [24] Gregory M. Fahy, Brian Wowk, Jun Wu, and Sharon Paynter Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity *Cryobiology* 48 (2004) 22–35.
- [25] Gregory M. Fahy, Brian Wowk, Jun Wu, John Phan, Chris Rasch, Alice Chang, and Eric Zendejas, Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology* 48 (2004) 157–178.
- [26] J. Farrant. Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention. *Nature*, 205(4978):1284_1287, 1965.
- [27] CG Adem and JB Harness. Instrumentation and Computer Interface of an Automated Experimental Cryopreservation Apparatus. *Instrumentation Science & Technology*, 11:341_368, 1981.
- [28] B. C Elford and C. A. Walter. Effects of Electrolyte Composition and pH on the Structure and Function Of Smooth Muscle Cooled To -79°C in Unfrozen Media *Cryobiology*, 9, (1972) 82-100.
- [29] D.E. Pegg, L. Wang, D. Vaughan, C.J. Hunt, Cryopreservation of articular cartilage. Part 2: Mechanisms of cryoinjury. *Cryobiology* 52 (2006).
- [30] D. E. Pegg, Lihong Wang, David Vaughan. Cryopreservation of articular cartilage. Part 3: The liquidus-tracking method. *Cryobiology* 52 (2006) 360–368.

- [31] V. K. LaMer, J. W. Yates, Influence of ultrasonic irradiation upon the phase transition in the formation of colloidal sulfur, *Science* 1947; 106, (2761); 508.
- [32] R. Smith-Johannsen, Some experiments in the freezing of water, *Science* 1948; 108, (2815); 652-654.
- [33] T. G. Leighton, Bubble population phenomena in acoustic cavitation, *Ultrasonics Sonochemistry* 1995, 2, (2), 123-136.
- [34] Chalmers, Principles of solidification, John Wiley and sons Inc. 62-90.
- [35] R. Hickling, Transient, High-Pressure Solidification Associated with Cavitation in Water, *Nature* (1965); 206; 915-917.
- [36] J.D Hunt, K.A Jackson, Nucleation of Solid in an Undercooled Liquid by cavitation. *Journal of Applied Physics* (1966); 37; 254-257.
- [37] R. Chow, R. Blindt, R.Chivers, M. Povey, A study on the primary and secondary nucleation of ice by power ultrasound, *Ultrasonics* (2005); 43, (4); 227-230.
- [38] R. Chow, The importance of acoustic cavitation in the sonocrystallization of ice – high speed observations of a single acoustic bubble, *IEEE Ultrasonics Symposium*, (2003).
- [39] R. Chow, R. Blindt, A. Kamp, P. Grocutt, R. Chivers, Stimulation of ice crystallisation with ultrasonic cavitation – microscopic studies, *Indian Journal of Physics* (2003); 77A, (4); 315-318.
- [40] R.Chow, R. Blindt, R.Chivers, M. Povey, The sonocrystallisation of ice in sucrose solutions: primary and secondary nucleation, *Ultrasonics* (2003); 41, (8); 595-604.
- [41] R. Chow, R. Mettin, B. Lindinger, T. Kurz, W. Lauterborn, High-speed observations of the nucleation of ice using a single levitated bubble, *IEE International Ultrasonics Symposium Proceedings* (2003); 152-153.
- [42] T. Hozumi, A. Saito, S. Okawa, T. Matsui, Freezing phenomena of supercooled water under impacts of ultrasonic waves, *International Journal of Refrigeration* (2002); 25, (7); 948-953.
- [43] L.D. Rozenberg, Physical principles of ultrasonic technology, Volume 2, Plenum Press, 1973.
- [44] M. R. Worland, A. Lukesova, The application of differential scanning calorimetry and ice nucleation spectrometry to ecophysiological studies of algae, *Nova Hedwigia* (2001); 123; 571-583.
- [45] Lawrence A. Crum. Nucleation and stabilization of microbubbles in liquids. *Applied Scientific Research*. (1982), 38, (1), 101-115.
- [46] S. Takeya, A. Hori, T. Hondoh, T. Uchida, Freezing memory effect of water on nucleation of CO₂ Hydrate Crystals, *J. Phys. Chem*, (2000), 104, 4164-4168.

