

Trabajo de Fin de Grado

Diseño y aplicación de técnicas de vitrificación en equilibrio para la
criopreservación de corazón y encéfalo de *Mus musculus*

Beatriz Albiol Tortosa

Grado en Biología
Tutor/a: Ramón Risco Delgado
y Marcin Balcerzyk
Avalador/a: Anna Dalmau
Vic, septiembre de 2019

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han contribuido al proceso de elaboración y conclusión de esta memoria. En primer lugar, quiero agradecer a Ramón Risco Delgado, director del proyecto y mi tutor desde hace siete meses, por apoyarme, personal e institucionalmente, a llegar lo más lejos posible a pesar de todos los obstáculos que han ido surgiendo.

Agradezco encarecidamente al personal del Instituto de Biomedicina de Sevilla por la formación prestada en cuanto a manipulación animal, procedimientos quirúrgicos y perfusión. A Cristina Pichardo, responsable de experimentación animal, por su ayuda en la gestión de la obtención de ratones. A Rafael Chacón por su ayuda de gestión y préstamo del equipo Chopper.

Agradezco al Animalario del Hospital Virgen de la Macarena, especialmente a Itziar Benito, por su empatía y ayuda desinteresada, sin la cual este proyecto no habría podido ser posible.

Agradezco también al personal del Dept. de Física de Fluidos de la Universidad de Sevilla, por su paciencia, ayuda y aporte de ideas para el montaje y ajuste del circuito hidráulico a unas condiciones precisas y para la medición de presión y caudal, especialmente a Francisco del Campo por el préstamo de la bomba de jeringa; equipo que facilitó con creces todo el trabajo.

Agradecer también a Juan José Martín y Jesús Ferrera, del Dept. de Química de la Universidad de Sevilla, por ofrecer las instalaciones, material y consejos en todo lo referente a análisis químicos y preparación de reactivos.

Agradezco al personal de la empresa Air Liquide por su ayuda desinteresada y gran tiempo empleado en encontrar un manorreductor especial y un circuito adecuado para la bombona de carbógeno.

Agradezco mucho la ayuda del Centro Nacional de Aceleradores, especialmente a Marcin Balcerzyk y Ángel Parrado, por prestar sus instalaciones y equipos y hacer los análisis de TAC. También agradezco el tiempo invertido en dar la formación correspondiente en reconstrucción e interpretación de imágenes.

Doy las gracias a mis compañeros de laboratorio, Enrique Alcalá Guerrero y José Manuel Ortiz Serrano, por el compañerismo, la complementariedad, el compromiso con el proyecto y sus altos conocimientos en ingeniería y robótica, sin los cuales tampoco habría sido posible llevar a cabo esta investigación.

Agradezco al investigador del CNIC Javier Larrasa y al fisiólogo Óscar Casis, de la Universidad del País Vasco, por sus consejos para el método Langendorff, y al estudiante de física Carlos Iglesias, de la Universidad de Barcelona, por su ayuda en cálculos, explicaciones y consejos sobre temas relacionados con procesos de transferencia de calor, hidráulica y química.

Le doy las gracias también a la Universidad de Vic y a la Universidad de Sevilla por hacer posible el convenio entre estas dos grandes instituciones haciendo posible el proyecto, especialmente al coordinador de estudios Josep Bau de la UVic, a la coordinadora y avaladora de TFG Anna Dalmau y al jefe de estudios Enric López, así como a la dirección de ambas universidades.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mi familia, a mi pareja y a mis amigos por el apoyo económico y emocional prestado durante todo el tiempo; por creer en mí y acompañarme en cada momento y dificultad.

RESUMEN

La criopreservación tiene como objetivo conservar células, tejidos y, en palabras mayores, organismos complejos. La motivación del proyecto ha sido el alto rango de aplicaciones que podría proporcionar la criopreservación de órganos y organismos para la sociedad, desde la preservación de órganos dispuestos para trasplantes, la preservación de muestras biológicas para la investigación biomédica y evasión de problemas de infertilidad causados por tratamientos de quimioterapia, hasta la apertura del camino hacia la criopreservación de organismos complejos.

Hasta la fecha, y tras décadas de estudio, el *Stat of Art* de la criopreservación se encuentra en la vitrificación y trasplante exitoso de riñones de conejo. Para criopreservar células aisladas se utiliza la técnica del *Slow freezing*, donde se induce, de forma controlada, la formación de cristales de hielo para la reubicación de las células individuales entre las dendritas del cristal, protegiendo a las mismas de daños mecánicos. En la criopreservación de tejidos se utiliza la vitrificación ultrarrápida, de 100 °C/min, formando un vidrio amorfo que no permite el crecimiento de cristales debido a su alta viscosidad. Para órganos complejos el único método exitoso comprobado hasta el momento es la vitrificación en equilibrio, que concilia la concentración necesaria de crioprotector como para evitar la formación de cristales a cada temperatura, y la máxima para evitar la toxicidad a esa temperatura. El proceso evoluciona con una curva de concentración y temperatura a lo largo del tiempo. Esto permite un enfriamiento homogéneo para sistemas biológicos voluminosos sin la necesidad de que deba ser ultrarrápido.

Se ha utilizado la técnica de vitrificación en equilibrio basando la curva de concentración de crioprotector y temperatura en la de G. M. Fahy, director del equipo que consiguió vitrificar y trasplantar exitosamente riñones de conejo. Para ello se han escogido dos órganos de ratón, corazón y encéfalo, y se han sometido a una serie de procedimientos con el objetivo de diseñar y afinar la técnica de enfriamiento y encontrar puntos críticos y relaciones entre variables. Los métodos ejecutados fueron cirugía, canulación de corazón y extracción de encéfalo, el soporte vital del corazón *ex vivo* mediante perfusión retrógrada de corazón y, finalmente, la vitrificación de cada órgano. Las muestras fueron almacenadas en crioviales contenidos en cámaras frías a -22 °C y a -196 °C para su posterior evaluación sobre la cristalización y el estudio de la absorción de crioprotector en los tejidos mediante análisis de Tomografía Axial Computerizada (TAC). Los resultados fueron favorables en 6 de los 15 órganos vitrificados y analizados, con concentraciones del 36% en encéfalo y 81% en corazón. Mediante el análisis estadístico de resultados se observó una relación inesperada entre la capacidad de absorción de crioprotector del tejido y su viabilidad en el momento en el que entró a vitrificación. Se aplicaron una serie de tests estadísticos para la confirmación de significación de linealidad y, finalmente, una regresión lineal que proporcionó una ecuación para predecir el valor de concentración de crioprotector absorbido en función del tiempo de canulación del corazón durante la cirugía.

El proyecto concluyó con la hipótesis de que esta relación solo puede ser posible si se considera una absorción de crioprotector por transporte activo dependiente de ATP, en contraposición a las fuentes consultadas. En cuanto a la vitrificación de encéfalo se han encontrado dificultades tanto para perfundirlo como para vitrificarlo debido a su aislamiento en el cráneo y la baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Se proponen una serie de mejoras del método para el análisis de viabilidad pre y post vitrificación. Como proyecto futuro se considera perfeccionar las técnicas de la fase de enfriamiento y estudiar la fase de recalentamiento mediante ultrasonidos, ya que estos permiten una transmisión de energía homogénea en todo el órgano.

Palabras clave: Agente Crioprotector, criopreservación, criovial, criopreservante, punto eutéctico, punto de fusión, crioprotección, nucleación, cristales de hielo, recristalización, recalentamiento, vitrificación, subenfriamiento.

ABSTRACT

Cryopreservation aims to conserve cells, tissues and, in greater words, complex organisms. The motivation of the project has been the high range of applications that could provide the cryopreservation of organs and organisms for society, from the preservation of organs arranged for transplants, the preservation of biological samples for biomedical research and avoidance of infertility problems caused by Chemotherapy treatments, until the opening of the path to cryopreservation of complex organisms.

To date, and after decades of study, the State of Art of cryopreservation is found in vitrification and successful transplantation of rabbit kidneys. In order to cryopreserve isolated cells, the Slow freezing technique is used, where the formation of ice crystals is induced in a controlled way for the relocation of the individual cells between the dendrites of the crystal, protecting them from mechanical damage. In the cryopreservation of tissues, ultrafast vitrification of 100 °C / min is used, forming an amorphous glass that does not allow crystal growth due to its high viscosity. For complex organs, the only successful method tested so far is equilibrium vitrification, which reconciles the necessary concentration of cryoprotectant to avoid the formation of crystals at each temperature, and the maximum to avoid toxicity at that temperature. The process evolves with a concentration and temperature curve over time. This allows a homogeneous cooling for bulky biological systems without the need for it to be ultrafast.

The equilibrium vitrification technique has been used based on the cryoprotectant concentration and temperature curve on that of G. M. Fahy, team leader who successfully vitrified and transplanted rabbit kidneys. For this, two mouse, heart and brain organs have been chosen, and they have undergone a series of procedures with the objective of designing and fine-tuning the cooling technique and finding critical points and relationships between variables. The methods performed were surgery, cannulation of the heart and extraction of the brain, the vital support of the heart *ex vivo* by retrograde perfusion of the heart and, finally, the vitrification of each organ. The samples were stored in cryovials contained in cold chambers at -22 °C and at -196 °C for later evaluation on crystallization and the study of the absorption of cryoprotectant in tissues by computerized axial tomography (CT) analysis. The results were favorable in 6 of the 15 vitrified and analyzed organs, with concentrations of 36% in the brain and 81% in the heart. Through the statistical analysis of results, an unexpected relationship was observed between the absorption capacity of the cryoprotectant of the tissue and its viability at the time it entered vitrification. A series of statistical tests were applied for the confirmation of significance of linearity and, finally, a linear regression that provided an equation to predict the concentration value of absorbed cryoprotectant as a function of the cannulation time of the heart during surgery.

El proyecto concluyó con la hipótesis de que esta relación solo puede ser posible si se considera una absorción de crioprotector por transporte activo dependiente de ATP, en contraposición a las fuentes consultadas. En cuanto a la vitrificación de encéfalo se han encontrado dificultades tanto para perfundirlo como para vitrificarlo debido a su aislamiento en el cráneo y la baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Se proponen una serie de mejoras del método para el análisis de viabilidad pre y post vitrificación. Como proyecto futuro se considera perfeccionar las técnicas de la fase de enfriamiento y estudiar la fase de recalentamiento mediante ultrasonidos, ya que estos permiten una transmisión de energía homogénea en todo el órgano.

Keywords: Cryoprotectant agent, cryopreservation, cryovial, cryopreservant, eutectic point, melting point, cryoprotection, nucleation, ice crystals, recrystallization, reheating, vitrification, subcooling.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
<i>Presentación</i>	1
<i>Fundamentos de criopreservación y fisiología</i>	2
<i>El proyecto</i>	14
OBJETIVOS	15
METODOLOGÍA	16
Materiales	18
<i>Reactivos/químicos</i>	18
<i>Material fungible</i>	22
<i>Material inventariable</i>	22
<i>Animales</i>	26
Métodos	26
<i>Valoración de varios Agentes Crioprotectores (ACP)</i>	26
<i>Heparinización y sacrificio</i>	29
<i>Electrocardiograma (ECG)</i>	29
<i>Procedimientos quirúrgicos</i>	32
<i>Soporte vital del corazón ex vivo: método Langendorff</i>	36
<i>Vitrificación en equilibrio</i>	37
<i>Tomografía Axial Computerizada (TAC)</i>	40
RESULTADOS	42
<i>Electrocardiograma (ECG)</i>	42
<i>Soporte vital del corazón ex vivo: método Langendorff</i>	45
<i>Vitrificación en equilibrio</i>	46
<i>Retención de ACP en los tejidos (TAC)</i>	47
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS	56
ANEXOS	1
Anexo I. Material	1
Anexo Ia. Diseño y modificación de equipos e impresión 3D	1
Anexo Ib. Especificaciones técnicas de reactivos y preparación de medios	9
Anexo Ic. Fotografías de los equipos	11
Anexo Id. Caracterización de las cepas de ratón (<i>Mus musculus</i>)	16
Anexo III. Cálculos	18
<i>Caracterización de la bombas peristálticas para vitrificación</i>	18

<i>Dosis de heparina</i>	18
<i>Equivalencia % Brix – Molaridad</i>	19
<i>Cálculos de presión respecto a voltaje (Bernoulli)</i>	21
<i>Calibración del TAC</i>	23
Anexo IV. Incidencias y problemas	24
<i>DMSO como disolvente</i>	24
<i>Indisposición de la bomba de jeringa</i>	24
<i>Indisposición de Carbógeno</i>	24
<i>Indisposición de material volumétrico y quirúrgico</i>	25
<i>Avería del BioCool (ventilador y agitador)</i>	25
<i>Indisposición de animales</i>	25
<i>Indisposición de heparina</i>	25
<i>Intento de corte de rodajas de encéfalo mediante Chopper</i>	25
Anexo V. Programación	27
<i>Códigos del ECG</i>	27
Anexo VI. Principios ético en investigación y docencia con modelos animales	29
Anexo VII. Tratamiento de residuos químicos y biológicos	30
<i>Residuos químicos</i>	30
<i>Residuos biológicos</i>	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de los químicos, material y equipos utilizados.	18
Tabla 2. Lista de químicos utilizados y sus propiedades esenciales.	19
Tabla 3. Tipo de latido en función del tiempo de canulación	46
Tabla 4. Resumen de resultados del TAC de todas las muestras de corazón	47
Tabla 5. Resumen de resultados del TAC de todas las muestras de encéfalo	48

Anexos

Tabla 6 Datos de cuatro ECG realizados a 4 personas.	2
Tabla 7. Parámetros de impresión 3D	4
Tabla 8 Especificaciones técnicas de los reactivos	9
Tabla 9 Composición de la disolución Tyrode's HEPES y (PBS)	10
Tabla 10 Valores dimensionales de la aguja de perfusión..	21

INTRODUCCIÓN

Presentación

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a bajas temperaturas, ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga este tiempo, puesto que las ralentiza. Sin embargo, este procedimiento puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas, las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la interacción célula-célula del sistema biológico a preservar (Ávila-portillo, Madero y López, 2006).

La pretensión de prolongar el tiempo biológico de células, tejidos, órganos e incluso organismos puede inducir al lector una sensación de proximidad con el mundo de la ciencia ficción: la criogénesis (o criónica) y todos los dilemas éticos que ello comporta y que tanto se han explotado en la industria del cine. Sin embargo, la rama de la ciencia que estudia los efectos que causan las bajas temperaturas en los seres vivos es la criobiología, y sus técnicas son aplicadas cada vez que interesa preservar un material biológico hasta su posterior uso tanto en clínica como en investigación; algunos ejemplos son la criopreservación de células germinales, del cordón umbilical, de células madre e incluso tejidos para trasplante.

La aplicabilidad de la criobiología puede dar servicios muy valiosos a la sociedad; no sólo criopreservando células y/o tejidos, sino órganos completos y, en palabras mayores, organismos, pero ¿para qué querría la sociedad criopreservar órganos y/o organismos?

Los avances en ciencia son adquisiciones de conocimiento y el modo en que se utiliza ese conocimiento en pos de los servicios a la sociedad es, a menudo, una cuestión más política que científica. A pesar de ello, las motivaciones para arrojar un rayo de luz sobre una parcela de conocimiento sobre el mundo de la criobiología se exponen a continuación:

- **La creación de un banco de órganos completos.** Este es un objetivo importante dados los actualmente limitados tiempos de almacenamiento de órganos humanos dispuestos para ser trasplantados, ya que reducen significativamente la efectividad del órgano y aumentan el coste del trasplante. El problema más grande de la medicina de trasplantes es el déficit en la disponibilidad de órganos en relación con el número total de trasplantes que se necesitan, y un banco de criopreservación de órganos posibilitaría aumentar estos tiempos en que los órganos pudieran estar almacenados, a modo de reducir las listas de espera de trasplantes.
- Existe también un gran interés actual en usar técnicas de criopreservación para **preservar las gónadas** de pacientes sometidos a tratamientos de quimioterapia, para devolvérselas una vez haya concluido el tratamiento y así evitar problemas de infertilidad después de superar la enfermedad.
- **Investigación biomédica.** La preservación de órganos y tejidos beneficia a la investigación facilitando la disponibilidad de estos materiales y mejorando la eficiencia experimental; por ejemplo, la preservación de neuronas inmaduras para trasplantes intracerebrales terapéuticos, la utilización de tejido neural criopreservado para el examen de drogas neurofarmacológicas e incluso permitiría reducir el uso de animales de laboratorio (Pichugin, Fahy y Morin, 2006).

- **Criopreservación de organismos.** A pesar de la imposibilidad de saber si la criopreservación de organismos complejos será viable en un futuro lejano, el camino de la ciencia para averiguarlo es la investigación criobiológica de materiales cada vez más complejos. Actualmente solo cabe la posibilidad de la especulación sobre las aplicaciones que podría tener este conocimiento para las futuras generaciones. Ejemplos de ello son la criopreservación humana con fines como prolongar un estado físico esperando un momento concreto del futuro o la criogenización como medio para viajar largas distancias espaciales; también la criopreservación de animales con el fin de salvar especies de la extinción. Estas cuestiones serán elección de quienes les toque vivir esta época, si algún día llegase esta tecnología.

“La criopreservación de órganos se convirtió en un área de investigación en la década de 1950 como resultado del redescubrimiento de las propiedades crioprotectoras del glicerol por Polge, Smith y Parkes en 1949. Hasta la fecha, los intentos experimentales de aplicar métodos de vitrificación a órganos enteros vascularizados se han limitado casi por completo al riñón de conejo. Utilizando técnicas disponibles a partir de 1997, fue posible vitrificar vasos sanguíneos y sistemas más pequeños con un éxito razonable, pero no órganos completos. A partir de 1998, una serie de avances novedosos relacionados con el control de la toxicidad crioprotectora, la nucleación, el crecimiento de cristales y las lesiones por frío comenzaron a proporcionar las herramientas necesarias para lograr el éxito” (Fahy et al., 2004, p. 157).

El *Stat of Art* de la criopreservación se encuentra en la vitrificación de riñones de conejo, en un estudio dirigido por Gregory M. Fahy, donde se logró con éxito el trasplante de riñones que habían estado vitrificados a los mismos conejos donantes. La investigación está descrita en el artículo *-Physical and biological aspects of renal vitrification-* publicado en la revista *Cryobiology*.

Fundamentos de criopreservación y fisiología

En los siguientes apartados (*Criopreservación y Fisiología y anatomía*) se describen los fundamentos teóricos en los que se ha basado el proyecto; los aspectos fisicoquímicos y biológicos por los que se han escogido cada uno de los métodos.

Criopreservación

El gran problema de la criopreservación es la lucha contra el crecimiento de cristales de hielo que causan daños mecánicos a las células y la toxicidad de los crioprotectores que impiden su formación y crecimiento.

Crecimiento de cristales de hielo

Hay dos fenómenos involucrados en la aparición de cristales de hielo: la nucleación (el nacimiento de un embrión inicial) y su crecimiento subsiguiente.

Nucleación. En una solución acuosa, las moléculas de agua se agrupan y desagrupan constantemente de forma aleatoria, formando clústeres (mediante enlaces de hidrógeno) que se destruyen inmediatamente debido a la agitación térmica. Sin embargo, si el azar logra agrupar

un clúster por encima de cierto grado, la agitación térmica no puede hacerlo desaparecer; en este caso, la adición de una nueva molécula de agua al grupo se favorece energéticamente, generando el crecimiento indefinido del cristal de hielo. El nacimiento de este embrión, un clúster de dimensiones mínimas, se denomina nucleación y es el comienzo de la congelación. Cuanto más frío está el sistema, más pequeña es la dimensión de este clúster mínimo capaz de desencadenar la nucleación, ya que la agitación térmica, que causa su destrucción eventual, es menos intensa .

Crecimiento de cristales. Después de la nucleación, el segundo y último fenómeno involucrado en la formación de hielo es su crecimiento. Esto está dominado por la viscosidad de la solución. Si la solución es muy viscosa, el hielo, incluso si ha aparecido, no puede crecer. Por el contrario, en áreas de baja viscosidad, las dendritas encuentran la manera de avanzar dentro de la solución. Cuanto más alta sea la temperatura más baja será la viscosidad; así, el requisito para el crecimiento de hielo es, en este sentido, justo el contrario que para la nucleación.

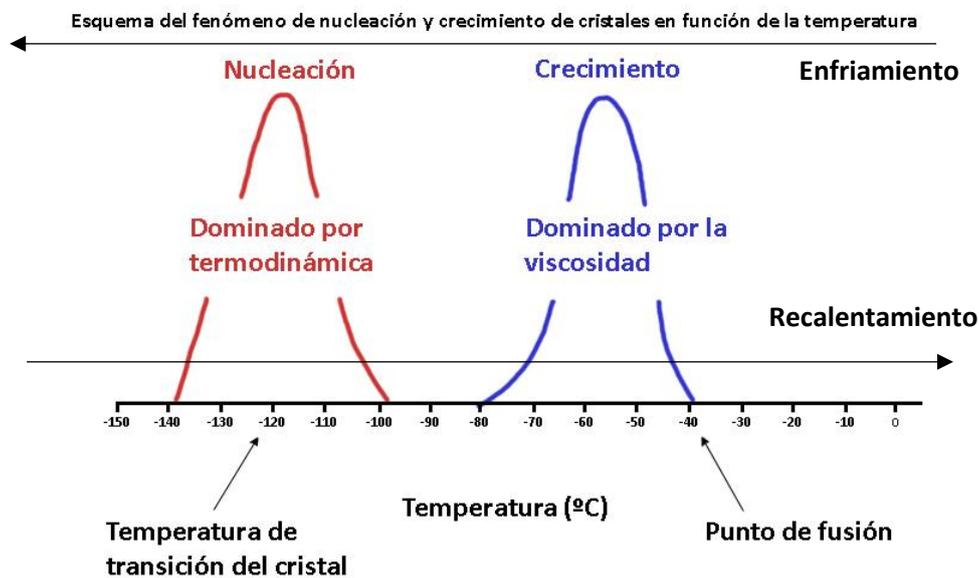


Fig. 1 Fenómeno de nucleación y crecimiento de cristales en función de la temperatura. El eje x representa la temperatura. El eje y representa la probabilidad de nucleación y velocidad de crecimiento de cristales para una concentración dada de crioprotector genérico. Como las curvas no se superponen es posible que, si el cristal de hielo no surge durante el enfriamiento, lo haga en el recalentamiento. Solo un recalentamiento rápido y uniforme podría superar el problema. Fuente: (Risco, 2019).

En la Fig. 1 se representan los fenómenos de nucleación y crecimiento en una solución con una concentración dada de crioprotector. En una gráfica de una solución sin crioprotector las curvas de nucleación y crecimiento de cristales están superpuestas, porque la temperatura será lo suficientemente alta y lo suficientemente baja como para mantener una viscosidad estable que permitirá que los dos fenómenos se den a la vez (es decir, las curvas estarán superpuestas). A medida que aumenta la concentración de crioprotector, estas dos curvas se vuelven más estrechas y se superponen menos. Para concentraciones por encima de un cierto umbral no hay superposición en absoluto, entonces al enfriar el sistema, si tiene lugar la nucleación, el hielo no tiene posibilidad de crecer, ya que su formación se produce en una zona de temperaturas más baja que la zona, ya superada, de crecimiento. Sin embargo, después del almacenamiento, cuando el sistema se vuelve a calentar, los núcleos de hielo que se formaron durante el enfriamiento tendrán que cruzar todo el rango de temperatura a la inversa

(recalentamiento), y en particular, la zona de crecimiento, es decir, temperaturas más altas, donde la viscosidad es menor. Por lo tanto, aunque no hayan aparecido grandes cristales de hielo durante el enfriamiento, pueden aparecer durante el recalentamiento: es la **recristalización**.

Tipos de criopreservación

Las técnicas de criopreservación se dividen en dos grupos: congelación lenta (Mazur, 1984) y vitrificación (Rall, 1985).

La congelación lenta es una técnica ideal para preservar células aisladas en suspensión, como pudiera ser sangre o células germinales. La muestra biológica se coloca en un recipiente con medio isotónico y una concentración próxima al 10% de un agente crioprotector (ACP en adelante), que normalmente será un alcohol. Este debe ser hidrosoluble en un alto rango de temperaturas bajo cero, penetrante a las membranas celulares y de baja toxicidad. Se enfría gradualmente el recipiente, para la mayoría de células a una velocidad aproximada de 1 °C/min, hasta alcanzar el punto de congelación de la solución, que generalmente se encuentra alrededor de los 5 °C. Entonces se induce la formación de hielo en el agua pura del medio extracelular, reduciendo la cantidad de agua líquida. Esto provoca la salida de agua del interior de las células por ósmosis, concentrando los solutos del citosol, y esto, a su vez, produce una depresión del punto de congelación dentro de la célula. La congelación se realiza de forma lenta para que el hielo extracelular crezca lo suficientemente lento como para dar tiempo al agua para que salga gradualmente de la célula y al ACP para que entre. De esta manera, para cada temperatura, la concentración intracelular de solutos siempre logra ser lo suficientemente alta como para que no se forme hielo en su interior; así, la solución intracelular terminará convirtiéndose en un vidrio, un sólido amorfo, evitando la formación de lo que de otra manera serían cristales letales de agua congelada. El ACP toma la función de evitar que los solutos del citosol precipiten en forma de cristales al concentrarse, ya que estos solutos son básicamente sales que tienen un límite de solubilidad bajo (-22 °C para el Cloruro de Sodio, el soluto dominante): es el llamado punto eutéctico. Las soluciones con ACP tienen un punto eutéctico mucho más bajo, pudiendo alcanzar temperaturas en las que la viscosidad es tan alta que no hay posibilidad de formar estructuras cristalinas. Por lo tanto, la congelación lenta solo es útil si las células (en suspensión) pueden reubicarse entre los dendritas de hielo extracelular. Cabe puntualizar que la inducción de hielo es crítica y si no se hiciera, entonces, como estas soluciones tienden a subenfriarse¹, el hielo aparecerá de forma incontrolada a cualquier temperatura.

En la **vitrificación**, a diferencia de la "congelación lenta", el hielo no se forma ni dentro ni fuera de las células. Esta técnica se basa en el hecho de que cualquier líquido, cuando se enfría a una velocidad suficientemente alta, se solidifica sin formar cristales. El agua pura requiere una velocidad de enfriamiento de aproximadamente 107 °C/min para vitrificar (Farrant, 1965); la adición de ciertos solutos reduce esta velocidad de enfriamiento tanto como se desee, solo al agregarlos en una concentración suficientemente alta (Risco, 2018). En correspondencia con estos dos comportamientos, generalmente se distinguen dos formas diferentes de vitrificación: por enfriamiento ultrarrápido (vitrificación sin equilibrio) y por vitrificación en equilibrio.

¹ adj. termo. Díc. de la sustancia que permanece en estado líquido a temperaturas inferiores a la de solidificación.

Tipos de vitrificación

La **vitrificación ultrarrápida** es especialmente útil en sistemas susceptibles de ser dañados por el frío en sí mismo ("lesión por enfriamiento"), sin la necesidad de que el hielo cause daños mecánicos. Tal es el caso de las primeras etapas de desarrollo: gametos, embriones y células madre embrionarias. En la vitrificación ultrarrápida no hay una "lesión por frío", ya que no hay una exposición prolongada al frío, como en la "congelación lenta" o la vitrificación de equilibrio.

Por otro lado, tenemos la **vitrificación de equilibrio**. Es particularmente útil en sistemas voluminosos tales como tejidos y órganos. En estos sistemas, la congelación lenta no es aplicable porque las células no pueden reubicarse en las zonas libres de hielo, ya que están inmóviles formando el tejido; y la vitrificación ultrarrápida no es viable, ya que, con las tecnologías de enfriamiento actuales, es imposible enfriar un sistema voluminoso a una velocidad tan alta. Este tipo de vitrificación se logra reduciendo la velocidad de enfriamiento necesaria para evitar la formación de cristales, mediante la adición de una alta concentración de solutos (ACP). La concentración de soluto debe ser compatible con la velocidad de enfriamiento y con la velocidad de recalentamiento para evitar el crecimiento de cristales en ambos procesos. La vitrificación en equilibrio aprovecha el hecho de que la toxicidad de crioprotector baja cuanto menor es la temperatura, y se basa en aumentar la concentración de ACP a medida que la temperatura disminuye, es decir, en todo momento la concentración de crioprotector es la necesaria para evitar la toxicidad y la formación de hielo a la temperatura a la que se encuentra el sistema en ese momento. Esta idea fue desarrollada por Farrant y Pegg (Farrant, 1965; Pegg, 2006). Sin embargo, el monitoreo necesario, en la práctica, conlleva enormes dificultades. Por otro lado, al disminuir la temperatura aumenta la viscosidad de la solución y disminuye la permeabilidad de las membranas, lo que dificulta e incluso hace imposible seguir la curva sólido-líquido en muchos casos.

Fisiología y fundamentos anatómicos

Las perfusiones de solución salina y crioprotector se realizan en este proyecto siempre por el sistema vascular de los órganos de estudio. Se exponen en este apartado introductorio los fundamentos específicos necesarios para entender la presente memoria.

El corazón y la circulación sanguínea

“El corazón, en términos de ingeniería, es una bomba peristáltica en circuito cerrado, tomando el fluido por las aurículas e impulsando este fluido hacia la circulación por medio de la contracción ventricular” (Alcalá, 2019).

Con esta sencilla definición se presenta uno de los órganos más indispensables para la vida macroscópica. Todos los mamíferos poseen un corazón tetra cameral, con dos aurículas (cámaras de entrada) situadas sobre los dos ventrículos (cámaras de salida). El lado izquierdo del corazón recibe y bombea sangre oxigenada desde las venas pulmonares hacia la circulación sistémica, a excepción de los pulmones, por la arteria aorta ascendente, que va hacia la cabeza, y descendente, al resto del cuerpo (circulación mayor). El lado derecho del corazón recibe y bombea la sangre desoxigenada desde la circulación sistémica hacia los pulmones, donde se dirige a los alvéolos pulmonares a hacer el intercambio de gases, y vuelve oxigenada de nuevo al corazón por las venas pulmonares hasta la aurícula izquierda (circulación menor) (Fig. 2).

Un dato clave para la elección del método de canulación aórtica y baño Langendorff es que parte de la sangre que eyecta el ventrículo izquierdo cuando se contrae y que pasa a través de la válvula aórtica (o semilunar aórtica) hacia la aorta ascendente, se dirige hacia las arterias coronarias, que nacen de ella e irrigan el corazón.

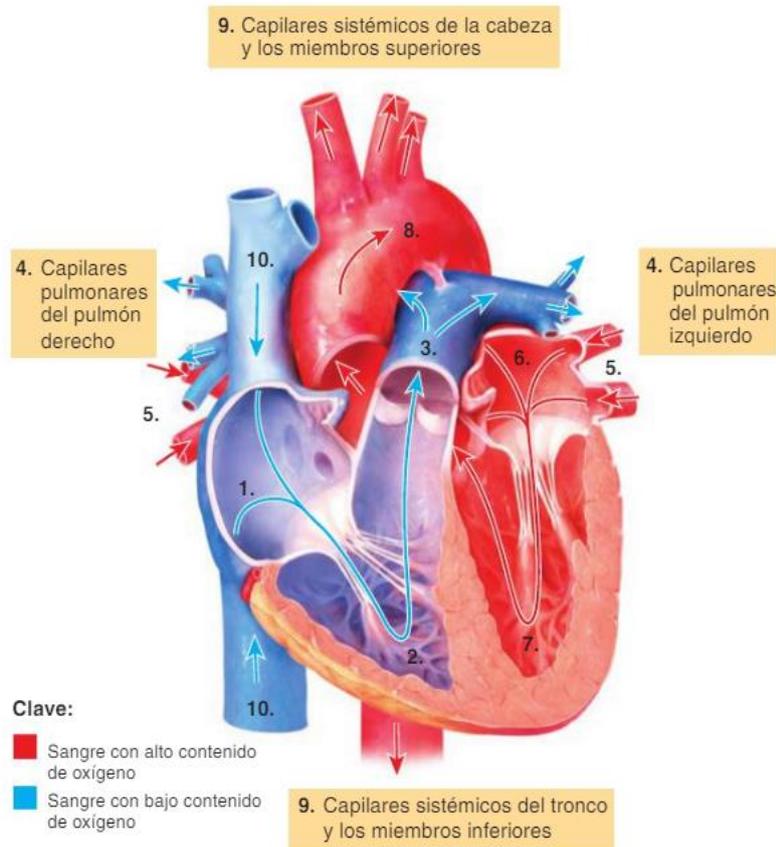


Fig. 2 Diagrama del flujo sanguíneo a través del corazón. Fuente: Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2018). *Principios de anatomía y fisiología*. Médica Panamericana.

Circulación coronaria

“Las arterias coronarias derecha e izquierda transportan sangre hacia el corazón; las venas coronarias drenan la sangre del corazón en el seno coronario que desemboca a la aurícula derecha” (Tortora y Derrickson, 2018, p. 707).

Las arterias coronarias rodean el corazón formando una red de vasos sanguíneos que se extiende por todo el corazón e irriga el miocardio, proporcionándole oxígeno y nutrientes.

El miocardio contiene muchas anastomosis² que representan desvíos para la sangre arterial en caso de que la ruta principal se obstruya (Tortora y Derrickson, 2018). Las venas

² La anastomosis arterial tiene lugar en la circulación coronaria, cuando dos vasos sanguíneos irrigan una misma zona.

coronarias conducen la sangre desoxigenada y los productos de desecho del miocardio al seno vascular³ coronario, que desemboca a la aurícula derecha.

Circuito de conducción eléctrica

El corazón tiene una actividad eléctrica intrínseca y rítmica. La fuente de esta actividad eléctrica es una red de fibras musculares cardíacas especializadas denominadas fibras autorríticas, debido a que son autoexcitables. Las fibras autorríticas generan potenciales de acción de forma repetitiva que disparan las contracciones cardíacas. Continúan estimulando el corazón para que lata aún después de haber sido extraído del cuerpo y de que todos sus nervios hayan sido cortados (Tortora y Derrickson, 2018).

Las fibras autorríticas actúan, pues, como marcapasos natural dictando el ritmo de excitación eléctrica que estimula la contracción cardíaca por parte de las células contráctiles. La contracción se da con la despolarización de las células contráctiles, que abren canales iónicos con compuertas de voltaje (como Na^+ , Ca^{2+} y K^+) y mueven de esta manera las cargas electroquímicas hasta quedarse con una diferencia de potencial dentro y fuera de la membrana plasmática cerca de 0 mV (en estado de reposo, es decir, cuando la célula está polarizada, la diferencia de potencial de una célula contráctil respecto el espacio intersticial es de -90 mV). Después de la despolarización existe una fase de sostén despolarizado llamada meseta, donde el flujo iónico mantiene el potencial constante (Fig. 4). Finalmente se produce la repolarización, volviendo los electrolitos a su estado inicial y dejando a la célula en un estado de reposo. El tiempo que tarda una célula desde que recibe el potencial de acción y se despolariza hasta que

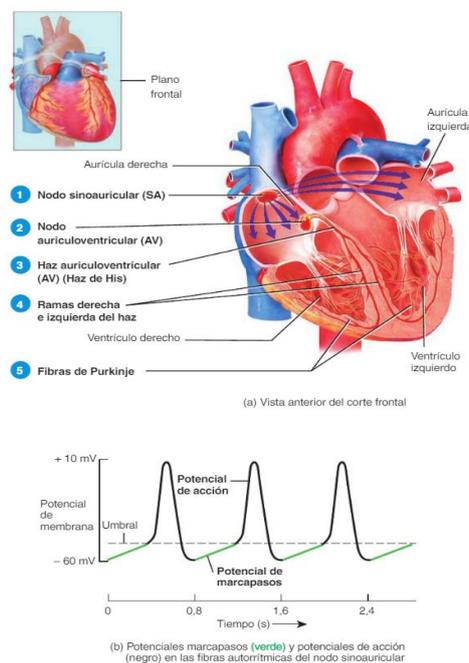


Fig. 3 Diagrama del recorrido del potencial de acción eléctrico del corazón y gráfico del potencial de membrana de las fibras autorríticas del nodo sinoauricular en cada potencial de acción en función del tiempo. Fuente: Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2018). Principios de anatomía y fisiología. Médica Panamericana.

³ Un seno vascular es una vena con una pared delgada que carece de músculo liso, lo que le permite variar el diámetro.

vuelve a polarizarse se llama periodo refractario (Fig. 4). Valga decir que los tiempos de contracción y periodos refractarios son variables entre especies.

Como se puede observar en la Fig. 3, el potencial de acción se genera en el nodo sinoauricular (SA) de la aurícula derecha y dicho potencial se propaga al inicio por ambas aurículas, haciéndolas contraer al mismo tiempo. Luego llega al nodo auriculoventricular (AV), localizado en el tabique interauricular, y se produce un retraso considerable (un aumento del periodo refractario) que ofrece tiempo a las aurículas para movilizar la sangre a los ventrículos antes de que estos contraigan (Tortora y Derrickson, 2018). Desde aquí, el potencial se propaga al haz de His y a las fibras de Purkinje (Fig. 3) que conducen rápidamente el potencial al resto del miocardio ventricular, provocando la contracción de los últimos.

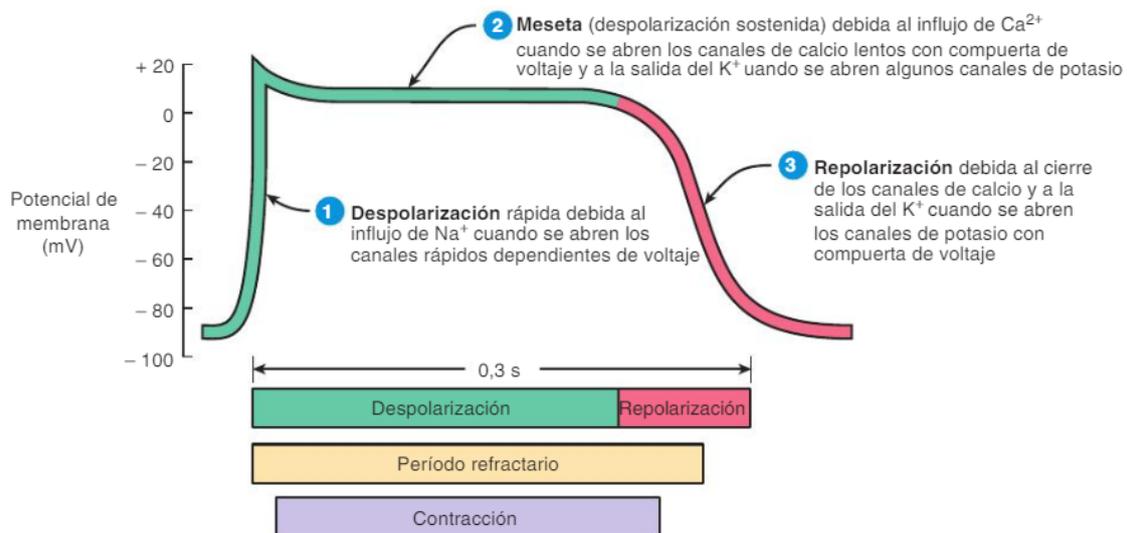


Fig. 4 Fases del proceso de contracción de las células contráctiles al excitarse con el potencial de acción. Fuente: Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2018). *Principios de anatomía y fisiología*. Médica Panamericana.

Electrocardiograma (ECG)

A medida que los potenciales de acción se propagan a través del corazón, generan corrientes eléctricas que pueden ser detectadas desde la superficie corporal mediante un electrocardiograma (ECG). Los electrodos se colocan sobre la piel en lugares específicos. Cada electrodo detecta una actividad eléctrica levemente distinta, según la posición que ocupa respecto al corazón, y mediante la comparación de los trazados entre sí es posible determinar si el sistema de conducción está alterado, si el corazón está agrandado, si ciertas regiones cardíacas están dañadas y la causa de una precordialgia⁴. El siguiente fragmento sobre la interpretación del electrocardiograma, agradecer a la editorial Médica Panamericana por su excelente trabajo y a sus autores, Tortora y Derrickson, es conveniente leerlo prestando ayuda de las Fig. 5 y Fig. 6.

“En un trazado típico, aparecen en cada latido tres ondas claramente reconocibles. La primera, denominada onda P, es una pequeña deflexión positiva. Representa la despolarización auricular, que se propaga desde el nodo SA a través de las fibras contráctiles en ambas aurículas. La segunda onda, denominada complejo QRS,

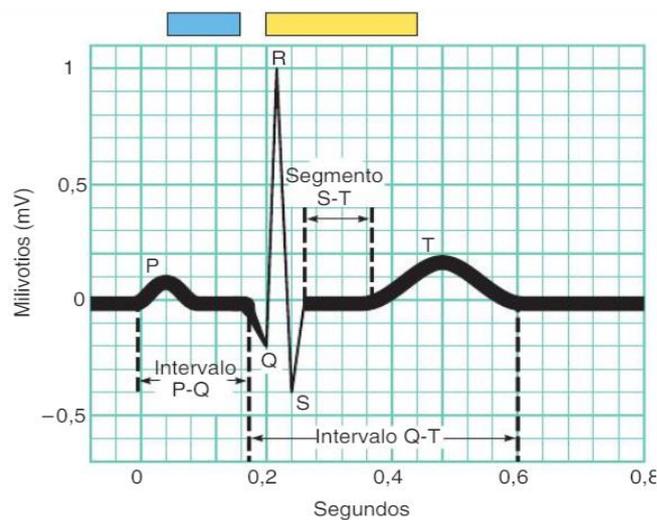
⁴ La precordialgia es un dolor retroesternal (detrás del esternón). La precordialgia más común es la angina de pecho.

comienza con una deflexión negativa, continúa con una importante onda triangular positiva y termina con una onda negativa. El complejo QRS representa la despolarización ventricular rápida, a medida que el potencial de acción progresa a través de las fibras ventriculares contráctiles. La tercera onda es una deflexión positiva abovedada, la onda T. Representa la repolarización ventricular y aparece justo cuando los ventrículos están comenzando a relajarse. La onda T es más pequeña y más ancha que el complejo QRS debido a que la repolarización se produce más lentamente que la despolarización. Durante la fase de meseta de la despolarización sostenida, el trazado del ECG permanece plano.

En la lectura de un ECG, el tamaño de las ondas puede dar pistas sobre anomalías. Las ondas P grandes indican un agrandamiento auricular; una onda Q de mayor magnitud puede indicar un infarto de miocardio y las ondas R grandes suelen indicar agrandamiento ventricular. La onda T es más aplanada de lo normal cuando el músculo cardíaco no está recibiendo oxígeno suficiente. La onda T puede estar elevada en la hiperpotasemia (nivel elevado de K^+ en sangre).

El intervalo P-Q es el tiempo requerido para que un potencial de acción viaje a través de la aurícula, el nodo AV y las fibras remanentes del sistema de conducción. El segmento S-T representa el tiempo en el que las fibras ventriculares contráctiles están despolarizadas en la fase de meseta del potencial de acción. El segmento S-T se eleva por encima de la línea isoeletrica cuando el corazón recibe un aporte de oxígeno insuficiente.

El intervalo Q-T se extiende desde el comienzo del complejo QRS hasta el final de la onda T. Representa el tiempo que transcurre desde el comienzo de la despolarización ventricular hasta el final de la repolarización del ventrículo. El intervalo



Clave:

- Contracción auricular
- Contracción ventricular

Fig. 5 Electrocardiograma normal o ECG. Onda P = despolarización auricular; complejo QRS = despolarización ventricular; onda T = repolarización ventricular. Fuente: Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2018). Principios de anatomía y fisiología. Médica Panamericana.

Q-T puede alargarse por lesión miocárdica, isquemia miocárdica (disminución del flujo sanguíneo) o por anomalías de la conducción” (Tortora y Derrickson, 2018, p. 714).

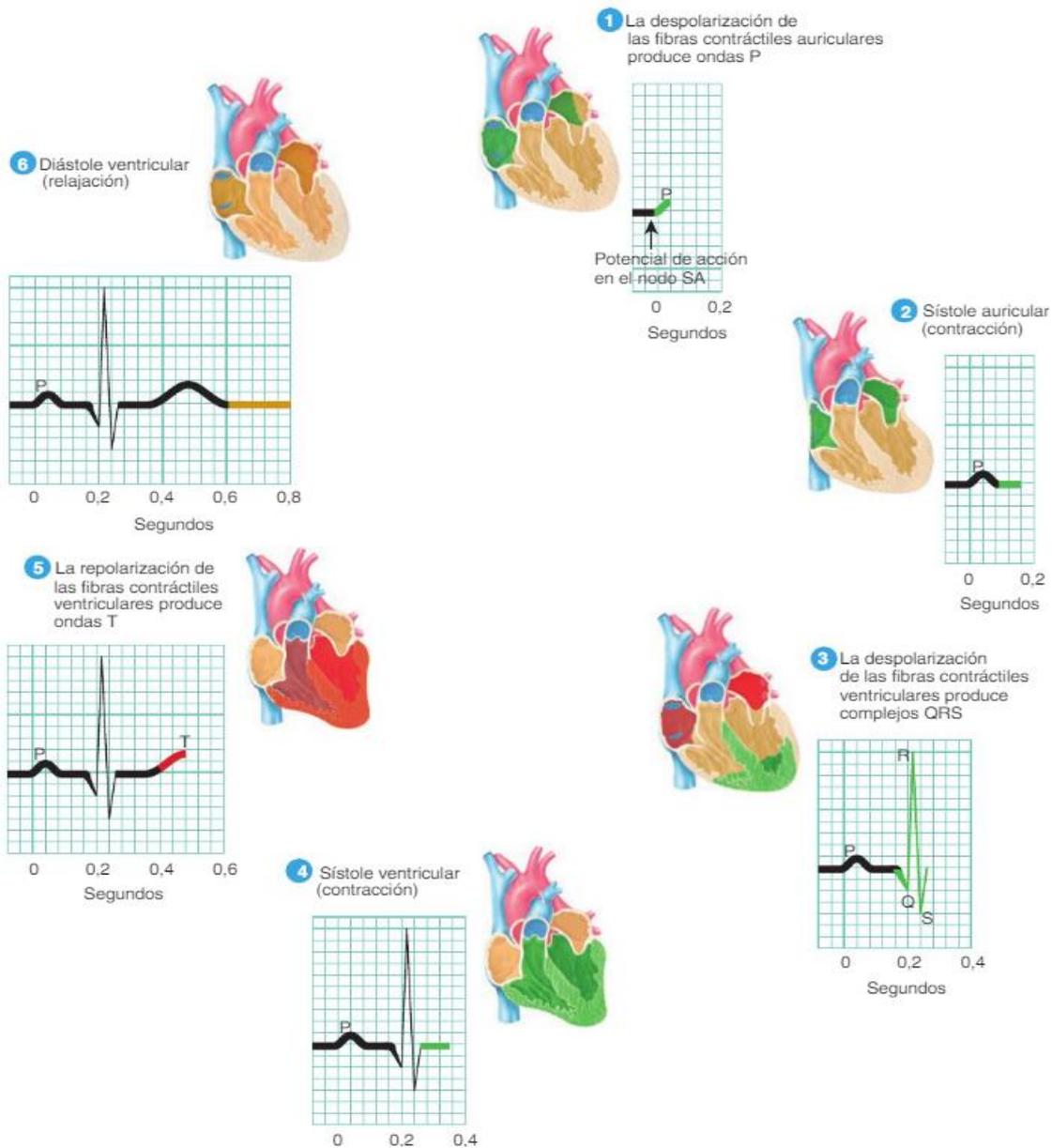


Fig. 6 Secuencia y vía del potencial de acción despolarizante y de la repolarización a través del sistema de conducción del miocardio. El color verde indica despolarización y el color rojo, repolarización. Fuente: Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2018). *Principios de anatomía y fisiología*. Médica Panamericana.