- [47] X. Zhang, T. Inada, A. Tezuka, Ultrasonic-induced nucleation of ice in water containing air bubbles, *Ultrasonics Sonochemistry* (2003), 10, (2), 71-76.
- [48] G.I. Eskin, Cavitation mechanism of Ultrasonic melt degassing, *Ultrasonics sonochemistry* (1995), 2, 2, 137-141.
- [49] L.D. Rozenberg, *Physical principles of ultrasonic technology, Volume 2*, Plenum Press, (1973).
- [50] R. D. Beach et al., Towards a Miniature In Vivo Telemetry Monitoring System Dynamically Configurable as a Potentiostat or Galvanostat for Two- and Three- Electrode Biosensors, *IEEE Trans. On Instrumentation and Measurement*, vol 54, n°1, (2005), 61-72.
- [51] A. Yúfera et al. A Tissue Impedance Measurement Chip for Myocardial Ischemia Detection. *IEEE transaction on Circuits and Systems: Part I*. vol.52, n°:12 . (2005) 2620-2628.
- [52] S. M. Radke et al. Design and Fabrication of a Microimpedance Biosensor for Bacterial Detection, *IEEE Sensor J*. vol 4, n° 4, (2004), 434-440.
- [53] D.E. Pegg, L. Wang, D. Vaughan, Cryopreservation of articular cartilage. Part 3: The liquidus-tracking method, *Cryobiology* 52. (2006), 360–368.
- [54] B.C. Elford, C.A. Walter, Effects of electrolyte composition and pH on the structural function of smooth muscle cooled to $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ in unfrozen media, *Cryobiology* 9. (1972), 82–100.
- [55] J. Farrant, Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention, *Nature* 205. (1965), 1284–1287.
- [56] A. Yúfera et al. A Method for Bioimpedance Measure With Four- and Two-Electrode Sensor Systems, *30th Annual International IEEE EMBS Conference*, (2008), 2318-2321.
- [57] A. Yúfera and A. Rueda, Design of a CMOS closed-loop system with applications to bio-impedance measurements. *Microelectronics Journal. Elsevier*. vol. 41, (2010) 231-239.
- [58] R. Y Wang, T. Zhang, Q. Bao, and D. M. Rawson, Study on Fish Embryo Responses to the Treatment of Cryoprotective Chemicals Using Impedance Spectroscopy. *Eur Biophys J*. Feb.; 35(3): (2006), 224–230.
- [59] X. Huang et al. Simulation of Microelectrode Impedance Changes Due to Cell Growth, *IEEE Sensors J.*, vol.4, n°5, (2004). 576-583.
- [60] D. A. Borkholder. Cell-Based Biosensors Using Microelectrodes. PhD Thesis, Stanford University. 1998.
- [61] N. Joye et al. An Electrical Model of the Cell-Electrode Interface for High-density Microelectrode Arrays, *30th Annual International IEEE EMBS Conference*, (2008), 559-562.
- [62] A. Olmo et al., Computer Simulation of Microelectrode Based Bio-Impedance Measurements With COMSOL. *BIODEVICES 2010*. pp: 178-182. Valencia (Spain), 20-23, Jan. 2010

[63] U. Kaatze, R. Pottel and M. Schäfer. Dielectric spectrum of dimethyl sulfoxide / water mixtures as a function of composition. *The journal of Physical Chemistry*, 93 (14) (1989), 5623-5627.

[64] Giaever, I. and Keese, C.R., "Use of electric fields to monitor the dynamical aspect of cell behavior in tissue culture," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, BME-33(2) (1986) 242-247.

[65] Ivorra. *Bioimpedance Monitoring for Physicians. An overview.*

[66] Geddes, L.A., *Electrodes and the measurement of the bioelectric events*, Wiley-Interscience, New York (1972).