Vasos sanguíneos

Las nociones sobre los tipos de capilares existentes en el cuerpo de los mamíferos, sobre el intercambio capilar y sobre la barrera hematoencefálica dan pistas sobre la interpretación de los resultados del estudio, ya que el comportamiento de penetración de un crioprotector depende de la permeabilidad capilar de cada órgano estudiado.

Tipos de capilares

En el cuerpo hay tres tipos de capilares que se diferencian entre sí por la permeabilidad del tejido endotelial de los mismos. La permeabilidad de sustancias desde la sangre hacia el espacio intersticial celular (filtración) depende de las propiedades de la sustancia (si son liposolubles o hidrosolubles, el tamaño, el tipo o la carga) y del espacio intercelular del endotelio o el tipo de discontinuidad, así como las diferentes presiones parciales.

Los tres tipos de capilares son los continuos, los fenestrados y los sinusoides (Fig. 7). Los capilares con endotelio continuo forman un tubo que solo es interrumpido por hendiduras intercelulares (brechas entre células endoteliales vecinas). Estos capilares son los de más dificultosa penetración, y se encuentran en lugares donde se necesitan barreras naturales más estrictas; en el sistema nervioso central (SNC), en los pulmones, en el tejido muscular y en la piel. “Los capilares fenestrados poseen muchos poros con diámetros de entre 70 y 100 nm. Estos capilares se encuentran en los riñones, las vellosidades del intestino delgado, el plexo coroideo de los ventrículos del cerebro, los procesos ciliares de los ojos y en la mayoría de células endocrinas” (Tortora y Derrickson, 2018, p. 743). Los capilares sinusoides poseen grandes hendiduras intercelulares inusualmente grandes, que permiten el paso a proteínas y, en algunos casos, células sanguíneas, desde y hacia el torrente sanguíneo. Este tipo de capilares están presentes en lugares de intercambio de hormonas (proteínas) y células sanguíneas, como la médula ósea roja (hematopoyesis⁵), el bazo, el hígado, la adenohipófisis, las glándulas suprarrenales y las paratiroides.

Intercambio capilar

El intercambio capilar es el movimiento de líquidos y solutos entre la sangre y el espacio intersticial de los tejidos adyacentes. Hay tres tipos de intercambio capilar; la difusión, la transcitosis y el flujo global.

El método más importante de intercambio capilar es la difusión simple; difunden las sustancias según su gradiente de concentración hacia el líquido intersticial y, después, hacia el interior de las células, o a la inversa. Sustancias como el oxígeno, el dióxido de carbono, la glucosa, aminoácidos

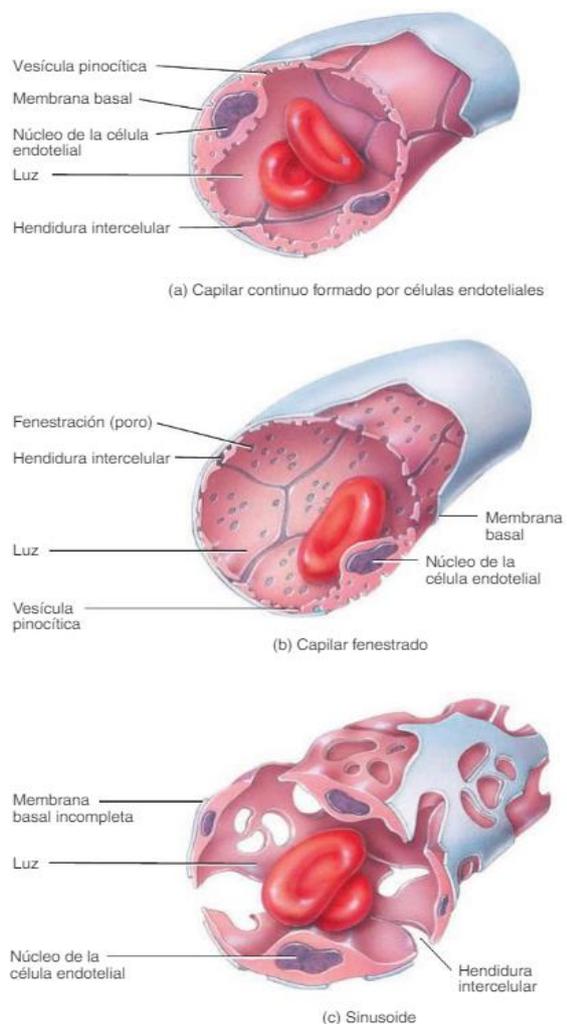


Fig. 7 Tipos de capilares. Capilar continuo (a), capilar fenestrado (b), capilar sinusoide (c). Fuente: Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2018). *Principios de anatomía y fisiología*. Médica Panamericana.

⁵ La hematopoyesis es el proceso de formación, desarrollo y maduración de células sanguíneas. Se lleva a cabo en la médula ósea roja.

y hormonas usan este método de intercambio, así como los desechos liberados por las células. Las sustancias hidrosolubles, como la glucosa y los aminoácidos, atraviesan las paredes de los capilares por las fenestraciones. Las liposolubles, como el oxígeno, el dióxido de carbono y las hormonas esteroideas, pueden atravesar las paredes de los capilares directamente a través de la bicapa lipídica de la membrana de las células endoteliales y células diana.

La mayoría de las proteínas plasmáticas y células no pueden pasar por capilares continuos y fenestrados, porque son demasiado grandes.

Una pequeña cantidad de sustancias atraviesan las paredes de los capilares por transcitosis; este método se basa en que las sustancias intercambien a través de vesículas pinocíticas⁶ que entran y salen de las células por exocitosis. Las sustancias más grandes e insolubles en lípidos sólo pueden atravesar el endotelio capilar por este método.

Por último, el flujo masivo regula los volúmenes globales de la sangre y el líquido intersticial, con el movimiento, pasivo y en la misma dirección, de iones y partículas disueltas en un líquido todas juntas. El flujo masivo se regula gracias a la presión neta de filtración (PNF), que viene determinada por la interacción de cuatro presiones parciales que, dos a dos, favorecen el paso de sustancias desde los capilares hacia el espacio intersticial (filtración) o desde el espacio intersticial hacia los capilares (reabsorción). Las dos presiones parciales que favorecen la filtración son la presión hidrostática sanguínea (PHS), dada por la presión que ejerce el agua del plasma contra las paredes de los vasos, y la presión osmótica del líquido intersticial (POLI), dada principalmente por mínimas cantidades de proteínas presentes en el líquido intersticial. En contraposición, las dos presiones parciales que favorecen la reabsorción son la presión coloidosmótica sanguínea (PCOS), dada por la suspensión coloidal de grandes proteínas plasmáticas, que no pueden atravesar ni fenestraciones ni brechas debido a su tamaño, y la presión hidrostática del líquido intersticial (PHLI), dada por la presión que ejerce el agua del líquido intersticial contra las paredes exteriores de los capilares.

El equilibrio de estas cuatro presiones debe dar una PNF neta de 10 mmHg en el extremo arterial y -9 mmHg en el extremo venoso, ya que las presiones, en estado normal, deben tener un valor constante. Al final, la PNF es la diferencia entre las presiones que favorecen la filtración y las presiones que favorecen la reabsorción (ver Fig. 8). Cabe puntualizar que los valores de las presiones parciales definidos e ilustrados en la Fig. 8 corresponden al estado normal en un humano, pero como factor variable de una especie a otra, se asume que en *Mus musculus* estos valores son diferentes en términos absolutos.

⁶ Una vesícula pinocítica es un compartimento pequeño y cerrado formado por una bicapa fosfolipídica.

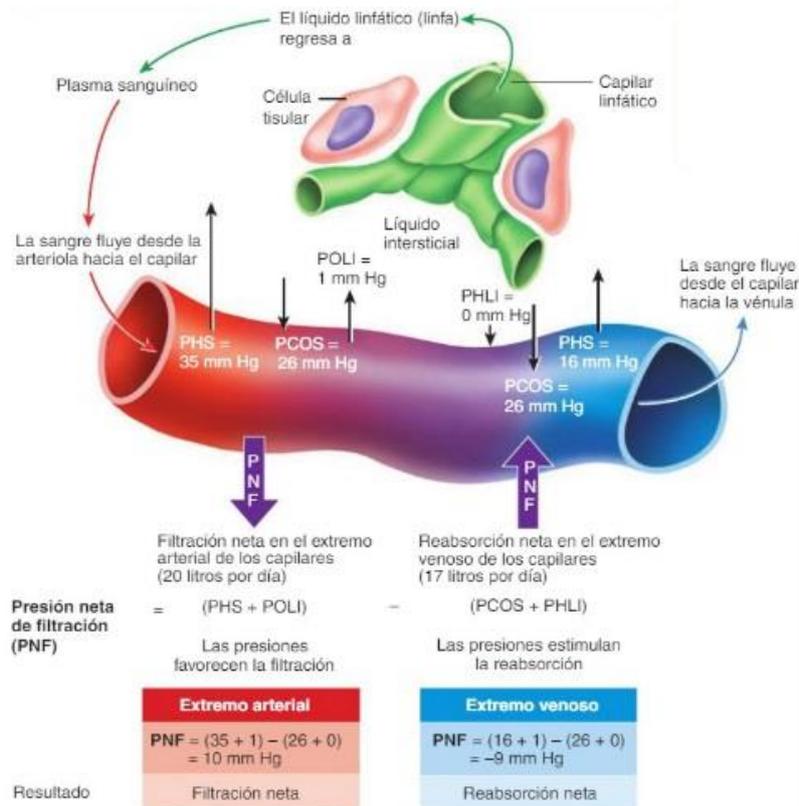


Fig. 8 Diagrama de las presiones parciales que definen el equilibrio de filtración y reabsorción en el flujo masivo. Fuente: Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2018). Principios de anatomía y fisiología. Médica Panamericana.

Cerebro y barrera hematoencefálica

El encéfalo consume alrededor del 20% del oxígeno y glucosa total del organismo. Las neuronas sintetizan ATP casi con exclusividad a partir de la glucosa, por medio de reacciones que requieren oxígeno (glucólisis), y al aumentar la actividad en una zona dada del encéfalo también lo hace el riego sanguíneo a esa región. Por ello, es el órgano más sensible a la hipoxia y a la hipoglucemia. Una breve interrupción de la irrigación sanguínea, de uno a dos minutos, es suficiente para afectar la función neuronal; y la anoxia durante cerca de cuatro minutos causa daño permanente. Además, como la glucosa no se almacena en el encéfalo en forma de glucógeno, el flujo sanguíneo debe ser continuo.

Los capilares del encéfalo son del tipo continuo, lo que significa que solo permite a unas pocas sustancias moverse a través de sus paredes (sustancias disueltas o con un diámetro menor de 70 nm). Además, las células endoteliales de la mayoría de los capilares cerebrales están sellados entre sí por uniones estrechas (los astrocitos rodean los capilares con prolongaciones y segregan sustancias químicas que mantienen las características de permeabilidad de las uniones estrechas). Este bloqueo de movimiento de sustancias hacia adentro y hacia afuera de los capilares cerebrales se conoce como barrera hematoencefálica. Hay áreas del encéfalo donde esta barrera falta, regiones donde existen glándulas endocrinas como el hipotálamo, la glándula pineal y la glándula hipófisis, y el intercambio de sustancias se realiza más libremente en ellas.

Las sustancias liposolubles (O_2 , CO_2 , hormonas esteroideas, alcohol, barbitúricos, nicotina, cafeína) y moléculas de agua cruzan fácilmente la barrera por difusión a través de la bicapa lipídica de las membranas de las células endoteliales de los capilares. Pocas sustancias

hidrosolubles atraviesan con rapidez la barrera hematoencefálica por difusión facilitada y otras lo hacen con gran lentitud, como los iones. Otras sustancias, como proteínas y muchos antibióticos, no pueden pasar de la sangre al encéfalo. Los traumatismos, determinadas toxinas y la inflamación pueden provocar una rotura en la barrera hematoencefálica.

Un dato interesante es que las soluciones concentradas en glucosa pueden hacer más permeable la barrera hematoencefálica.

“La elevada presión osmótica de una solución concentrada en glucosa hace que las células endoteliales de los capilares se contraigan, lo que determina la apertura entre los espacios entre las uniones estrechas y el aumento de permeabilidad de la barrera hematoencefálica”, (Tortora y Derrickson, 2018, p. 481).

El proyecto

El principal objetivo de este proyecto es el de explorar una técnica para la criopreservación de dos órganos concretos; encéfalo y corazón de ratón (*Mus musculus*); y esta técnica está basada en la que utilizó G. M. Fahy y su equipo para la vitrificación exitosa de riñones de conejo.

La técnica de criopreservación escogida es la vitrificación en equilibrio. Esta técnica permite criopreservar órganos complejos sin que se formen cristales, a diferencia de la congelación lenta, y no requiere una velocidad de enfriamiento demasiado rápida, como pasa con la vitrificación ultrarrápida. En la vitrificación en equilibrio simplemente se aumenta la concentración de crioprotector necesaria para impedir la formación de cristales y, a la vez, la toxicidad, a cada temperatura. Para entender las razones físicas y químicas por las que se ha escogido esta técnica es necesario dirigirse al apartado de “*Fundamentos de criopreservación*”.

Para llevar a cabo la vitrificación equilibrada para corazón y encéfalo de ratón se hicieron una serie de procedimientos que, en un resumen esclarecedor, consistieron en la extracción del órgano objetivo, una perfusión artificial para exanguinar dicho órgano *ex vivo* manteniéndolo con vida (mediante un sistema de perfusión hidráulico), la vitrificación equilibrada mediante el equipo BioCool, y su correspondiente almacenamiento en frío, que varía en función del análisis posterior que se requiera hacer.

OBJETIVOS

El objetivo del proyecto es aplicar la técnica de vitrificación en equilibrio sobre dos órganos concretos: encéfalo y corazón de ratón (*Mus musculus*); utilizando una curva de enfriamiento y concentración de crioprotector (Dimetil sulfóxido) basada en la que utilizó G. M. Fahy y su equipo para la vitrificación exitosa de riñones de conejo, y hacer un análisis posterior para verificar que el crioprotector se ha cargado en los órganos en una concentración suficiente mediante Tomografía Axial Computerizada (TAC).

Para ello hay que lograr varios objetivos específicos, concretamente, los procedimientos quirúrgicos correctos que permitan la extracción del corazón y del encéfalo de *Mus musculus*, la canulación del corazón para acoplarlo a un sistema de perfusión que le proporciona soporte vital *ex vivo* (método Langendorff o perfusión retrógrada) y, finalmente, la vitrificación y almacenamiento posteriores de ambos órganos.

El último objetivo específico es encontrar relaciones, mediante tratamientos estadísticos, entre diferentes factores para evaluar qué puntos son críticos a la hora de aplicar todo el procedimiento y encontrar las causas de los éxitos y fracasos que muestren los resultados, para así perfeccionar la técnica de enfriamiento mediante vitrificación equilibrada y seguir con los proyectos futuros correspondientes al recalentamiento de los órganos, análisis de viabilidad y de daños tisulares.

METODOLOGÍA

A continuación, se presenta un diagrama de flujo que explica el procedimiento general metodológico (Fig. 9) dividido en dos ramas que varían según si el procedimiento es para la vitrificación de encéfalo (seguir “Si encéfalo”) o si es corazón (seguir “Si corazón”). Cabe puntualizar que para entender en profundidad cada uno de los métodos y los equipos utilizados hay que dirigirse a los apartados de “Materiales” y “Métodos”.

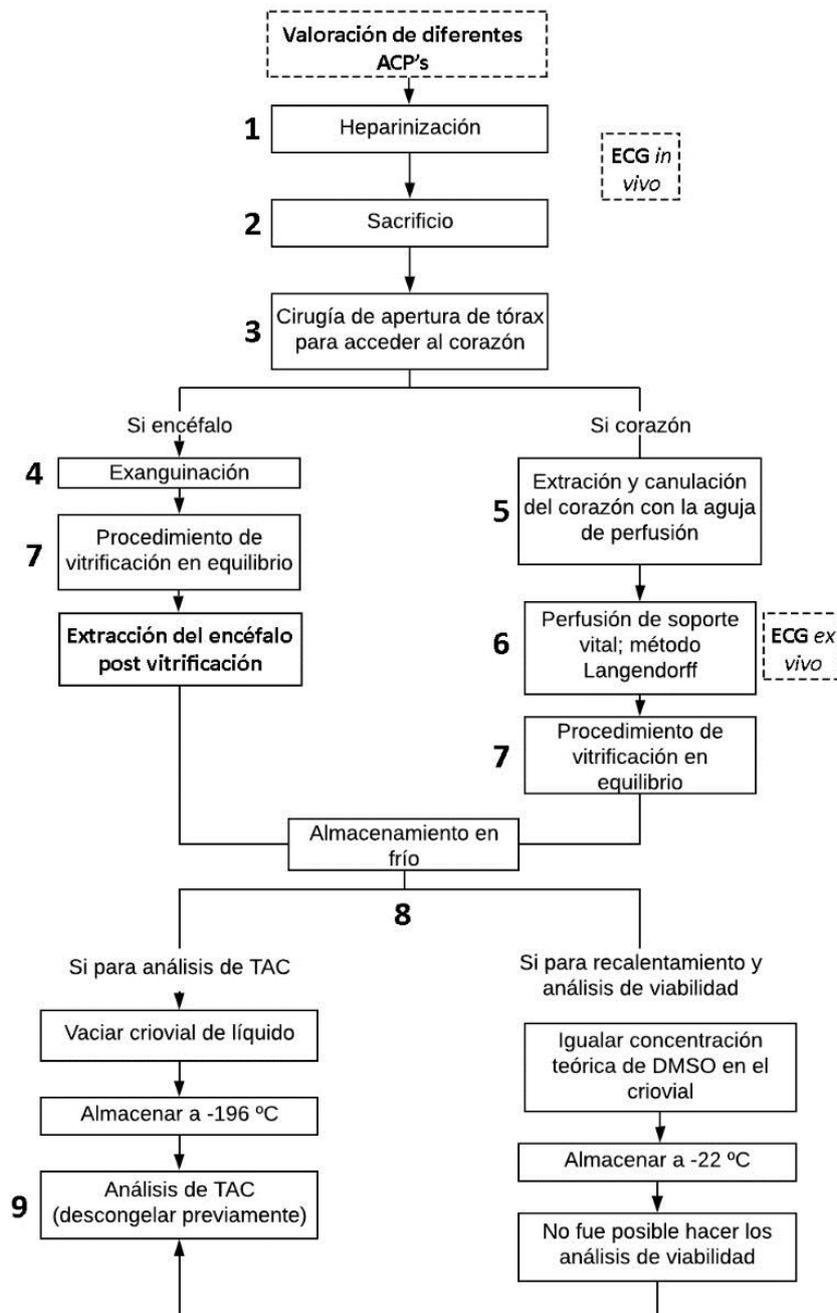


Fig. 9 Diagrama de flujo del procedimiento global para la vitrificación equilibrada de encéfalo y corazón. Los números hacen referencia al material utilizado para cada método. Los recuadros discontinuos hacen referencia a los métodos complementarios y su posición los momentos en los que se han aplicado. 1/ Heparina y jeringa de insulina. 2/ TBE al 2%. 3/ Material quirúrgico y etanol. 4/ Soporte impreso en 3D para acoplar el ratón para método de vitrificación de encéfalo. 5/ Material quirúrgico, Tyrodé's, aguja de canulación. 6/ Sistema hidráulico, bomba de jeringa y baño Langendorff. 7/ BioCool, sistema hidráulico de bombas peristálticas, Picolog y termopares. 8/ Cámara fría a -22 °C o cántara de nitrógeno a -196 °C. 9/ Equipo de TAC. Fuente: propia.

En total se han llevado a cabo 32 procedimientos divididos en diferentes grupos según el método aplicado. 17 ratones fueron empleados para la práctica de procedimientos quirúrgicos, sobretodo la canulación de la aorta del corazón en el mínimo tiempo posible. Algunos de ellos se descartaron por incidencias en el procedimiento, normalmente de fallo humano, como perforación de la aorta u otra pared cardíaca, excesivo tiempo de cirugía o mal diseño (y, por tanto, función) de la pieza diseñada y fabricada con la impresora 3D.

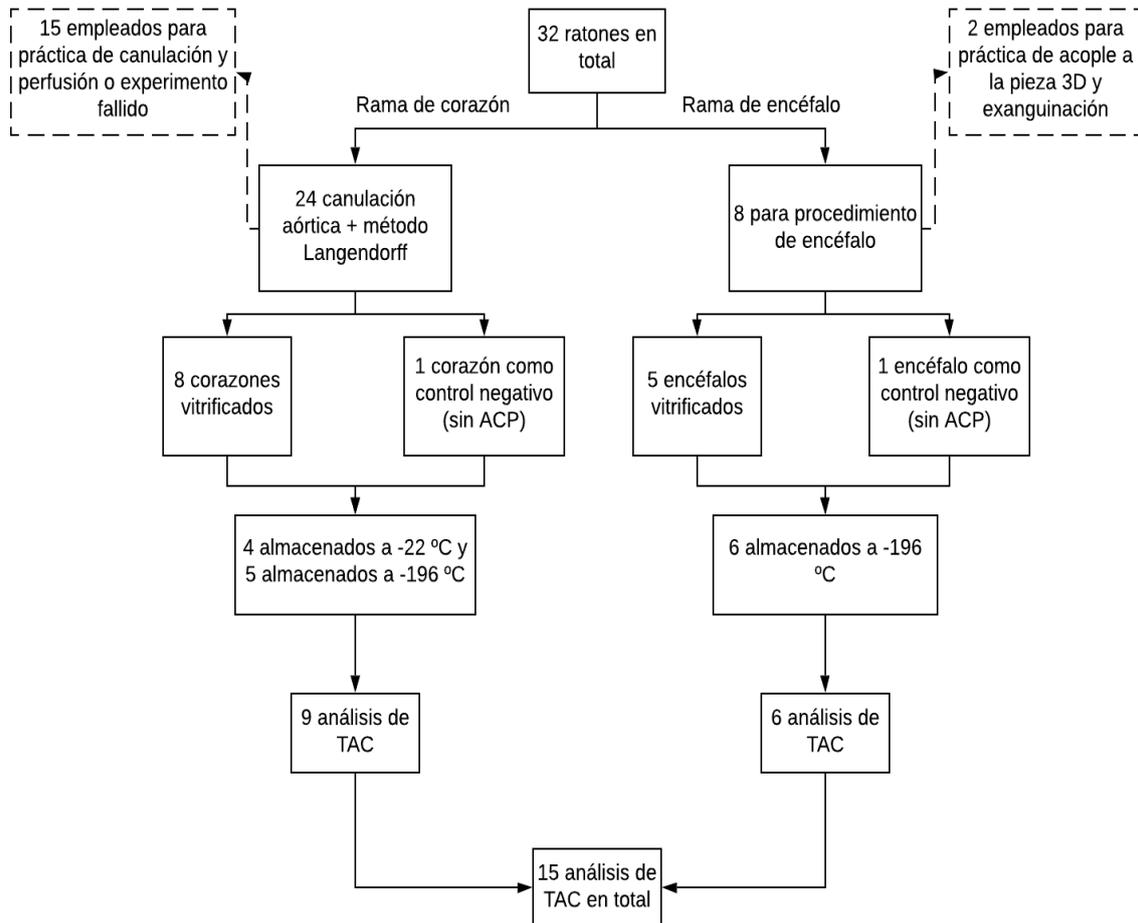


Fig. 10 Diagrama de los grupos de ratones utilizados para cada procedimiento. Fuente: propia.

Materiales

Se ha utilizado una serie de material entre reactivos, material fungible y material inventariable. Las especificaciones técnicas de todos los reactivos, equipos y sus caracterizaciones se encuentran detallados en el Anexo I. Material. En este apartado se describe brevemente lo que son y para qué se han utilizado. En la Tabla 1 se han resumido todos ellos para facilitar una idea general.

Tabla 1. Resumen de los químicos, material y equipos utilizados. Fuente: propia.

Reactivos/químicos	Material fungible	Material inventariable
- Carbógeno	- Bombona de carbógeno	- Agitador magnético
- Dimetil sulfóxido (DMSO)	- Cántara de nitrógeno líquido	- Balanza analítica digital
- Etilenglicol	- Material quirúrgico de acero inoxidable	- Baño incubador
- Glicerol	- Material de plástico contenedor	- BioCool
- Hidróxido de Sodio	- Material de sujeción de metal	- Bomba de jeringa HARVARD PHD 4400
- Nitrógeno líquido	- Material de vidrio de precisión (volumetría)	- Bombas peristálticas
- Phosphate Buffered Solution (PBS)	- Material de canalización hidráulica	- Electrocardiograma (ECG)
- Tampón de pH para calibración del multiparamétrico		- Lupa de laboratorio con plataforma iluminada
- Tribromoethanol (TBE)		- Manómetro
- Tyrode's HEPES		- Manorreductor
- Silicona		- Microscopio óptico
- Estaño		- Multiparamétrico (pHmetro)
- Plástico de impresión		- Pícolog y termopares
- Epoxi		- Refractómetro
		- Tomografía Axial Computerizada (TAC)
		- Soldador
		- Pistola de silicona
		- Impresora 3D Ender 3 Creality

Reactivos/químicos

Esencialmente se han utilizado siete sustancias para llevar a cabo todos los experimentos. Todas las diluciones y disoluciones se han hecho con agua pura. A continuación,

se detallan las características generales de cada uno. En la Tabla 2 se han descrito algunas propiedades físicas relevantes de cada uno de ellos.

Tabla 2. Lista de químicos utilizados y sus propiedades esenciales. Fuente: propia.

Nombre	Fórmula	Peso molecular (g/mol)	Punto ebullición (K)	Punto fusión (K)	Densidad (Kg/m ³)	Viscosidad (Pa·s a 20 °C)
Carbógeno	5% CO ₂ + 95% O ₂					
Dimetil sulfóxido (DMSO) ^a	(CH ₃) ₂ SO	78,13	462 K (189 °C)	292 K (19 °C)	1100,4	0.002
Etilenglicol ^a	C ₂ H ₆ O ₂	62,07	470 K (197 °C)	260 K (-13 °C)	1116	0.016
Glicerol ^a	C ₃ H ₈ O ₃	92,10	563 K (290 °C)	291 K (18 °C)	1261	1,500
Heparina ^b	C ₂₆ H ₄₁ N ₁₀ = 34S ₄	12000				
Hidróxido de Sodio	NaOH	40.00	1663 K (1390 °C)	591 K (318 °C)	2100	
Nitrógeno	N ₂ (l)	28.00	77.35 K (-196 °C)	63.14 K (-210 °C)	1.2506	1.80·10 ⁻⁵
Buffer Phosphate Saline (PBS) ^c	Medio					
Tribromo-ethanol (TBE) ^d	C ₂ H ₃ Br ₃ O					
Tyrode's ^c	Medio					

^a Agente Crioprotector (ACP)

^b Anticoagulante

^c Solución con mezcla de sales y glucosa, oxigenada con carbógeno y a pH 7.4. Preparada en el laboratorio

^d Anestesia

Carbógeno

El carbógeno es una mezcla de 5% CO₂ en 95% O₂ v/v. A temperatura ambiente su estado es gaseoso. Se ha utilizado para la oxigenación y regulación del pH en los medios PBS y Tyrode's. Hay que prestar especial atención al pH del medio que se está oxigenando, ya que el CO₂ contenido en el carbógeno reacciona con el agua acidificando el medio.

El carbógeno se contenía comprimido en una bombona especial que soporta los 150 Kg de presión, y se extraía de la misma mediante un manorreductor que adecuaba la salida a un rango de presión de entre 0 y 5 Kg.

Para comprobar si se saturaba la solución de oxígeno, se medía la bajada de pH hasta estabilizarse. Esta bajada de pH se debía a la disolución de CO₂ en la solución, que reacciona con el agua para formar ácido carbónico. Dado que el CO₂ tiene una constante de Henry mayor a la del oxígeno ($3,2 \cdot 10^{-2}$ frente a $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{atm}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$), se asume que cuando se

estabiliza el pH la solución se ha saturado de CO₂ y, por tanto, también de oxígeno. Luego se volvía a subir el pH hasta 7.4 mediante la adición de hidróxido de sodio (NaOH).

DMSO

El dimetil sulfóxido ((CH₃)₂SO) es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, poco volátil, incoloro e higroscópico y de bajo peso molecular. Dada su alta polaridad este químico es miscible tanto con agua como con otros disolventes orgánicos, a excepción de algunos hidrocarburos. El DMSO puro o casi puro solidifica a 18.5 °C, por lo que para evitar esta reacción conviene diluirlo con otra sustancia.

El dimetil sulfóxido se ha utilizado como Agente Crioprotector (ACP) en el procedimiento de vitrificación en equilibrio de órganos y su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales. Su bajo peso molecular permite la entrada rápida a través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa fosfolipídica, así como también afecta a los procesos de solvatación de agua (Ávila-Portillo et al., 2006).

Advertencia: el DMSO puede causar problemas con el material y equipos de laboratorio que no sean de silicona y/o polietileno, dañando y provocando fugas en sistemas hidráulicos y de canalización.

Etilenglicol:

El etilenglicol (C₂H₆O₂) es un compuesto orgánico perteneciente al grupo de los dioles. A temperatura ambiente se presenta en estado de líquido incoloro. Su viscosidad es relativamente alta en relación al agua (1.61·10⁻² Pa·s). Se ha evaluado como Agente Crioprotector (ACP).

Glicerol:

El glicerol, 1,2,3-propanotriol o glicerina (C₃H₈O₃) es un alcohol que se presenta en estado líquido a 25 °C, es higroscópico e incoloro. Destaca por su alta viscosidad, de 1.5 Pa·s frente a la del agua de sólo 1.00·10⁻³ Pa·s. Se ha evaluado como posible Agente Crioprotector (ACP).

Heparina:

La heparina, con fórmula C₂₆H₄₁N₁₀₋₃₄S₄, es un anticoagulante que se inyecta por vía subcutánea, intravenosa o intraperitoneal y que actúa sobre la trombina, un importante factor de la coagulación, impidiendo la formación de trombos.

La heparina se ha utilizado para impedir la obstrucción del sistema vascular con la subsiguiente rotura de vasos. En todos los experimentos se ha administrado mediante inyección intraperitoneal 45 minutos antes de cualquier procedimiento.

NaOH:

El hidróxido de sodio (NaOH) o sosa cáustica es un sólido cristalino a temperatura ambiente, inodoro e higroscópico. Para mantenerlo en estado líquido se mezcla con agua. El hidróxido de sodio es muy corrosivo y se disuelve en agua disociándose en iones de sodio e hidróxidos negativos, lo que basicifica el medio en el que se encuentre. Se ha utilizado como regulador de pH de los medios PBS y Tyrode's después de la oxigenación con carbógeno.

Nitrógeno líquido:

El nitrógeno líquido se ha utilizado para conservar las muestras a la espera de realizar las Tomografías Computerizadas.

El nitrógeno líquido es nitrógeno puro a una temperatura inferior a su punto de ebullición (-196 °C) a una presión de 1 atm. El nitrógeno se ha almacenado en cántaras de nitrógeno especiales para contener esta sustancia.

Buffer Phosphate Saline (PBS):

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

Se ha utilizado como portador de ACP durante la curva de enfriamiento con su correspondiente oxigenación.

El PBS ha sido preparado en el laboratorio mediante pesado de los reactivos en balanza analítica y enrase con agua pura a 1L en matraz aforado. Su preparación se detalla en el Anexo Ib. Preparación de reactivos. El PBS preparado se compone de 8.06 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.22 g de cloruro de potasio (KCl), 1.15 g de fosfato disódico (Na₂HPO₄) y 0.20 g de fosfato dipotásico (KH₂PO₄).

Tribromoethanol (TBE):

El tribromoethanol (en adelante TBE), con fórmula C₂H₃Br₃O, es un sedante usado ampliamente para anestesiar animales de laboratorio, particularmente roedores, antes de la cirugía. Este sedante fue utilizado como anestésico general en humanos en la primera mitad del siglo XX. Su mecanismo de acción se basa en actuar como modulador alostérico positivo en los receptores inhibitorios GABA_A y glicina (Krasowski y Harrison, 2000), produciendo una anestesia rápida y profunda, seguida de una recuperación rápida y completa (Allan et al., 1999).

El TBE se ha usado en el proyecto para la eutanasia previa al procedimiento experimental en vitrificación equilibrada de tejido nervioso.

Tyrode's Buffered HEPES:

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

La solución Tyrode's HEPES se preparó pesando los reactivos en balanza analítica y enrasando con agua pura hasta 1L con matraz aforado. El Tyrode's preparado se compone de 5.844 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.403 g de cloruro potásico (KCl), 0.203 g de cloruro de magnesio (MgCl₂), 0.265 g de cloruro de calcio dihidratado, 2.383 g de tampón HEPES y 4.504 g de glucosa (C₆H₁₂O₆). La descripción del método de preparación detallada se incluye en el Anexo Ib. *Preparación de medios.*

Material fungible

Para la preparación de reactivos y procedimientos de medida y cirugía se ha empleado material de laboratorio homologado y resistente a la acción de agentes químicos; material de vidrio volumétrico para preparar soluciones y disoluciones, micropipetas, material contenedor de plástico como pueden ser embudos, tubos de ensayos, crioviales, pipetas Pasteur de plástico, etc., material de sujeción de metal (nueces y soportes), material de canalización hidráulica (tubos de silicona, plástico, llaves de paso, etc.), material de acero inoxidable para cirugía (Fig. 11) y finalmente los recipientes de metal contenedores de carbógeno y nitrógeno líquido, especialmente diseñados para ello.

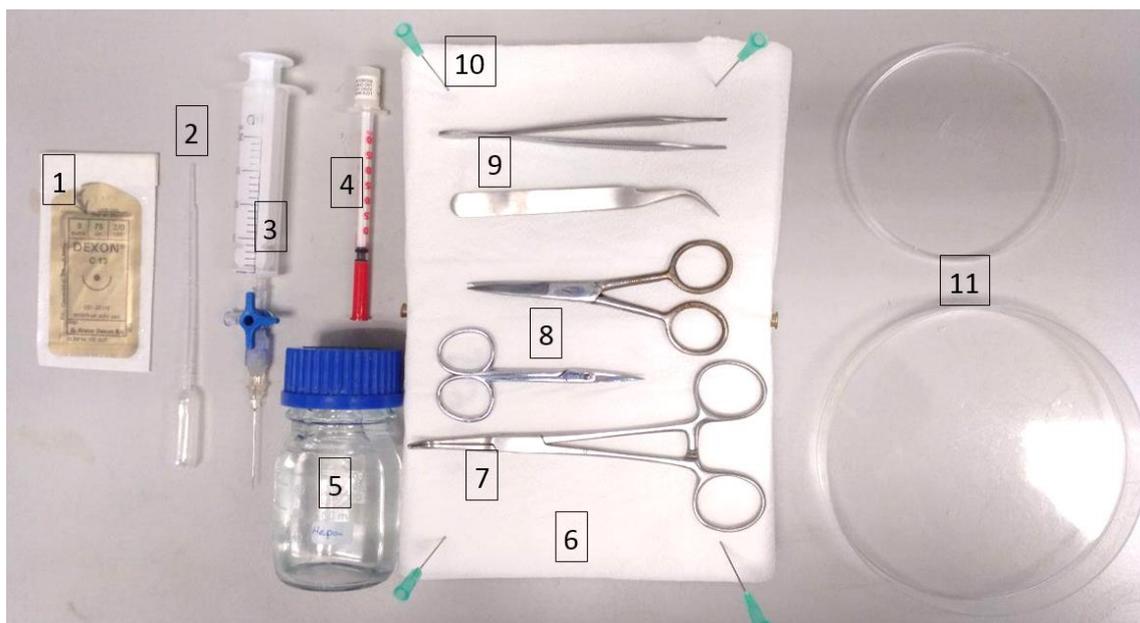


Fig. 11 Material quirúrgico empleado en los procedimientos de cirugía. 1/ Hilo de sutura. 2/ Pipeta Pasteur de plástico. 3/ Aguja hueca acoplada a una llave de paso acoplada a una jeringuilla de 20 mL. 4/ Jeringuilla de insulina. 5/ Bote de cristal contenedor. 6/ Tabla de corcho cubierto de papel de laboratorio. 7/ Pinzas fijas de punta curva. 8/ Tijeras de punta fina. 9/ Pinzas de punta recta (superior) y de punta curva (inferior). 10/ Agujas. 11/ Placas de Petri. 12/ Espátula (falta). Fuente: propia.

Material inventariable

Las fotografías y especificaciones técnicas, caracterización de los equipos y los cálculos se encuentran en el Anexo Ic. y Anexo III.

Baño incubador:

El baño incubador se ha utilizado para llevar a cabo el método Langendorff. Consiste en una resistencia sumergida en una cubeta de agua que cede calor hasta calentarla hasta una temperatura programable. El cabezal del baño fijaba también un flujo de agua caliente para homogeneizar la temperatura en todo el baño.

BioCool:

El BioCool es un equipo de control de rectas de temperatura. El aparato dispone de un depósito cilíndrico de aproximadamente diez centímetros de diámetro y treinta centímetros de alto. Este depósito se rellena con una mezcla de agua y etanol para facilitar la cesión de energía

calorífica al medio y a la muestra que se ponga en el interior del depósito. La mezcla debe estar agitándose continuamente mientras en BioCool está funcionando.

El aparato permite programar rectas de bajada de temperatura añadiendo respectivamente la temperatura inicial deseada, la temperatura final deseada, la velocidad de enfriamiento y el tiempo que se desea que el BioCool mantenga esa última temperatura antes de acabar el programa. La capacidad de enfriamiento llega a un umbral mínimo de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, y no es capaz de realizar el proceso a la inversa (recalentamiento). Este equipo es el eje principal del proyecto.

Bomba de jeringa HARVARD modelo PHD 4400 Programable:

La bomba de jeringa es un aparato que controla la presión a la que un líquido transfiere desde una jeringuilla hacia un sistema hidráulico. La bomba ejerce una presión determinada programable sobre el émbolo de una jeringuilla fijada al soporte de la bomba. El émbolo es presionado a una determinada velocidad, y esta velocidad determinará el caudal del líquido en el extremo del sistema hidráulico.

La bomba es programable en diferentes unidades de caudal, a saber; $\mu\text{/min}$, mL/min , mL/h . Es necesario especificar el volumen de la jeringuilla colocada en el soporte.

Este equipo ha sido utilizado esencialmente para la perfusión en el procedimiento del método Langendorff.

Bombas peristálticas:

Las bombas peristálticas funcionan por propulsión compartimentada del fluido. Esto es, un rodillo comprime un tubo deformable (generalmente silicona) de un diámetro dado, contra la pared interior del compresor, generando así un bloqueo físico para el fluido, que sólo puede avanzar en la dirección no bloqueada. Es compartimentada, porque la presencia de dos o más rodillos delimita el volumen de fluido que se suministra en la rotación. A efectos prácticos, es como si se dispusiera de un conducto lleno de líquido, y se comprimiera con las manos de forma secuencial y hacia delante para impulsar dicho fluido. Son bombas muy útiles pues no necesitan altas revoluciones para impulsar el fluido, no tienen contacto directo con la sustancia (lo cual es ideal para aplicaciones biológicas), se puede modificar el caudal suministrado no sólo con la velocidad de revolución sino también con las propiedades geométricas del tubo interior, y además generan un flujo no turbulento en el entubado dadas las bajas revoluciones del rotor" (Alcalá, 2019).

En la Fig. 12 se encuentra representado el funcionamiento gráfico de una bomba peristáltica.

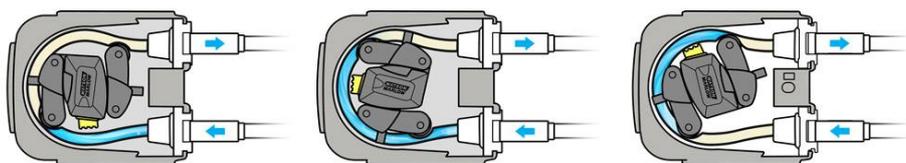


Fig. 12 Funcionamiento de una bomba peristáltica. Fuente: Alcalá, 2019.

Se ha dispuesto de dos bombas peristálticas para dirigir el DMSO y el PBS, a una determinado caudal en función del tiempo, desde los depósitos hasta la aguja de perfusión en el procedimiento de vitrificación equilibrada de ambos órganos.

Electrocardiograma (ECG):

El electrocardiograma (ECG en adelante) es el registro gráfico de la actividad eléctrica del corazón capturada externamente por electrodos adheridos a la piel. Este registro permite obtener información de manera cuantitativa sobre el comportamiento de la sístole y diástole de las aurículas y ventrículos cardíacos por separado, así como la frecuencia cardíaca y el comportamiento arrítmico.

El ECG se ha utilizado para el registro de la frecuencia cardíaca de los individuos de experimentación sanos y su comparación con el ECG del corazón *ex vivo* cuando se encuentra con soporte vital en el método Langendorff.

El ECG que se ha utilizado en el proyecto es una adaptación de un ECG hecho para humano a ratón; se han sustituido los parches adherentes donde se acoplan los electrodos por monedas de un céntimo para medir la actividad eléctrica cardíaca de ratones *in vivo*, y por agujas metálicas cuando se adaptó para medir la actividad directamente sobre el corazón *ex vivo*. Los detalles de la adaptación del ECG se encuentran en el Anexo Ia. Diseño y modificación de equipos.

Lupa de laboratorio con plataforma iluminada

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

Con el transcurso de los experimentos y la experiencia, fue dejando de ser necesario su uso, pues la aorta se hacía apreciable a simple vista y se podía canular con sencillez” (Alcalá, 2019).

Multiparamétrico Waterproof:

Este equipo es un analizador potenciómetro portátil que mide varios parámetros en agua u otro líquido parecido. Puede medir el pH, la temperatura y la conductividad. Este equipo se compró nuevo y se calibró mediante las soluciones tampón que venían de serie. El multiparamétrico se utilizó exclusivamente para medir el pH de la solución Tyrode's que se iba a perfundir a corazón y/o encéfalo.

Picolog y termopares:

Un termopar es un instrumento que permite medir la temperatura de zonas a las que con termómetros normalmente no se podría llegar. Un termopar es la unión en forma de hélice de dos filamentos metálicos, uno de cobre y otro de hierro, que por efecto Seebeck dan un valor

de temperatura en tiempo real en función de la diferencia de potencial que se produce por la unión de dos metales distintos, y esta diferencia de potencial es función de la diferencia de temperatura entre uno de los extremos, denominado “punto caliente”, y el otro llamado “punto frío”. Estos termopares pasan la señal eléctrica por un transductor que interpreta y traduce la señal eléctrica a datos digitales (Pícolog). Este aparato permite guardar un registro de las temperaturas registradas por los termopares en cada unidad de tiempo, definida por el técnico, para después poder visualizar gráficamente los datos.

Refractómetro:

El refractómetro es un aparato destinado a medir el índice de refracción de un medio material. Se basa en la medida del llamado ángulo crítico (el ángulo de incidencia de la radiación es de 90° respecto a la recta perpendicular a la interfaz de separación entre un medio de índice de refracción conocido y otro desconocido) de un material.

El refractómetro usa una escala de unidades llamada Brix%, que representa el tanto por ciento en masa, es decir, gramos de sólido disuelto por cada cien gramos de disolución total.

La fracción de color blanco indica en unidades Brix% el índice de refracción de la disolución.

Tomografía Axial Computerizada (TAC):

Se ha utilizado el TAC del Centro Nacional de Aceleradores (en adelante CNA) para hacer una determinación de la penetrabilidad del DMSO en los tejidos perfundidos durante el proceso de vitrificación.

El TAC es un aparato que emite un haz de rayos X que incide sobre la muestra objeto de estudio. La radiación no absorbida por el objeto es recogida por los detectores que se encuentran justo en frente del emisor, y se calcula una diferencia de absorción de radiación. Estas diferencias permiten observar las diferencias entre densidades de la muestra. El emisor cambia su orientación hasta hacer un recorrido de 360° y guardando fotografías de cada proyección, programable por el técnico. Las fotografías son sometidas posteriormente a una reconstrucción 3D.

El aparato da los valores en datos crudos (RAW Data), una escala de coeficientes de atenuación lineal de rayos X, pero las unidades que se utilizan para describir los diferentes niveles de radiodensidad de los tejidos es la escala de Unidades Hounsfield (HU). En esta nueva escala el valor de atenuación del agua destilada en Condiciones Normales de Presión y Temperatura (CNPT) se define como 0 HU, la del aire en CNPT se define como -1000 HU y 1000 HU para la absorción de rayos X del hueso compacto. La fórmula que se utiliza para hacer la conversión de escala es la siguiente:

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

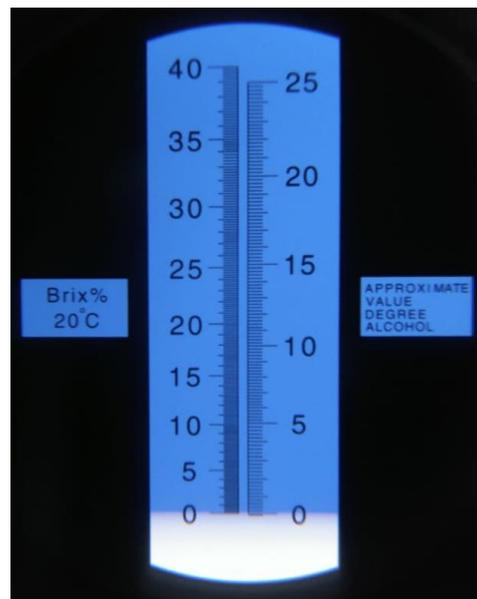


Fig. 13 Escala del refractómetro en Brix% a 20 °C, a la izquierda indicando el 0 Brix% del agua destilada.

Donde μ_{agua} es el coeficiente de atenuación lineal del agua destilada y μ_t el coeficiente de atenuación lineal del tejido o material de interés.

El TAC ha sido utilizado en la evaluación de penetrabilidad de DMSO en tejido nervioso y cardíaco, ya que los átomos de azufre de la molécula de DMSO tienen una gran absorción de los rayos X que irradia el TAC. Esta propiedad permite que las imágenes salgan con un gran contraste de densidades y puedan visualizarse las concentraciones de DMSO retenidas en tejidos blandos.

Animales

Se han utilizado seis cepas diferentes de la especie de ratón *Mus musculus*. Al ser un Trabajo de Final de Grado y, por tanto, un proyecto estudiantil, no ha sido posible disponer de una única cepa homogénea de animales, sino que se ha dispuesto de lo que los centros adscritos a la Universidad de Sevilla han podido ceder sin ánimo de lucro; agradecer encarecidamente al Instituto de Investigación Biomédica de Sevilla (en adelante IBIS) y al Hospital Universitario Virgen de la Macarena por su colaboración. Por tanto, se ha dispuesto de una muestra de características, sexos y edades heterogénea, pero se considera que esta heterogeneidad no perjudica la significación del estudio al no interferir de modo alguno en los procesos estudiados. A continuación, se enumeran las cepas utilizadas y en el Anexo Id. Caracterización de las cepas de ratón (*Mus musculus*) se detallan las características de cada una de ellas.

- Beige
- C57
- C57C3H
- CD1
- FVB
- TS1CJE

No se ha informado de ninguna cepa portadora de patologías de ningún tipo, a excepción de la cepa TS1CJE que tenían Síndrome de Down. Esta patología no tiene ninguna influencia para el estudio del corazón y cerebro.

Métodos

Valoración de varios Agentes Crioprotectores (ACP)

En el método de vitrificación equilibrada se llega a una temperatura mínima de $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, posteriormente, se almacena la muestra en cámara fría a $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Teniendo esto en cuenta, se han seguido tres criterios para la elección del ACP: el tamaño del material biológico, la penetrabilidad del crioprotector en los tejidos (Alcalá, 2019) y la temperatura de almacenamiento.

Debido al primer criterio, el tamaño del material biológico, se descartaron crioprotectores que actúan desplazando y deshidratando células individuales hacia el espacio entre dendritas de hielo, dado que esta técnica de congelación sirve para preservar células individuales (células germinales, embriones, blastocitos, etc), pero no tejidos, ya que el desplazamiento de células resultaría en la destrucción tisular y pérdida de la correcta funcionalidad del órgano. Ejemplos de crioprotectores con este mecanismo de acción son el 1-2 propanediol (PROH), el etilenglicol o el glicerol. El segundo criterio, la capacidad de penetración del crioprotector en los tejidos, es crítico a la hora de obtener una rápida y correcta

difusión del ACP a través de la bicapa fosfolipídica celular. Según Ávila-Portillo et al., (2006) en su artículo de revisión sobre los fundamentos básicos de la criopreservación, “son crioprotectores permeables a través de la membrana celular el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO) y el propanediol (PROH)”. Por último, pero no menos importante, el tercer criterio es esencial para el objetivo de evitar la formación de cristales de hielo, y esta propiedad es la que se ha valorado para la determinar cuál es el mejor ACP disponible a utilizar, teniendo en cuenta otras propiedades como la viscosidad.

Así pues, se han valorado tres crioprotectores penetrantes según su cristalización en función de la concentración de crioprotector; dos alcoholes (etanol y glicerol) frente al DMSO, hasta ahora, la mejor opción entre la revisión bibliográfica.

Para ello se ha hecho un banco de diluciones para cada una de las sustancias, en matriz de PBS, a diferente concentración y con controles de etanol, PBS y ACP casi puros (99%). Para hacer el banco a intervalos de concentración de crioprotector desde el 5% hasta el 100%, se usaron placas de seis pocillos en serie y se almacenaron en cámara fría a $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$. El volumen necesario de cada sustancia para obtener la concentración v/v deseada se hizo siguiendo el siguiente cálculo:

$$\text{volumen soluto} = \frac{\% \text{ deseado}}{100} \cdot \text{volumen total}$$

Luego se retiraron las placas de la cámara fría 24 horas después, obteniendo los resultados representados en las Fig. 14 y Fig. 15.

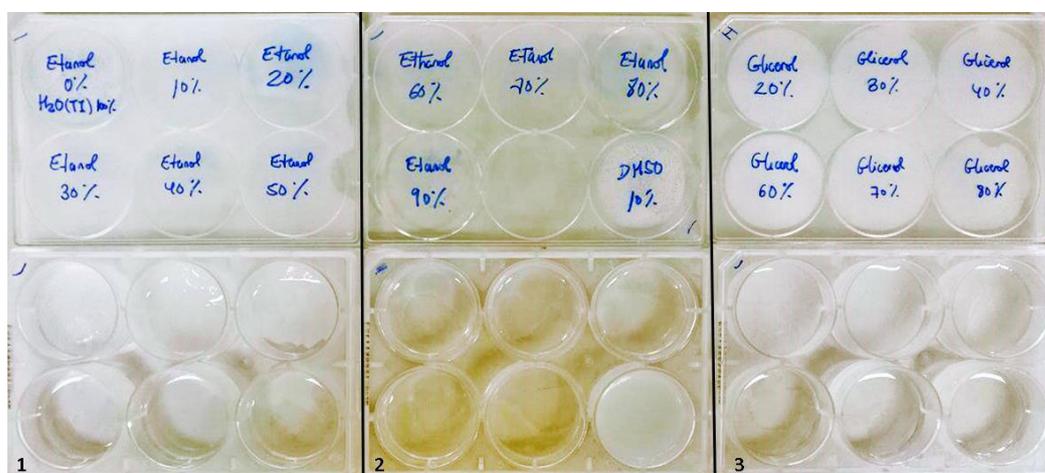


Fig. 14 Pocillos de 4 mL a diferentes concentraciones de etanol y glicerol sobre PBS. En las placas 1 y 2 las soluciones dejan de cristalizar a partir del 40% v/v de etanol. En la placa 3 todas las soluciones con glicerol cristalizan, incluido el pocillo de concentración más alta, del 80% de glicerol. Fuente: Propia.



Fig. 15 Pocillos de 4 mL a diferentes concentraciones de DMSO, glicerol y etanol sobre PBS. En las placas 1 y 2 las soluciones dejan de cristalizar a partir del 50% v/v de DMSO. En la placa 3, de glicerol sobre solución de Hanks (solución análoga al PBS), las soluciones dejan de cristalizar sólo cuando contienen un 100% v/v de glicerol. El control de etanol puro no ha cristalizado. Fuente: Propia.

En la Fig. 16 se puede ver cómo el glicerol tiene un porcentaje de cristalización similar al del DMSO. Éste deja de cristalizar por completo a partir del 50% de concentración, mientras que el glicerol necesita un 10% menos para detener la cristalización completamente. En contraste, el etanol tiene un porcentaje de cristalización demasiado alto en comparación, dado que sólo detiene la cristalización por completo cuando no se encuentra en absoluto diluido.

Curiosamente el DMSO tiene el punto de fusión a 19 °C cuando se encuentra sin diluir, pero mezclado con agua su punto de fusión baja sustancialmente, por este motivo muestra una función parabólica.

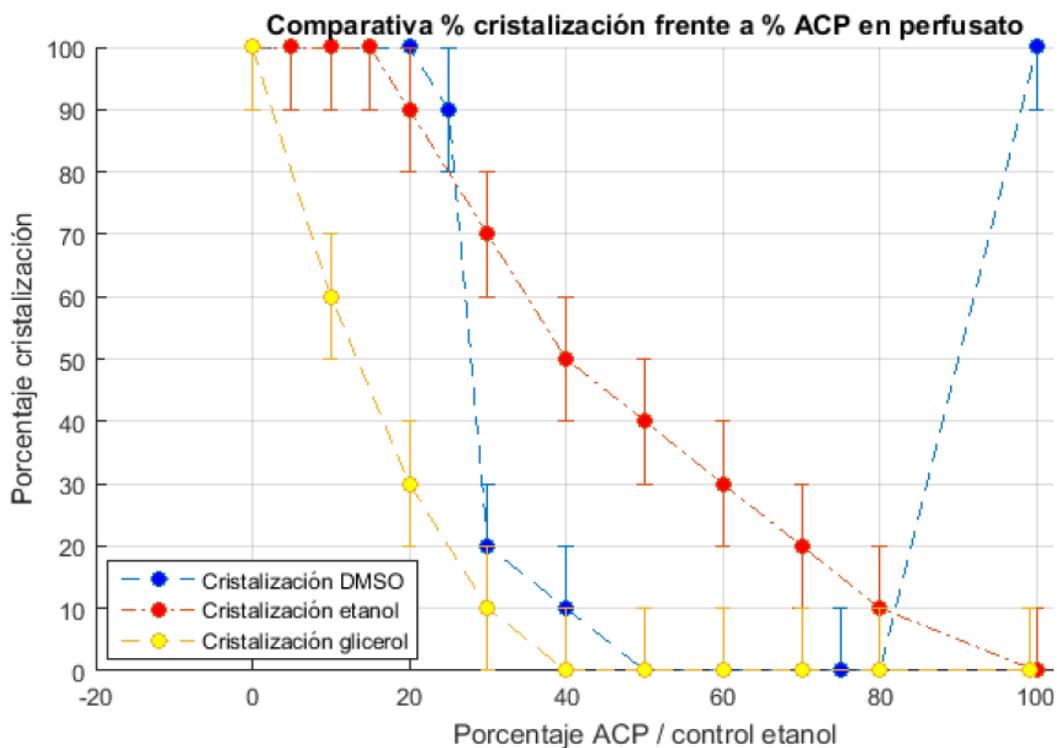


Fig. 16 Gráfico de líneas que representa el porcentaje de cristalización en función de la concentración de crioprotector. Fuente: Alcalá, (2019).

Por ello se ha descartado la utilización del etanol. Si se comparan las propiedades físicas del glicerol y del DMSO se ve una gran similitud entre ellas, pero con diferencias clave entre ambos. El glicerol tiene una mayor masa molecular, con una diferencia de 13.96 g/mol. La mayor masa molecular implica una menor penetrabilidad en los tejidos. Pero la propiedad discriminatoria definitiva radica en la alta viscosidad del glicerol, de 1.500 Pa·s frente a la del 0.002 Pa·s del DMSO (el agua pura tiene una viscosidad de 0.001 Pa·s).

Teniendo en cuenta que el crioprotector es impulsado por bombas peristálticas en un circuito hidráulico, la viscosidad tiene una gran influencia en la fuerza que tienen que ejercer las bombas para hacerlo avanzar.

En conclusión, de los crioprotectores que, a la práctica, se tienen disponibles se ha elegido el dimetilsulfóxido (DMSO).

Heparinización y sacrificio

Todos los procedimientos experimentales realizados con animales se han llevado a cabo después de su sacrificio, siendo la máxima prioridad evitar cualquier sufrimiento que pudiera derivarse de la investigación.

Se han ejecutado dos métodos de sacrificio de animales en función del procedimiento experimental al que iban a destinarse. Para la vitrificación equilibrada de tejido nervioso se utilizó TBE al 2% como eutanásico, mediante la inyección intraperitoneal, en el cuadrante inferior del abdomen, de 500 µL o 700 µL en ratones de mayor tamaño.

Para la vitrificación equilibrada de tejido cardíaco, y con el fin de evitar la parada cardiorrespiratoria que provoca el TBE después de haber dormido al animal, se ha utilizado la técnica de sacrificio por dislocación cervical, evitando así cualquier daño al corazón.

La heparinización, mínimo 45 minutos previos al sacrificio, se ha llevado a cabo de la misma manera que la eutanasia; se ha inyectado intraperitonealmente la heparina, en jeringuilla de insulina, una cantidad de entre 10 y 20 U.I en función del tamaño del ratón.

Es de vital importancia la comprobación de los reflejos del animal, mediante el pellizco de las extremidades con las pinzas, antes de empezar cualquier procedimiento.

La formación supervisión requerida para la realización de estos procedimientos ha sido proporcionada por el Responsable del Grupo de Investigación y Profesor Titular de la Universidad de Sevilla Ramón Risco Delgado.

Electrocardiograma (ECG)

Antes de adaptar el ECG a *Mus musculus* fue probado con personas para asegurar su correcto funcionamiento. Para ello se adhirieron los tres electrodos a la piel de diferentes personas, de modo que el electrodo R quedase bajo el pectoral derecho, el electrodo L bajo el izquierdo y el COM en el lateral derecho del abdomen. Los resultados de estas pruebas se encuentran en el Anexo Ia. Diseño y modificación de equipos e impresión 3D, en el apartado de Adaptación del ECG a *Mus musculus*.

Los datos de las señales eléctricas se recogieron en un archivo de texto con Python y procesaron y analizaron con Matlab⁷. En el Anexo Ia., apartado de adaptación de ECG a *Mus musculus* se explica detalladamente cómo se ha elaborado el ECG, extraídos, representados y analizados los datos.

In vivo en Mus musculus

“Obtener el ECG de un ratón consciente es complicado, siendo lo más común recurrir a técnicas invasivas o medir con la ayuda de anestesia” (Alcalá, 2019). Este segundo caso es el que se ha aplicado para registrar el ECG de *Mus Musculus*; se ha inyectado entre 70 μL y 400 μL , en función de la masa del ratón, de TBE al 2%.

Se colocaron los tres electrodos⁸ de la siguiente forma: el electrodo RL en la extremidad posterior izquierda; el electrodo LA a la extremidad anterior izquierda y el electrodo RA en la extremidad posterior derecha (Alcalá, 2019), tal y como se muestra en la Fig. 17.

Se espera que la frecuencia cardíaca se reduzca debido a la inoculación de anestesia para facilitar la manipulación de los animales. La frecuencia cardíaca normal sin anestesia de *Mus musculus* y con diferentes anestésicos, según Ho et al., (2011) en su artículo publicado “*Heart rate and electrocardiography monitoring in mice*”, “es de 580 ± 18 ppm sin anestesia según Uechi et al., (1998) y se reduce hasta 457 ± 17 ppm cuando se utiliza Isoflurano según Stypmann, (2007); hasta 411 ± 17 ppm cuando se utiliza Avertin, según Yan et al., (2007); hasta 377 ± 11 ppm cuando se utiliza Pentobarbital, según Yang et al., (1999) y hasta 159 ± 11.8 ppm cuando se utiliza Ketamina o Xilacina según Erhardt et al., (1984)” (p. 3).

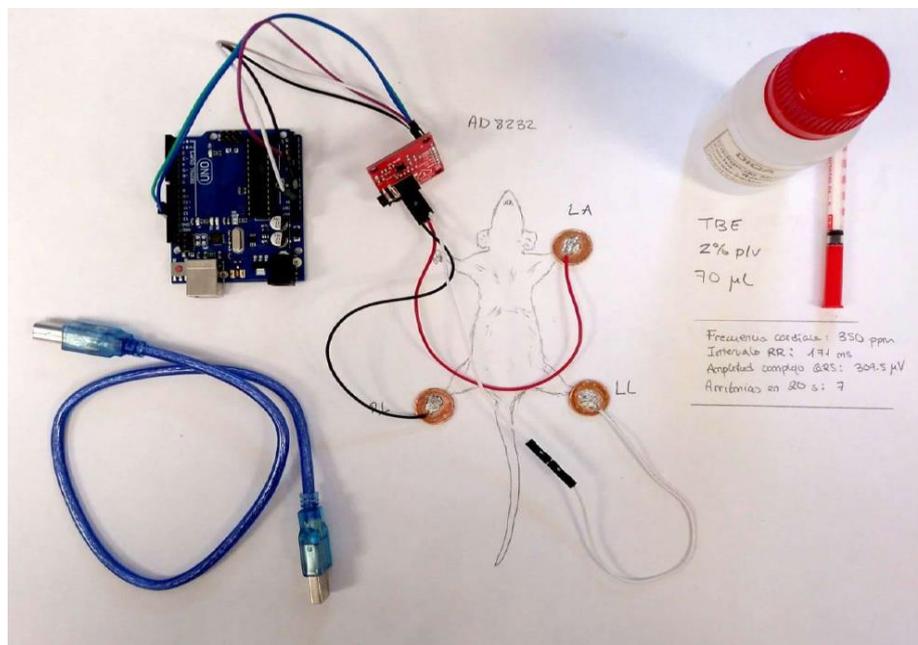


Fig. 17 Colocación de los electrodos para ECG de *Mus musculus* y material necesario para la anestesia y el registro de datos. Fuente: propia.

⁷ La adaptación del ECG a *Mus musculus* junto con la elaboración del circuito eléctrico y captación de datos fue elaborada por el ingeniero robótico Enrique Alcalá Guerrero, miembro del grupo.

⁸ La disposición de los electrodos toma la referencia de: Liu, Shupeng. (2017) *The effect of laser acupuncture on hypoxia tolerance and inflammation reaction in mice with optical fiber acupuncture needle intra body*. Publicado en Journal of Innovative Optical Health Sciences. Página 4. DOI: 10.1142/S1793545816500395.

Se hizo el ECG a tres ratones de cepas diferentes; un FVB hembra de cinco semanas y 26 gramos de peso, a la que se administraron 70 μL de TBE al 2%, y de la cual se recogieron 20 segundos de actividad cardíaca; un TS1CJE macho de once meses y 84 gramos de peso, al que se le administró una dosis de 400 μL de TBE al 2%, y del cual se recogieron 30 segundos de actividad eléctrica y un CD1 macho de ocho meses, al que se le administró una dosis de 100 μL , y del cual se recogieron 10 segundos de secuencia. El registro de datos se expone en el apartado de resultados de esta memoria.

En corazón de *Mus musculus ex vivo*

Para realizar el ECG en un corazón *ex vivo* se deben colocar los tres electrodos en tres sitios diferentes del corazón, mientras este se mantiene con el soporte vital del método Langendorff. En el método Langendorff el corazón se encuentra canulado a una aguja, desde la que se perfunde continuamente solución Tyrode's (siempre oxigenada), y sumergido en más Tyrode's contenido en un vaso de precipitados de 50 mL que, a la vez, está rodeado de agua a 39 °C.

El corazón al que se le realizó el ECG *ex vivo* pertenecía a un ratón macho de 2 meses de la cepa FVB.

Se colocaron, pues, los tres electrodos de forma que estableciesen contacto con aurículas y ventrículo izquierdo de forma simultánea sin perturbar el comportamiento natural del corazón. Cabe puntualizar que al ser los electrodos demasiado grandes para el corazón de *Mus musculus* se tuvieron que adaptar cambiando los extremos (monedas de 1 céntimo) por agujas metálicas para facilitar el contacto preciso con tres puntos diferentes del órgano (Fig. 18).

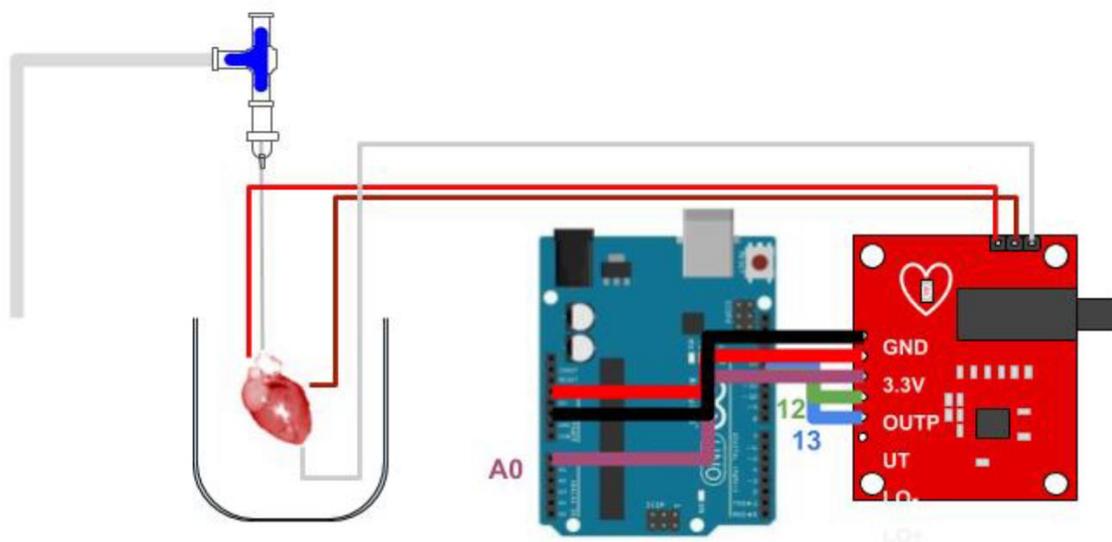


Fig. 18 Diagrama de toma de datos para ECG *ex vivo*. Fuente: propia.

Debido a la dificultad de obtener un registro de ECG debido a las condiciones de medición (corazón *ex vivo* latiendo mientras está sumergido y canulado) solo se consiguió obtener el registro de un corazón, que latía *ex vivo* vigorosamente.

Procedimientos quirúrgicos

La formación para la realización de los procedimientos quirúrgicos de apertura de tórax, extracción de cerebro y perfusión mediante pinchado en ventrículo izquierdo ha sido proporcionada por el personal del Instituto de Investigación Biomédica de Sevilla (IBIS).

Apertura del tórax

La apertura del tórax es un método que se ha utilizado en común en todos los experimentos de la misma manera.

Una vez cesado todo tipo de reflejos del ratón causa del sacrificio, ya sea por eutanasia o por dislocación cervical, se fijan las extremidades a una tabla de corcho artificial mediante agujas.

En primer lugar, se lava el tórax con etanol para evitar molestias con el pelaje y se realiza una incisión horizontal a la altura del esternón, sujetando y estirando la piel hacia arriba para facilitar el corte. A continuación, se introducen unas tijeras de punta roma para, con ayuda de unas pinzas de punta curva, separar cuidadosamente la piel longitudinalmente desde el corte. Sujetando el esternón con las pinzas, se corta la mucosa del diafragma con unas tijeras finas de y luego se continúa por las costillas siguiendo el contorno del tórax hasta el extremo superior del esternón, y se repite el procedimiento en el lado opuesto. Con estas incisiones se puede levantar el tórax, dejando accesible el corazón (Fig. 19-1, 6-2 y 6-3).

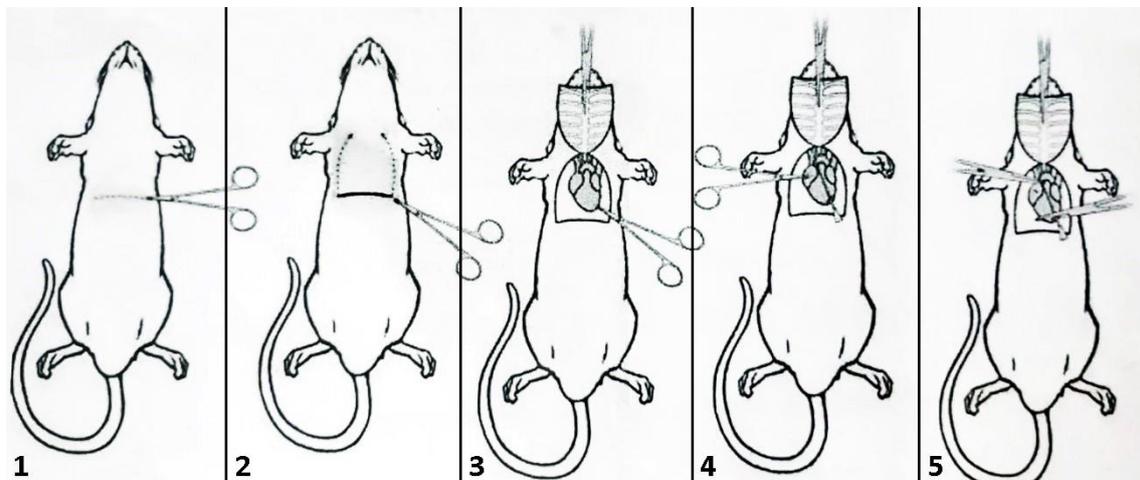


Fig. 19 Cirugía de tórax para acceder al corazón. 1/ Incisión horizontal a la altura del esternón. 2/ Corte de las costillas hasta la parte superior del esternón. 3/ Levantamiento de tórax. 4/ Introducción de aguja en ventrículo izquierdo. 5/ Incisión en aurícula derecha. Fuente: propia.

Canulación del corazón

La canulación aórtica del corazón es un procedimiento previo al método Langendorff y la vitrificación equilibrada de corazón.

Para la canulación del corazón por la aorta ascendente hace falta una serie de material quirúrgico (Fig. 11) además del necesario para la apertura del tórax. El método consiste en retirar el corazón del animal y aislarlo en una placa de Petri, que deberá estar sobre una cama de hielo y conteniendo aproximadamente 4 mL de Tyrode's oxigenado (Fig. 20), con el fin de

que el corazón se encuentre en todo momento frío y en contacto con una solución oxigenada y con nutrientes, aumentando de esta forma el umbral máximo de tiempo en canulación antes de que se produzca necrosis de células cardíacas.



Fig. 20 Placa de Petri en cama de hielo. Se coloca el corazón en la placa de Petri de menor diámetro para llevar a cabo la canulación. Fuente: propia.

Previamente se prepara el montaje de la jeringuilla acoplada a la aguja; consiste en llenar la jeringuilla con Tyrode's oxigenado y retirar todo el aire que pudiera haber en el circuito.

Inmediatamente después de la retirada del corazón del cuerpo del ratón, se deposita en la placa, que puede o no estar bajo una lupa para facilitar la visualización de microestructuras, se limpia de grasa y otros restos orgánicos para despejar la visión y se localiza la arteria aorta ascendente (Fig. 22).

Una vez localizada, se intenta sujetar el corazón con unas pinzas e introducir la punta de la aguja, recomendable de 21 G, en el interior de la arteria. Para sujetar esta canulación deben hacerse dos nudos con el hilo de sutura, aunque mayormente se ha empleado uno en el proyecto (Fig. 22).

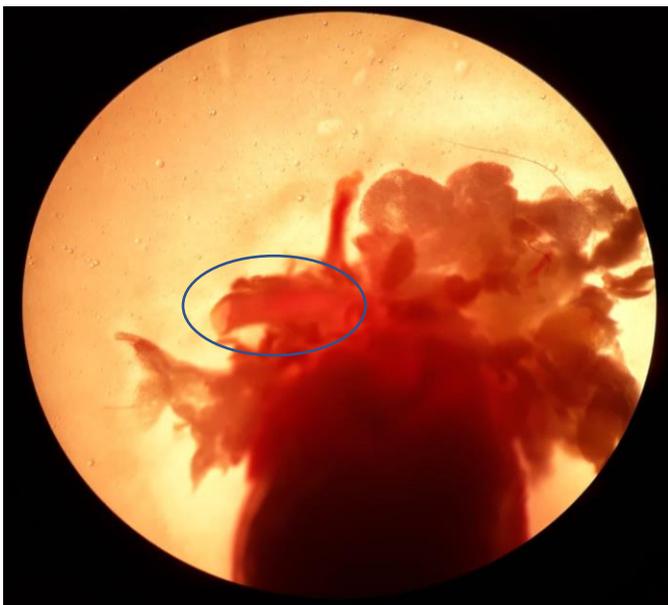


Fig. 22 Fotografía del corazón de Mus musculus a través de la lupa. Se ha señalado la posición de la arteria aorta con un círculo azul.



Fig. 22 Corazón de ratón canulado y acoplado a la aguja de perfusión. Fuente:

Es conveniente que la punta de la aguja sea roma y su superficie vertical sea rugosa, característica que se ha conseguido limando con una lija de papel. Esto facilita que el corazón quede sujeto a la aguja mediante los hilos de sutura y que la punta de la misma no perfora ningún tejido. Después de canular el corazón correctamente se debe presionar ligeramente el émbolo de la jeringuilla acoplada a la aguja para empezar a perfundir el corazón durante el tiempo entre el término de la canulación y el acople al montaje hidráulico para el método Langendorff.

Otra puntualización importante es tener en cuenta que una vez canulada la aorta no se podrá introducir ningún otro objeto o pieza en una posición anterior a la canulación en la aguja y, por tanto, hay que colocar en el montaje de la aguja, antes de la canulación, el tapón del criovial donde posteriormente se depositará el corazón para introducirlo en el BioCool (método vitrificación equilibrada de corazón). Esto se ha hecho cubriendo la parte superior del tapón con resina Epoxi y perforando con la aguja, de modo que quede totalmente aislado el interior del criovial del medio exterior (Fig. 23)

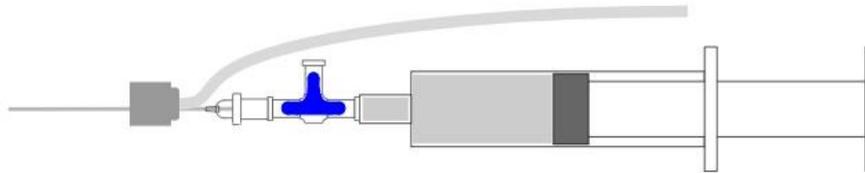


Fig. 23 Montaje de canulación del corazón de *Mus musculus*. Una jeringuilla de 20 mL cargada de solución salina fría; acoplada a una llave de paso o "Luer"; acoplada a la aguja hueca de perfusión, y con el tapón del criovial, con un tubo de drenaje, dispuesto en el agua mediante un agujero que atraviesa la resina Epoxi depositada en la parte superior del tapón. Fuente: Alcalá, 2019..

El proceso de canulación idealmente no debe superar los tres minutos, aunque se han dado caso de funcionalidad cardíaca con tiempos superiores a los siete minutos.

Acople al montaje para perfusión de tejido nervioso central y exanguinación

Para realizar la perfusión de tejido nervioso central no es posible la canulación de un vaso sanguíneo que irrigue el cerebro tal y como se ha hecho con tejido cardíaco, ya que los vasos serían demasiado pequeños y la cirugía demasiado compleja. Existen algunos requisitos, pues, para que la vitrificación equilibrada tenga éxito. Al no poderse perfundir el órgano aislado la perfusión debe hacerse desde el corazón y, además, la cabeza del ratón debe permanecer sumergida en el líquido del depósito del BioCool para asegurar que sigue la curva de temperatura deseada. Se construyó un montaje, mediante la impresión 3D de una pieza cuidadosamente diseñada (en detalle en el Anexo Ia. Diseño de piezas 3D) que permitiese hacer la perfusión del tejido nervioso central sin extraerlo del cuerpo. Manteniendo la integridad del cuerpo, el montaje (Fig. 24) para perfundir al ratón se introduce en el depósito del BioCool para seguir con el método de vitrificación mientras se sigue perfundiendo solución salina.

Para realizar una perfusión desde el corazón se pincha la aguja en el ventrículo izquierdo (Fig. 19-4 y 6-5). Esta técnica se basa en utilizar la circulación mayor para llegar a irrigar el cerebro con medio Tyrode's y/o PBS. El método exige una exanguinación previa del animal con tal de evitar daños en el sistema vascular por aumento de volumen de líquido total.

La exanguinación se consigue, pues, haciendo un corte en la aurícula derecha del corazón, lugar en el que confluye toda la sangre desoxigenada que vuelve a la circulación menor (pulmones) para volverse a oxigenar, y perfundiendo Tyrode's hasta que el líquido expulsado por la aurícula derecha sea transparente. Un indicio de buena exanguinación es el progresivo color pálido del hígado y pulmones. Para la exanguinación se necesita perfundir solución salina oxigenada desde una jeringuilla que se acopla al tubo que canaliza hasta la salida de la aguja (Fig. 24). Al presionar el émbolo se purga el tubo y, si la aguja se clava en este momento en el ventrículo izquierdo (habiendo hecho el corte previo en la aurícula derecha), comienza la exanguinación.

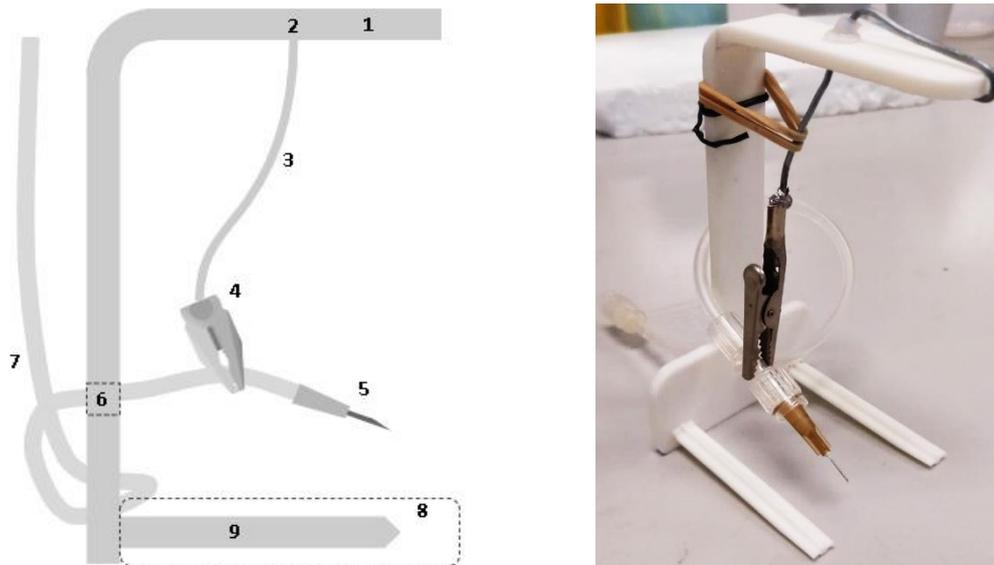


Fig. 24 Esquema de la vista lateral del montaje para la perfusión de tejido nervioso central desde el ventrículo izquierdo (izquierda). Fotografía del montaje (derecha). 1/ Asa de sujeción del montaje. 2/ Agujero con sello de silicona para incrementar la fricción de movimiento vertical del alambre que sujeta la pinza. 3/ Alambre maleable de alta resistencia. 4/ Pinza de cocodrilo para sujeción de la aguja, soldada al alambre maleable. 5/ Aguja de perfusión que va pinchada al ventrículo izquierdo del corazón. 6/ Agujero por donde pasa el tubo de perfusión. 7/ Tubo de perfusión con un extremo de aguja hueca y el otro acoplable a sistema hidráulico. 8/ Tabla de corcho donde descansa el ratón. 9/ Dientes de soporte de la tabla de corcho. La exanguinación se realiza manualmente conectando una jeringa en el extremo del tubo acoplable a sistema hidráulico, evitando cuidadosamente la entrada de aire. Para la vitrificación en equilibrio, el mismo extremo del tubo se conecta al sistema hidráulico de perfusión y toda la pieza se introduce en el depósito del BioCool. Fuente: propia.

Extracción del cerebro post vitrificación

Después del procedimiento de vitrificación de tejido nervioso central es necesaria la extracción del cerebro para su posterior almacenamiento y análisis. La extracción debe ser en este momento y no antes ya que la perfusión del encéfalo (tanto para la exanguinación como para la vitrificación) se realiza perfundiendo desde el ventrículo izquierdo del corazón, y no canulando un vaso sanguíneo como se hacía para la vitrificación de corazón.

Para ello se secciona la cabeza del ratón con unas tijeras de punta fina, se lava el pelaje con etanol para evitar molestias y se realiza una incisión sagital para retirar la piel de la cabeza. Luego se corta la parte del cráneo pegada al tronco encéfalo con las tijeras y se retira todo el cráneo con unas pinzas de punta curva para no dañar el cerebro (Fig. 26). Con una espátula, se extrae el cerebro desde el bulbo olfatorio cuidadosamente (Fig. 25) y se introduce en un criovial dispuesto a ser almacenado.



Fig. 25 Encéfalo extraído del cráneo de *Mus musculus* según el procedimiento descrito. Fuente: propia.

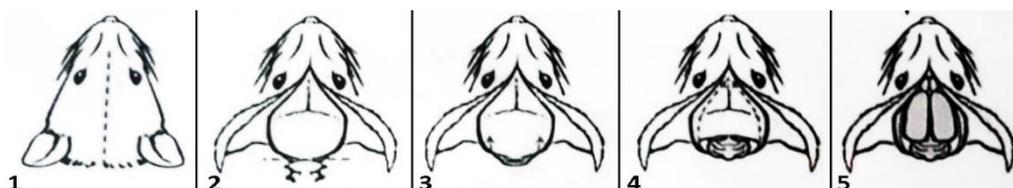


Fig. 26 Extracción del cerebro. 1/ Incisión sagital. 2/ Retirada de la piel de la cabeza. 3/ Retirada de las meninges. 4/ Corte de la parte del cráneo pegada al tronco encéfalo. 5/ Retirada del cráneo cortado con pinzas de punta curva. Fuente: propia.

Soporte vital del corazón ex vivo: método Langendorff

El método Langendorff o perfusión retrógrada de corazón consiste en darle soporte vital a un órgano perfundiendo una solución nutritiva salina, oxigenada con 5% CO₂ y 95% O₂ (Tyrode's) y a pH de 7.4 en unas condiciones ideales de temperatura. (Para más información sobre el montaje y los aparatos del método Langendorff consultar el Anexo Ia., *Diseño de sistemas hidráulicos*). Su nombre se debe al autor que ideó el método (Langendorff) o, cuando se habla de “perfusión retrógrada”, a su funcionamiento (la perfusión se realiza por una vía de salida, no de entrada, con tal de dirigir el líquido de perfusión a las arterias coronarias).

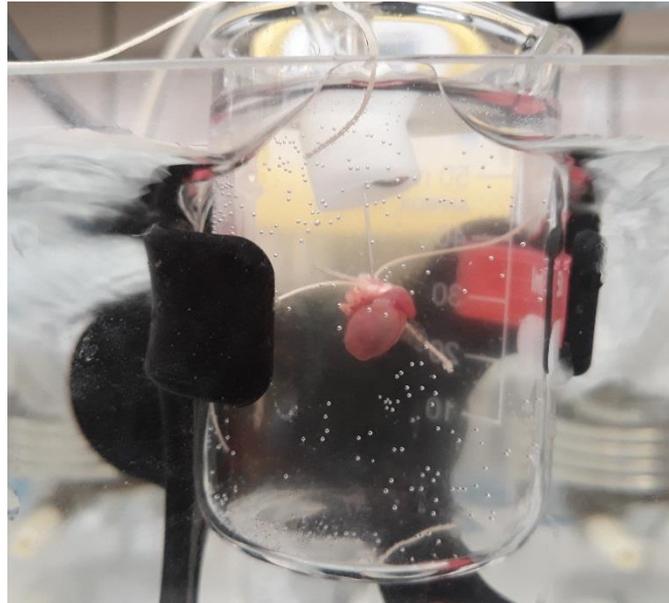


Fig. 27 Corazón de *Mus musculus* durante la perfusión retrógrada, suspendido en medio Tyrode's oxigenado. El vaso de precipitados se encuentra en contacto con el flujo de agua caliente a 39 °C. Fuente: propia.

Este método se ha usado para la incubación de corazón *ex vivo* de *Mus musculus*. El montaje de la jeringuilla con el corazón canulado se sostiene en vertical mediante un soporte con una nuez de sujeción, justo sobre un vaso de precipitados (de 50 mL) que contiene Tyrode's a una temperatura próxima a los 39 °C. El montaje se desplaza, entonces, en vertical hasta que el corazón queda sumergido en el líquido. Se acopla el tubo del sistema hidráulico (conectado al perfusor) a la llave que va acoplada a la aguja de perfusión, eliminando las burbujas de aire, y se acciona la bomba de jeringa a un caudal calculado de 2.5 mL/min. En este momento, si todo ha ido correctamente, el corazón debería mostrar latidos auriculares y ventriculares, así como un hilo de sangre que precipita a medida que se llena de solución salina. Todo el proceso de acoplar al soporte, baño y sistema hidráulico no debe superar el minuto de tiempo.

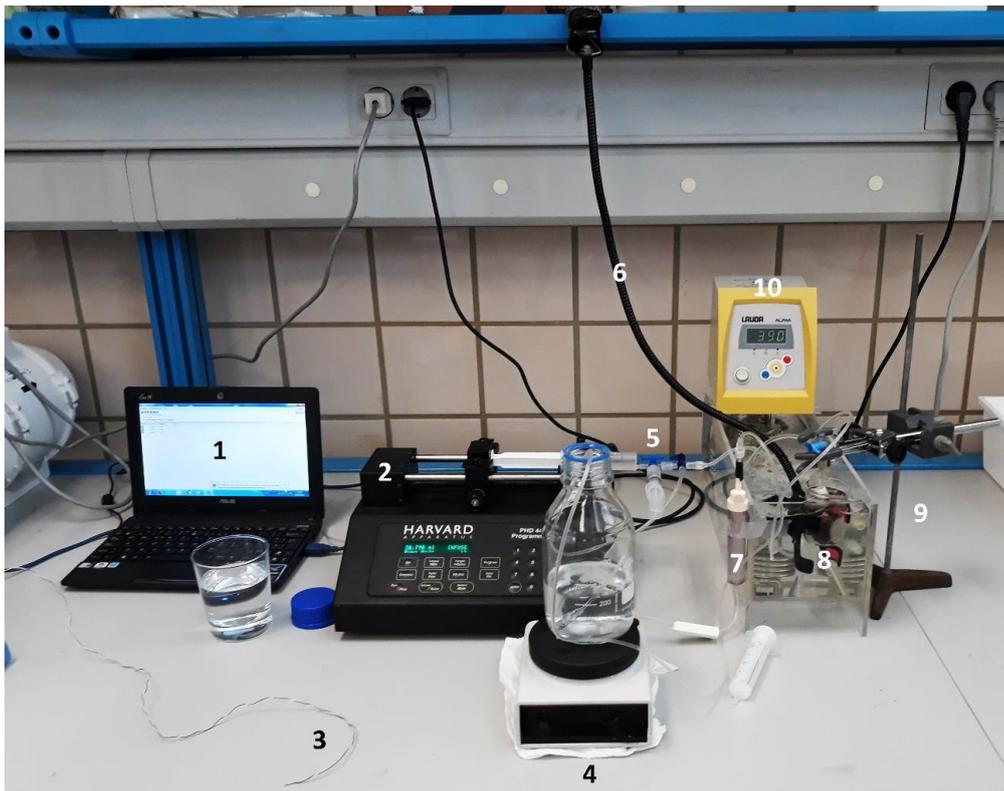


Fig. 28 Montaje del método Langendorff. 1/ Ordenador para el registro de temperaturas. 2/ Bomba Harvard de jeringa. 3/ Termopar. 4/ Agitador magnético con solución salina oxigenada encima. 5/ Jeringa de perfusión. 6/ Brazo de sujeción del vaso de precipitados. 7/ Filtro de burbujas y sistema hidráulico. 8/ Vaso de precipitados con corazón canulado suspendido. 9/ Brazo con nuez de sujeción. 10/ Aparato de control de temperatura mediante resistencia eléctrica, con cubeta llena de agua (baño Langendorff). Fuente: propia.

Vitrificación en equilibrio

La vitrificación equilibrada consiste en introducir el órgano objeto de estudio (corazón canulado en caso de vitrificación cardíaca, o el montaje de la pieza 3D con el cuerpo entero en caso de vitrificación encefálica (Fig. 24)) en el depósito del BioCool, mientras se le perfunde continuamente solución salina oxigenada (PBS en este caso) mezclada con crioprotector (DMSO en este caso), para bajarle la temperatura paulatinamente a medida que se le va sustituyendo esta solución de soporte vital por una más alta concentración de crioprotector. Esta técnica requiere que la concentración de crioprotector sea compatible con la velocidad de enfriamiento y la velocidad de recalentamiento, con el objetivo de evitar los fenómenos de nucleación y crecimiento de cristales de hielo en ambas fases de la criopreservación.

El perfil de curvas de concentración y temperatura están basadas en el trabajo del físico Gregory M. Fahy y compañía sobre vitrificación de riñones de conejo (*Physical and biological aspects of renal vitrification*, 2015). La programación digital de la curva de concentración fue elaborada por el estudiante ingeniero Álvaro Pérez Aguilar. El montaje del sistema hidráulico, readaptación de la curva y puesta a punto de los equipos fue llevada a cabo por el grupo formado por los estudiantes ingenieros José Manuel Ortiz Serrano y Enrique Alcalá Guerrero y la estudiante de biología Beatriz Albiol Tortosa. Gracias a este equipo multidisciplinar de personas se pudo llevar a cabo el siguiente perfil de concentración en función del tiempo mediante la regulación de la velocidad de cada bomba peristáltica, de forma que, durante la hora

programada, las velocidades de las bombas transmitieran la cantidad adecuada de PBS y DMSO desde los depósitos para que las concentraciones a la salida del sistema fuesen muy próximas a las de la curva de concentración de Gregory M. Fahy (Fig. 29).

Para comprobar que la curva de concentración experimental del método de vitrificación equilibrada coincidiese con la curva de concentración teórica, se midieron, mediante el refractómetro, los % Brix de la solución de salida de la perfusión cada 5 minutos durante toda la hora que duraba el programa. Esta comprobación se hizo varias veces y se fue perfeccionando el diseño del sistema hidráulico hasta que las mediciones quedaron constantes en las siguientes comprobaciones y en concordancia con las concentraciones de la curva teórica. La conversión de los % Brix medidos a molaridad de DMSO se hizo a partir de la siguiente ecuación de la recta:

$$y = 0,1258x - 0,1178$$

Donde “y” es la molaridad (mol/L) y “x” los % Brix. El cálculo de las equivalencias de unidades y la recta de ajuste se encuentran detallados en el Anexo III. Cálculos, “*Equivalencia de %Brix a molar*”.

La curva de temperatura fue programada en el BioCool manualmente en cada experimento.

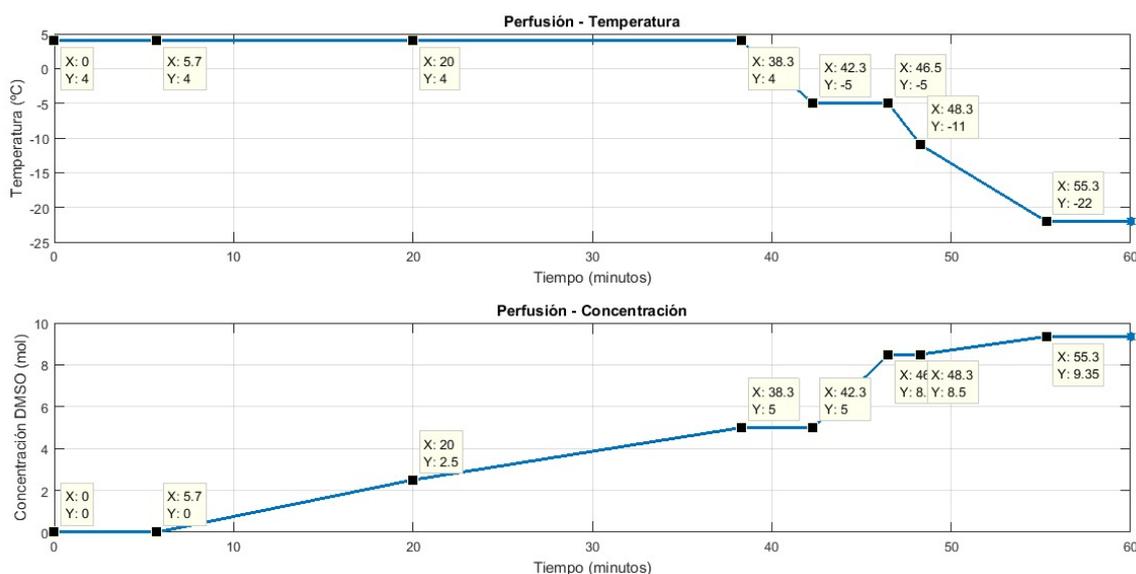


Fig. 29 Perfil de curva de temperatura (°C) en función del tiempo (arriba). Perfil de curva de concentración (mol/L) en función del tiempo (debajo). El método de comprobación de la curva de concentración experimental se detalla en el Anexo III. Cálculos, “*Comprobación de la curva de concentración experimental*”. Fuente: propia.

Es de vital importancia que el agitador esté agitando el contenido líquido del BioCool en todo momento; de lo contrario el líquido quedará estático y el agua y etanol estratificarán por diferencia de densidades, quedando el agua en el fondo del depósito y solidificando. Es también importante colocar los termopares tipo K en el interior del depósito, y el tipo T en el interior del criovial que contiene el corazón (a través del tubo de drenaje) o en la boca del ratón si el procedimiento consiste en vitrificación de cerebro. El Picolog recibe las señales de los termopares y los representa en forma de datos en el ordenador, que guarda un registro de la temperatura por segundo del depósito y del sistema biológico en cuestión durante todo el procedimiento, lo que nos permite hacer un seguimiento de la misma.

Cuando el órgano está preparado para entrar en el BioCool, se conecta previamente el montaje donde esté soportado al sistema de perfusión de las bombas peristálticas a través de la conexión en forma de T (Fig. 30) donde se mezclan ambas sustancias (crioprotector y solución salina), y este sistema se introduce en el depósito del BioCool. Inmediatamente debe iniciarse el programa de la curva de concentración desde el ordenador para que la bomba peristáltica de PBS empiece a moverse. Simultáneamente se debe programar la primera curva de temperatura en función del tiempo en el BioCool, y repetir la última operación cada vez que deba haber una nueva rampa siguiendo el modelo de temperaturas de la Fig. 29.



Fig. 30 Conexión en forma de T del sistema hidráulico de vitrificación. Las sustancias a velocidades determinadas que avanzan por los tubos paralelos se mezclan al llegar al punto de unión. Fuente: propia.

Antes de comenzar el procedimiento se debe programar al BioCool para que llegue a una temperatura inicial de 4 °C, que aproximadamente tardará entre 20 y 30 minutos. Una vez el BioCool llegue a esta temperatura, se puede iniciar el experimento de vitrificación equilibrada; se programa una rampa inicial que mantenga una temperatura de 4° C durante 38 minutos. Pasados los 38 minutos se programa la siguiente rampa que va desde una temperatura inicial de 4 °C hasta -5 °C a una velocidad de 2.33 °C/min, y se define un tiempo de sostén de 4.2 minutos. El BioCool avisa mediante alarma cuando llega a la temperatura inicial y a la temperatura final. La siguiente rampa a programar, al acabar el programa anterior, es la de bajar la temperatura desde -5 °C hasta -22 °C, a 1.93 °C/min, y mantener en -22 °C durante 4.7 minutos.



Fig. 31 Espacio donde se lleva a cabo el procedimiento de vitrificación en equilibrio (izquierda) y método Langendorff (derecha). 1/ Ordenador desde donde se controla el movimiento de las bombas peristálticas. 2/ Placa conectada al ordenador y bombas para traducir la señal del ordenador. 3/ Depósitos de DMSO y PBS. 4/ Bombas peristálticas. 5/ Tubos del sistema hidráulico. 6/ BioCool. 7/ Agitador. 8/ Picolog y termopares. 9/ Ventilador. 10/ Voltímetro. Fuente: propia.

Al finalizar todo el proceso se extrae la muestra del depósito y se desacopla de todos los sistemas para proceder con su rápido almacenamiento.

Los pasos que se realizan en este punto varían en función del análisis que se va a realizar a la muestra y de la naturaleza de la misma.

Si el tratamiento programado es la evaluación de la viabilidad del órgano o su posterior recalentamiento, se almacena en un criovial que contenga una concentración semejante a la que teóricamente debería haber retenido el órgano durante todo el proceso, sin quitar la aguja de perfusión, y en una cámara fría a entre $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Si el tratamiento programado consiste en el análisis de penetrabilidad de DMSO en tejido nervioso o cardíaco mediante Tomografía Axial Computerizada (TAC), las muestras se almacenan rodeadas de aire en un criovial depositado en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 32).

Si el órgano sometido a vitrificación es cerebro, entonces hay que extraer dicho órgano del cráneo para poder almacenarlo en criovial, ya sea en cámara fría o en nitrógeno líquido. Este proceso, desde su salida del BioCool hasta su entrada en almacenamiento en frío, debe durar como máximo un minuto y medio para prevenir cristalización por recalentamiento inintencionado.

Tomografía Axial Computerizada (TAC)

El análisis por Tomografía Axial Computerizada (TAC) se ha realizado con el objetivo de detectar y cuantificar la concentración de crioprotector retenida en los tejidos de los órganos sometidos al procedimiento de vitrificación, aprovechando la propiedad de la alta absorción de rayos X que tienen los átomos de azufre de la molécula de DMSO.

El equipo de TAC ha sido proporcionado por el Centro Nacional de Aceleradores (CNA) y la formación y ayuda requeridas para la realización, interpretación y reconstrucción de las imágenes por el Dr. en física Marcin Balcerzyk y al Técnico de Laboratorio de Imagen Ángel Parrado.



Fig. 32 Almacenamiento de muestras en nitrógeno líquido (a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) contenido en cántara de seguridad especial. Fuente: propia.

Para hacer el TAC se transportaron las muestras desde el Laboratorio de la Universidad de Sevilla hasta el CNA. Una vez allí se descongelaron previamente y se situaron los crioviales en racks de espuma de baja densidad, en el interior de huecos cilíndricos perforados con soldador previamente. Estos racks de espuma tienen una densidad próxima a la del aire, de modo que este método de sostén de las muestras no interfiere en absoluto en las imágenes realizadas por el TAC.

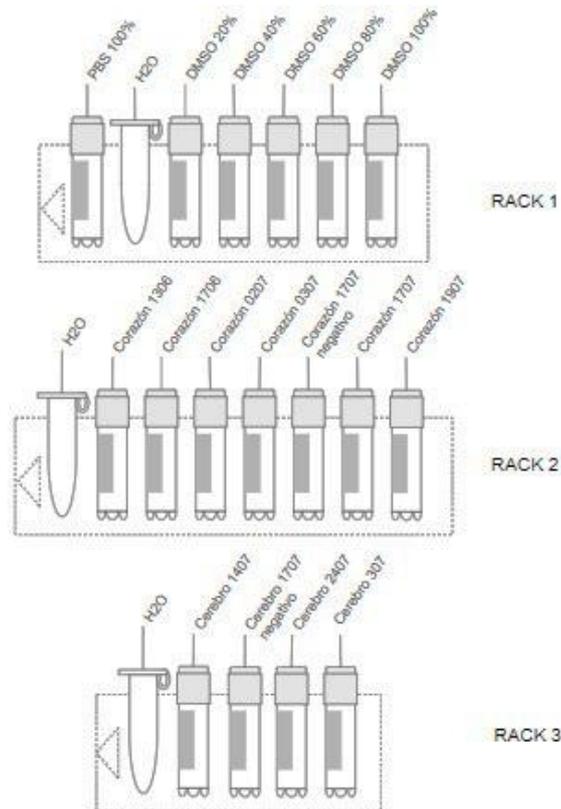


Fig. 33 Disposición de las muestras en los racks de análisis por Tomografía Axial Computerizada (TAC). Fuente: propia.

Se prepararon tres racks; uno de calibración crioviales que contenían, respectivamente, agua pura, PBS y diferentes concentraciones de DMSO sobre PBS (20, 40, 60, 80 y 100%).

En el segundo rack se dispusieron los corazones junto con una muestra de agua pura y en el tercero los crioviales con los cerebros junto con un criovial de agua pura. Se hicieron dos análisis de TAC en días y muestras diferentes (Fig. 33).

Los racks se colocaron en la parte superior de la bandeja que el TAC va introduciendo lentamente mientras hace las proyecciones. Por medidas de seguridad, es necesario llevar un dosímetro de radiación y abandonar la sala del TAC mientras este realiza la emisión de rayos X.

Los datos transmitidos a los ordenadores sobre las imágenes incluyen datos crudos (unidades RAW) sobre la densidad absoluta de cada zona proyectada. Mediante el programa PMOD se reconstruyeron, procesaron e interpretaron las imágenes resultantes del análisis.

RESULTADOS

Electrocardiograma (ECG)

In vivo en *Mus musculus*

Después de la limpieza de señales e interferencias de los datos (detallado en el Anexo la., adaptación del ECG a *Mus musculus*) y su análisis se obtuvieron los siguientes resultados representados gráficamente.

El ECG de ratón cepa FVB; hembra de 5 semanas. Se ofrecen los datos correspondientes a una secuencia de 5 segundos de tiempo donde la señal pudo captarse con mejor calidad:

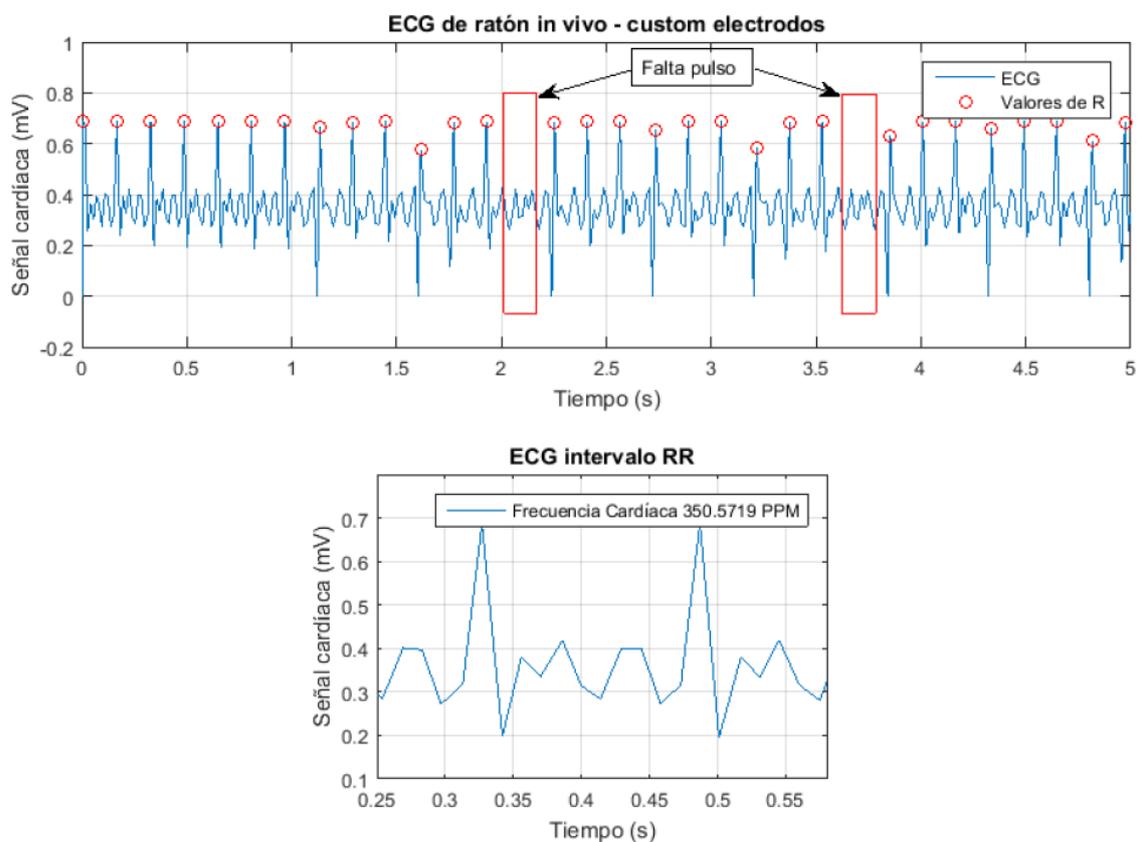


Fig. 34 Secuencia del ECG de *Mus musculus* cepa FVB; señal cardíaca (mV) en función del tiempo (s). Se han marcado dos zonas de mal contacto de los electrodos (arriba). Secuencia de un periodo del ECG de *Mus musculus* con los mismos ejes (abajo). Fuente: Alcalá, 2019.

Se ha registrado una frecuencia cardíaca de 350.57 ppm, con un intervalo entre ondas R de 0.17 segundos y una magnitud de la onda R de 0.31 mV. Las lecturas (Fig. 34) no son constantes debido a la manipulación del aparato para adaptarlo a *Mus musculus*, por lo que no pueden considerarse datos exactos, pero sí orientativos para la evaluación global de la salud del ratón y de ECG control, teniendo en cuenta la certeza de que están sanos. Entre los segundos 2 y 4 se han detectado dos picos R faltantes, probablemente debido a un fallo en el contacto de los electrodos adaptados.

Aun así, se puede apreciar sin demasiada dificultad el complejo QRS, lo que ha permitido el cálculo de la frecuencia cardíaca y amplitud de la onda.

“En lo que al espectro refiere, observamos componentes de importancia a frecuencias donde antes no estaban presentes. Bien puede ser por la mayor frecuencia de los pulsos de la señal ECG, o por el propio ruido de los nuevos electrodos – aunque es una frecuencia bastante baja para ser ruido (30 Hz es muy baja frecuencia)” (Alcalá, 2019).

El ECG de ratón de la cepa TS1CJE; macho de 11 meses con síndrome de Down. Se exponen los 10 segundos de tiempo donde la señal pudo captarse de calidad:

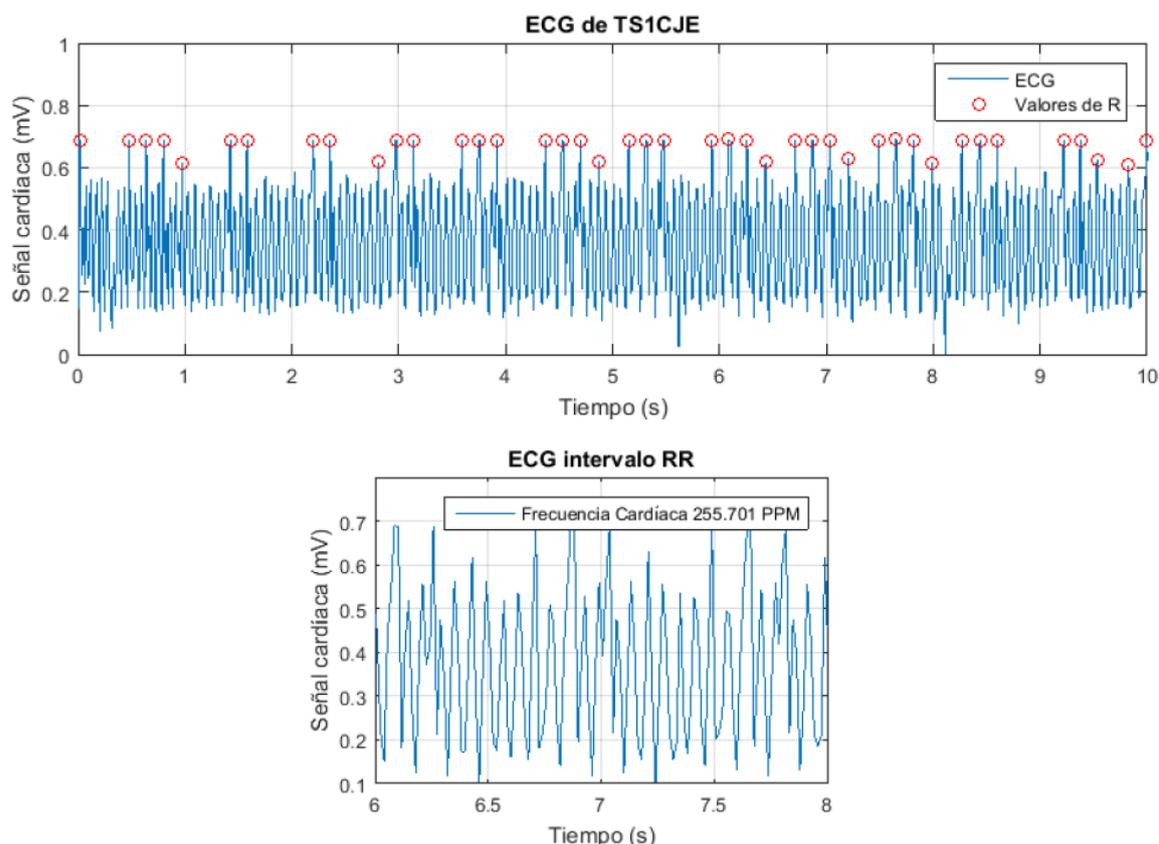


Fig. 35 Secuencia del ECG de *Mus musculus* cepa TS1CJE; señal cardíaca (mV) en función del tiempo (s). Se han marcado dos zonas de mal contacto de los electrodos (arriba). Secuencia de un periodo del ECG de *Mus musculus* con los mismos ejes (abajo). Fuente: Alcalá, 2019.

Aunque las conexiones fueron las mismas empleadas para el ratón FVB, se registró un alto ruido en los electrodos cuando se hizo el ECG de TS1CJE. “No obstante, la altura de los picos del complejo QRS fue suficiente para diferenciarlos del resto de la señal” (Alcalá, 2019)

Se ha registrado una frecuencia cardíaca media de 255.70 ppm y una máxima de 405.40. Se puede observar en la Fig. 35 que el pulso es arritmico. Estas arritmias pueden estar causadas por el ruido de los electrodos y tiempo de muestreo insuficiente o bien por razones fisiopatológicas inherentes al individuo.

ECG de ratón cepa CD1; macho de 8 meses. Se exponen los datos de los 10 segundos de ECG con mejor calidad de señal.

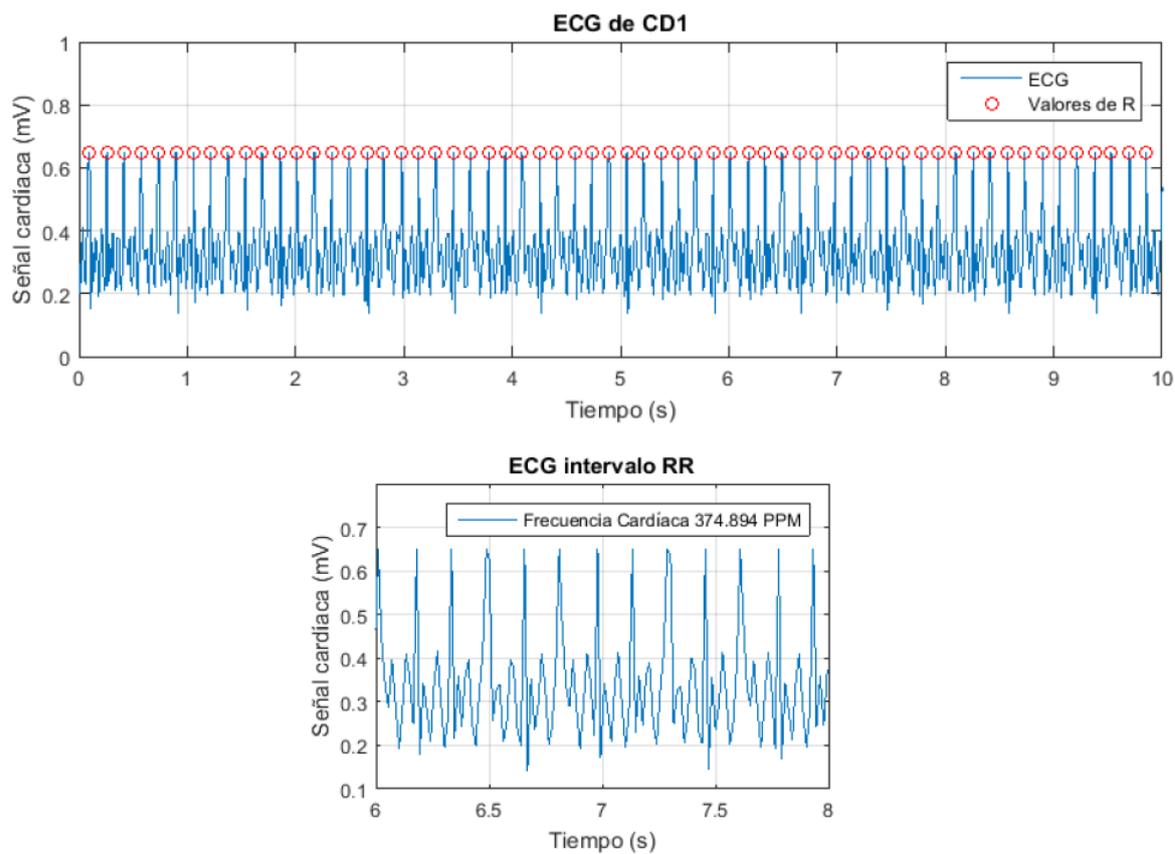


Fig. 36 Secuencia del ECG de *Mus musculus cepa CD1*; señal cardíaca (mV) en función del tiempo (s). Se han marcado dos zonas de mal contacto de los electrodos (arriba). Secuencia de un periodo del ECG de *Mus musculus* con los mismos ejes (abajo). Fuente: Alcalá, 2019.

En el CD1 se registró una frecuencia cardíaca de 374.89 ppm, con un intervalo entre ondas R de 0.16 segundos y una magnitud del pico R de 0.31 mV.

Este ECG parece salir más limpio en ruido y más estable que los dos anteriores y se ha tomado como referencia para el ECG del corazón de ratón *ex vivo*.

En corazón de *Mus musculus ex vivo*

Se tomó una secuencia completa de 20 segundos, de la cual se extrajo un intervalo de 6 segundos donde el registro de la señal eléctrica era más clara y con menor cantidad de ruido y artefactos. “Aun así, se apreciaba una componente de baja frecuencia propia de los aparatos para el experimento de Langendorff (Alcalá, 2019). Alcalá diseñó un filtro para trabajar la señal hasta obtener los siguientes resultados.

Como se ha comentado en metodología, los resultados del ECG dan una orientación

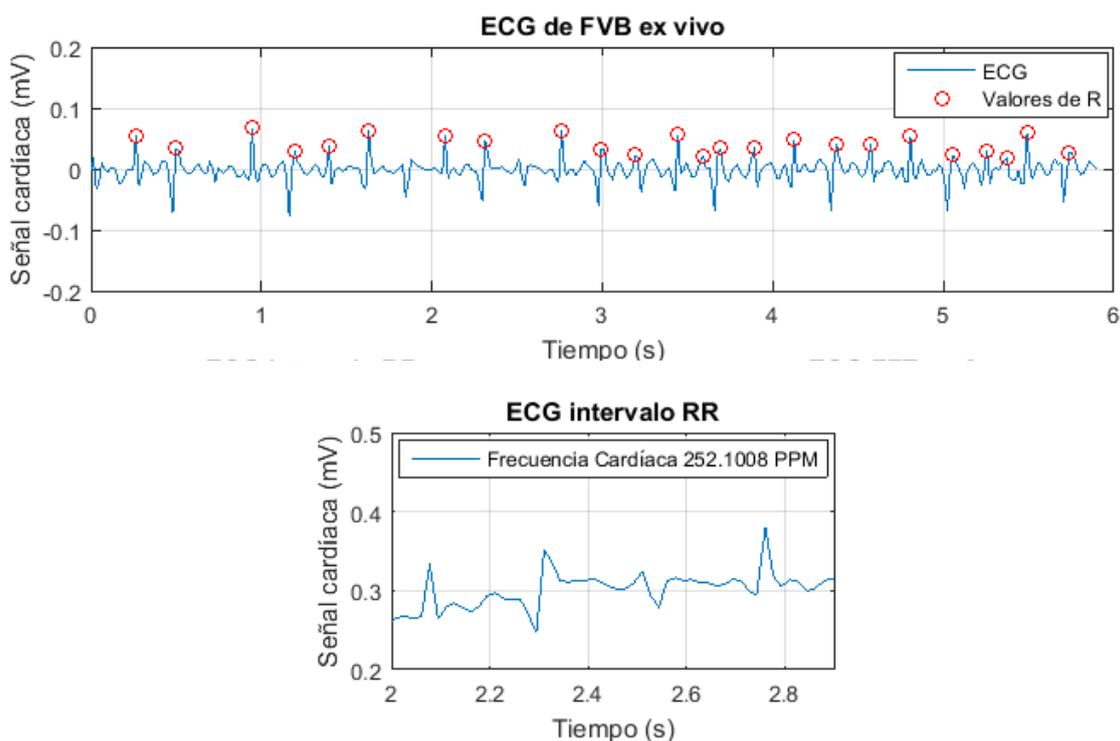


Fig. 37 Secuencia del ECG del corazón ex vivo de un FVB de 2 meses (arriba) e intervalo entre las ondas R ampliado (abajo). Fuente: Alcalá, 2019.

sobre el estado general del corazón y no datos exactos. Hay que tener en cuenta las condiciones en las que se han realizado todos los ECG, especialmente el del corazón *ex vivo*, que no solo está interferida tanto por el ruido como por la precisión de la mano humana, sino que el corazón está, además, afectado por una retroperfusión por la aorta. De este modo el ECG da una clara pista de la correcta funcionalidad cardíaca de dicho órgano *ex vivo*.

Soporte vital del corazón ex vivo: método Langendorff

Los resultados de este método se basan en enumerar los éxitos ligados a una buena cirugía de corazón y a una buena perfusión posterior. El éxito del método Langendorff se mide, pues, en si el corazón canulado, suspendido en solución salina Tyrode's y continuamente perfundido, late.

Respecto al total de corazones sometidos a cirugía y posterior perfusión, han latido el 54.54% de ellos, y de estos el 67% lo ha hecho cuando los tiempos de canulación han sido inferiores o iguales a 6 minutos. Los latidos de mayor calidad, es decir, latidos tanto auriculares como ventriculares, se han dado en el 100% de los casos con tiempos de canulación inferiores a

los 4 minutos y 11 segundos. Solo ha habido un caso en que no ha habido latido de ningún tipo siendo el tiempo de canulación de 4 minutos y 30 segundos, probablemente debido a un fallo humano en la cirugía.

Tabla 3. Tipo de latido en función del tiempo de canulación del corazón de *Mus musculus*. Fuente: propia.

Fecha	Tiempo (min)	Latido
25/04/19	60	Ninguno
02/05/19	60	Ninguno
14/05/19	60	Ninguno
15/05/19	60	Ninguno
17/05/19	50	Ninguno
20/05/19	30	Ninguno
21/05/19	7' 30"	Ninguno
21/05/19	11' 07"	Auricular
04/06/19	8' 40"	Auricular
05/06/19	13' 59"	Auricular
07/06/19	10'	Ninguno
12/06/19	18'	Ninguno
13/06/19	7'	Ninguno
14/06/19	13' 57"	Ninguno
17/06/19	8'	Auricular
02/07/19	5' 15"	Auricular
03/07/19	1' 55"	Auricular
05/07/19	5' 45"	Auricular
05/07/19	4' 30"	Ninguno
17/07/19 (ctrl.)	2' 30"	Auricular y ventricular
17/07/19 (2)	6'	Auricular
19/07/19	3' 55"	Auricular y ventricular
05/08/19	2' 50"	Auricular y ventricular
06/08/19	4' 10"	Auricular y ventricular
Total:	24	12

Vitrificación en equilibrio

Durante la puesta a punto de los equipos se verificó que realmente la concentración de crioprotector al final del sistema de perfusión fuese la programada en Labview. Esto se hizo iniciando el programa y tomando medidas cada 5 minutos mediante el refractómetro. Posteriormente se hizo el cambio de unidades de % Brix a molaridad de DMSO (los cálculos sobre la equivalencia de % Brix a molaridad de DMSO se describen en el Anexo III. Cálculos, *Conversión % Brix – Molaridad*).

Las curvas más representativa del global de experimentos se han graficado y comparado con las respectivas curvas teóricas. En las dos primeras gráficas de la Fig. 38 se observa el registro de temperaturas tomadas por cada uno de los termopares durante los experimentos de vitrificación cardíaca y encefálica. Los termopares tipo K se situaban en el depósito del BioCool durante todo el proceso, y el termopar tipo T se situaba cerca del órgano a vitrificar (en el criovial

en caso de corazón y en la tráquea del ratón en caso del encéfalo). La tercera gráfica representa la concentración experimental de DMSO medida a la salida del sistema de perfusión a lo largo del tiempo en comparación con la curva teórica de referencia.

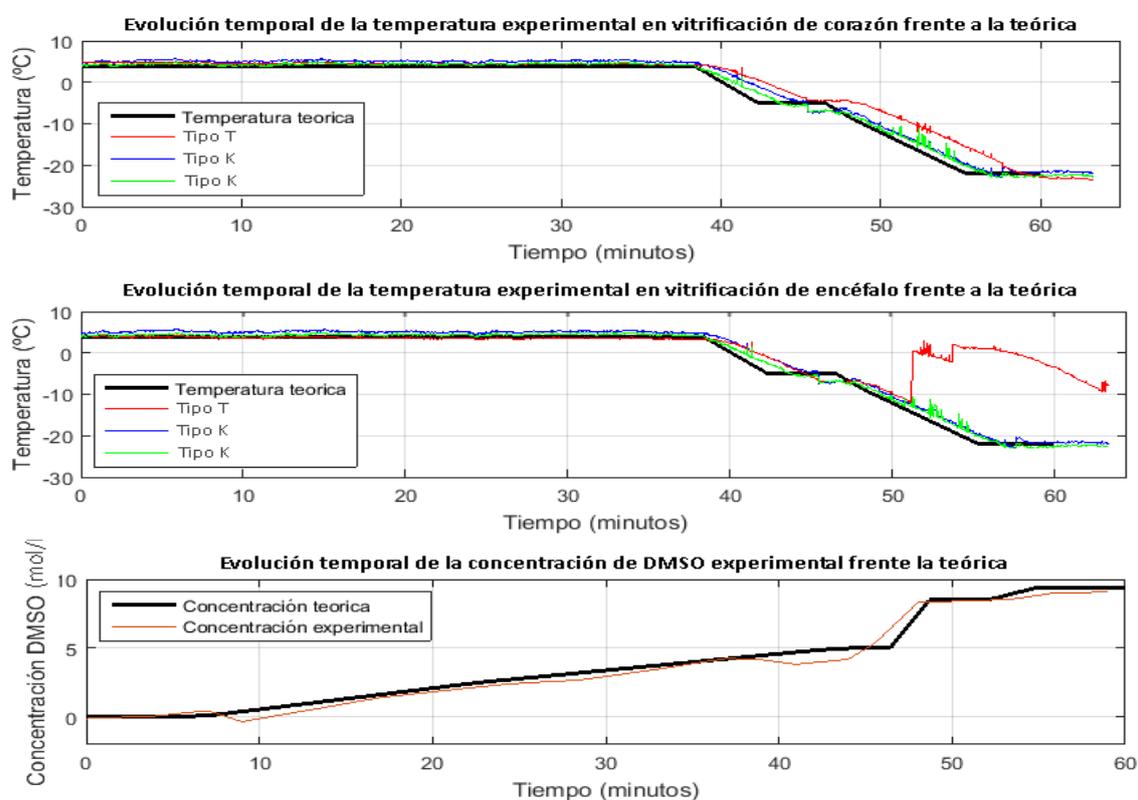


Fig. 38 Registro experimental de temperatura en función del tiempo del método de vitrificación cardíaca, y comparación con la curva teórica (primera gráfica) y del método de vitrificación encefálica (segunda gráfica). Registro experimental de la concentración de DMSO a la salida del perfusor, durante la puesta a punto de los equipos, en comparación con la curva teórica de referencia (tercera gráfica). Fuente: Alcalá, 2019.

Retención de ACP en los tejidos (TAC)

Se hicieron dos sesiones de Tomografía Axial Computerizada para determinar la concentración de DMSO retenida en los tejidos cardíaco y nervioso, respectivamente los días 31 de julio y 7 de agosto. En total se analizaron 15 muestras biológicas repartidas entre las dos sesiones y se le dio a cada una un código de reconocimiento definido por la fecha en la cual se vitrificaron. En la Tabla 4 y Tabla 5 se resume el conjunto de resultados.

Tabla 4. Resumen de resultados del TAC de todas las muestras de corazón evaluadas, por orden cronológico de vitrificación. Fuente: propia.

Porcentaje de DMSO retenido en corazón			
Sample name	Density (HU)	[DMSO] (%)	Cristalización
Corazon_1306	17,91	0	Sí
Corazon_1706	-18,81	0	Sí
Corazon_0207	268,24	21,01	Sí
Corazon_0307	155,47	10,21	Sí
Corazon_1707_Control	119,86	0	Sí

Corazon_17072	576,01	50,48	No
Corazon_1907	896,96	81,21	No
Corazon_0508	815,02	73,36	No
Corazon_0608	525,44	45,64	No

Tabla 5. Resumen de resultados del TAC de todas las muestras de encéfalo evaluadas, por orden cronológico de vitrificación. Fuente: propia.

Porcentaje de DMSO retenido en encéfalo			
Sample name	Density (HU)	[DMSO] (%)	Cristalización
Cerebro_1407	424,37	35,96	No
Cerebro_1707_Control	140,22	0	Sí
Cerebro_2407	231,46	17,49	Sí
Cerebro_3007	226,98	17,06	No
Cerebro_0608	204,21	14,88	Sí
Cerebro_06082	404,63	34,07	No

Los 9 corazones analizados dieron una concentración de DMSO de entre el 0% en los dos primeros hasta un 81% en el del día 19 de julio. En el cerebro la concentración de DMSO máxima registrada fue de casi un 36%. El hecho de que las muestras biológicas de control negativo den más densidad que, por ejemplo, las dos primeras muestras, se debe a que los controles no recibieron tratamiento de perfusión ni de exanguinación, por lo que su densidad resultante es mayor a la de cualquier órgano que no contenga sangre en su sistema vascular.

La concentración de DMSO se calculó a partir de las ecuaciones de la recta de calibración del TAC, donde se introdujeron 7 crioviales con diferentes concentraciones de DMSO previamente preparadas en el laboratorio, uno de agua mili-Q y otro de matriz PBS. Se cogió el PBS como blanco, puesto que las demás muestras están sobre matriz de PBS y no sobre agua.

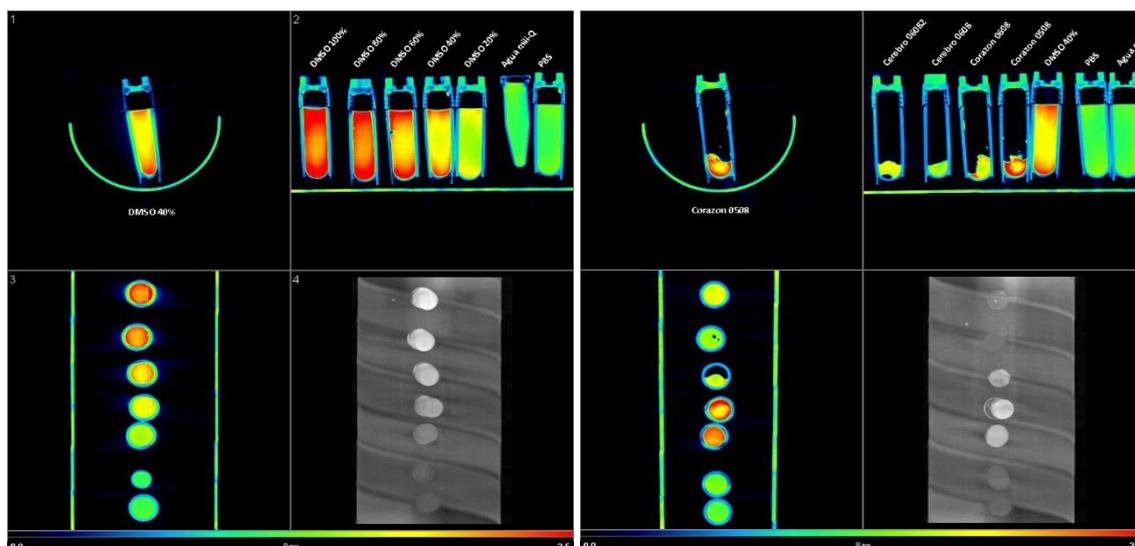


Fig. 39 Imágenes de las diferencias de contraste respecto a diferentes concentraciones de DMSO. La imagen de la izquierda representa las diferencias de densidad causadas por las diferentes concentraciones de DMSO conocidas (rack de calibración). La imagen de la derecha ilustra los resultados de la segunda sesión de TAC; dos corazones y dos cerebros de los días 5 y 6 de agosto (en la Tabla 4 y Tabla 5 se exponen los detalles de cada muestra). Fuente: Balcerzyk y Parrado, (2019).

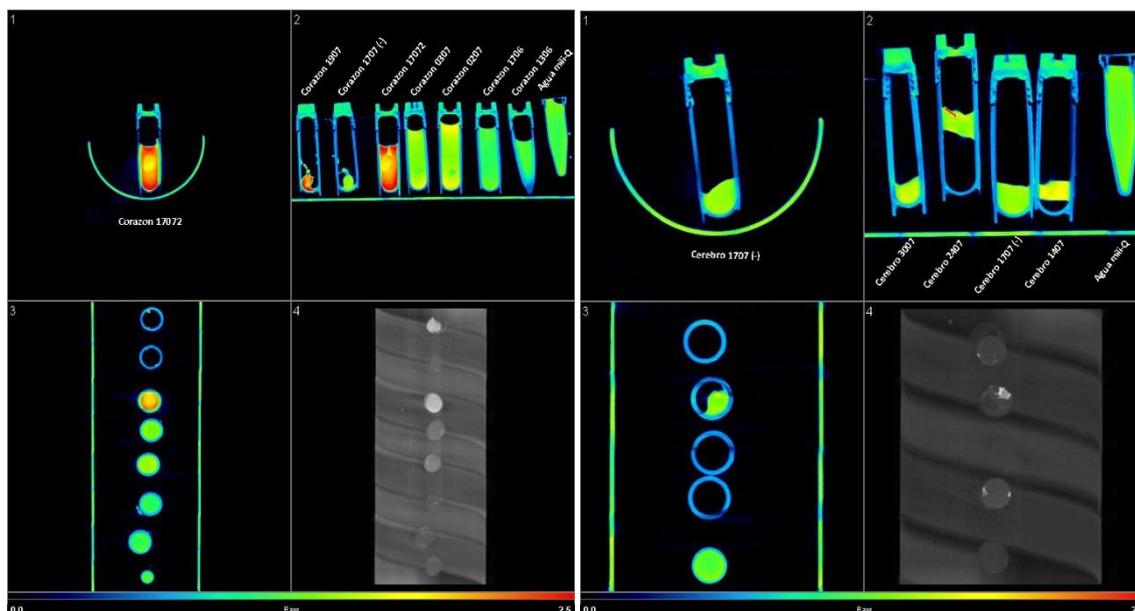


Fig. 40 Imágenes de las diferencias de contraste de las muestras de la primera sesión de TAC. A la izquierda el rack de corazones, y a la derecha el rack de encéfalos. (En la Tabla 2 y Tabla 3 se exponen los detalles de cada muestra). Fuente: Balcerzyk y Parrado, (2019).

La ecuación de la recta de calibración y el coeficiente de determinación (R^2) fueron los siguientes:

$$Y = 1044.4x + 48.823$$

$$R^2 = 0.989$$

La descripción del procedimiento para la elaboración de la recta de calibración y el posterior cálculo de las concentraciones de DMSO se encuentra en el Anexo III. Cálculos; *Calibración del TAC*.

DISCUSIÓN

En un análisis exploratorio inicial de los resultados obtenidos se encontraron varias relaciones entre las variables. Durante todo el proceso, el resultado de cada método empleado condiciona al siguiente método. En cuando al procedimiento de vitrificación de corazón, una buena heparinización condiciona el resultado de la canulación del corazón, ya que la formación de coágulos fruto de una heparinización incorrecta puede taponar la arteria aorta e impedir la entrada de la aguja de canulación a través de esta. Incluso si, a pesar de ello, se logra una correcta canulación, los coágulos obstaculizarán la circulación de la solución de soporte vital (Tyrode's) provocando que no todas las zonas del corazón se irrigen. Esto provoca, en consecuencia, que ciertas regiones cardíacas necrosen, lo que afectará negativamente al mantenimiento del corazón en condiciones saludables y también a la carga del crioprotector que, si se distribuye de manera incorrecta, no podrá impedir el crecimiento de cristales de hielo durante la fase de enfriamiento y, por lo tanto, todo el experimento fracasará. Esta es, pues, una de las relaciones entre variables más importantes de todo el procedimiento, un punto crítico.

Otra relación evidente entre variables es la de la probabilidad y tipo de latido que se obtiene en función del tiempo de canulación. Cuanto más tarda el técnico en canular la aorta ascendente en el corazón *ex vivo*, más tiempo permanecerá este en hipoxia e hipoglucemia, por tanto, por encima de ciertos umbrales de tiempo de canulación el corazón sufrirá daños irreversibles, causando latidos parciales o nulos, y la muerte. La presencia y tipo de latido en el corazón, mientras se perfunde con Tyrode's en el baño Langendorff, explica el grado de éxito en los métodos anteriores, tanto en la heparinización como en el tiempo de canulación. Por tanto, el tiempo de canulación del corazón es también un punto crítico. De los resultados obtenidos descritos en la Tabla 3 se ha representado un diagrama de cajas (Fig. 41) en el que se puede observar esta relación; cuanto mayor tiempo de canulación, mayor probabilidad de que no haya ningún tipo de latido.

Diagrama de cajas del tipo de latido en función del tiempo de canulación

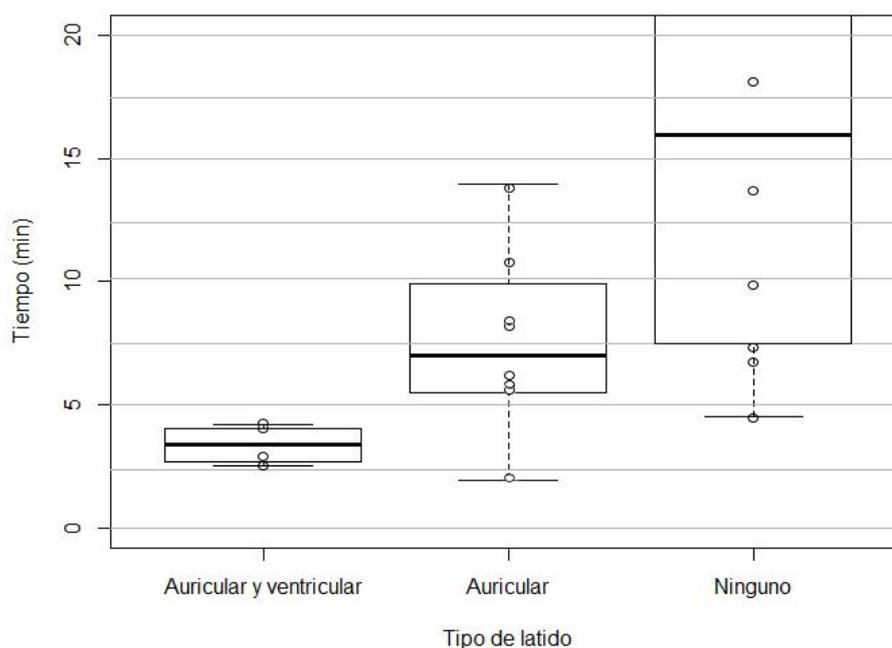


Fig. 41 Diagrama de cajas múltiple del tipo de latido del corazón (eje x) en función del tiempo de canulación en minutos (eje y). Fuente: propia.

Parece ser que, en general, el umbral de tiempo en el que la probabilidad de latido disminuye drásticamente son los 10 minutos, pero a partir de los 7 minutos y medio el corazón está demasiado dañado. Se ha recortado parcialmente el diagrama en la tercera caja por motivo de formato, considerando que ya no se podían extraer datos útiles de este grupo más allá de los 20 minutos.

La región, pues, donde hay un latido vigoroso tanto auricular como ventricular es la de tiempos de canulación inferiores a 5 minutos e incluso menos, claramente.

Los puntos dispares que se encuentran dentro del rango, pero lejos del primer y tercer cuartil, probablemente se dieron por un fallo humano en un método anterior; heparinización incorrecta, daños mecánicos al corazón o canulación de otro vaso sanguíneo diferente de la arteria aorta.

Mediante la observación del diagrama de dispersión de los datos de la Tabla 4 se sospechó de una posible relación de causalidad entre las variables “porcentaje de concentración de DMSO retenida en el tejido cardíaco” y “tiempo de canulación”, pareciendo que fuesen inversamente proporcionales. Se discriminaron tres puntos considerados no significativos (pero igualmente incluidos en la Tabla 4); el punto del corazón canulado en 1 minuto y 55 segundos, con código Cor_0307, que no tuvo latido alguno por las posibles causas que se han comentado en el anterior párrafo, el Cor_1707 que era un control negativo el cual se canuló y se sometió a la perfusión de soporte vital por método Langendorff, pero no se cargó de crioprotector, solamente se almacenó en nitrógeno líquido para ver la diferencia de contraste mediante el análisis de TAC, y el Cor_17072, juzgado como outlier debido a que se encuentra fuera de las distancias de Cook en el análisis de residuos del modelo de regresión lineal (explicado más adelante). Además, tampoco es una muestra representativa puesto que al finalizar la vitrificación se le igualó manualmente la concentración dentro del criovial a la concentración teórica que debía tener, y se almacenó en cámara fría a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$, por lo que la concentración y distribución de crioprotector en el tejido cardíaco se habría efectuado por difusión durante este tiempo, y no durante la perfusión, hecho que la convierte en una variable sin relación con el tiempo de canulación.

Para considerar significativa la correlación entre estas dos variables se aplicó el test estadístico de correlación de Pearson entre la variable explicativa (tiempo de canulación) y la variable explicada (concentración de DMSO), después de aplicar una transformación logarítmica en base 10 sobre la variable respuesta, ya que el test estadístico de normalidad de Shapiro-Wilks daba no significativo. Después de aplicar esta transformación el test daba una distribución normal significativa de la variable respuesta, con un p-value de 0.044. El test de correlación de Pearson dio una relación lineal significativa entre las dos variables, con una $t_s = |6.78| > 2.78$ y un p-value de 0.002. El coeficiente de correlación de Pearson dio un 96.0% de potencia de relación.

Confirmando linealidad entre las dos variables se evaluó si existía, además, regresión lineal para poder predecir la concentración de DMSO que retiene el tejido cardíaco en función de un tiempo de canulación x dentro del rango de datos medidos (y por tanto si depende de la viabilidad del tejido), dando un resultado positivo, ya que la pendiente (se comprobó con un test ANOVA) e intercept eran diferentes de 0. El coeficiente de determinación ajustado (r^2) describió que el 90.0% de la variación de la concentración de DMSO está explicada por el tiempo de canulación con pendiente negativa.

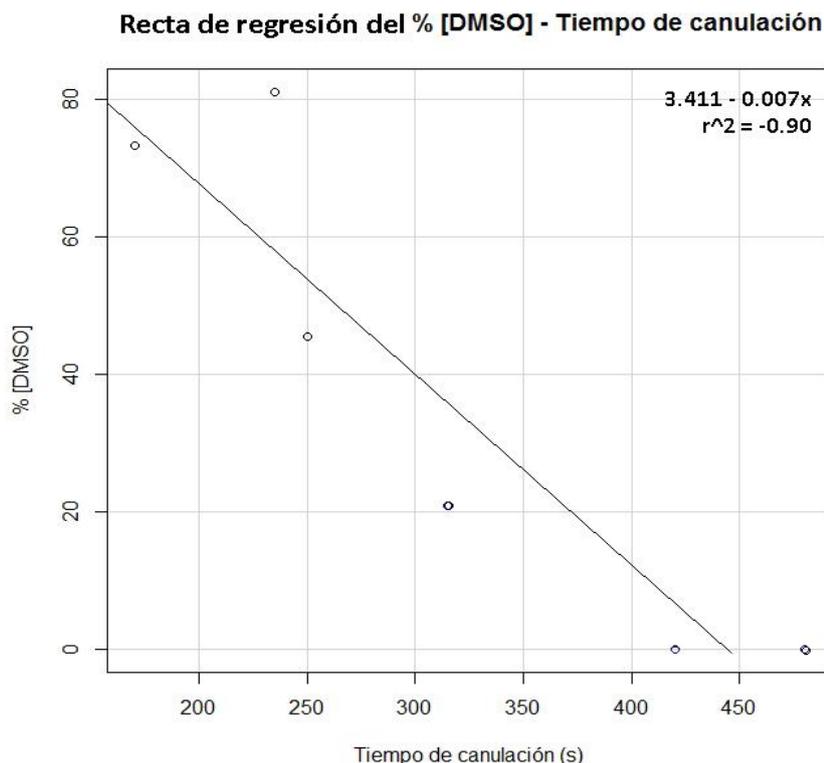


Fig. 42 Recta de regresión entre las variables % [DMSO] y tiempo de canulación, con ecuación de la recta y coeficiente de determinación ajustado. La variabilidad de la [DMSO] es explicada en un 90% por la variación del tiempo de canulación. La recta corresponde al conjunto de datos que excluye Cor_17072. Fuente: propia.

La ecuación de la recta de regresión es: $y = 3.411 - 0.007x$ y su representación se encuentra en la Fig. 42.

El análisis de residuos del modelo da normalidad de residuos, homogeneidad de varianzas y ausencia de más outliers.

Este análisis apunta, pues, a que hay una relación de causalidad entre la concentración de DMSO que el tejido cardíaco es capaz de retener con cuanto más viable es el tejido en el momento en el que entra al BioCool dispuesto para vitrificación, ya que el tiempo de canulación y la viabilidad del tejido también es una relación de causalidad. Esta relación también nos proporciona otro dato, aunque aproximado, importante; cuanto mayor es la absorción de DMSO y más uniforme su distribución, menor es la cantidad de cristales de hielo que se han formado durante la vitrificación y, aunque no haya sido posible monitorear el proceso ni analizar los cristales de hielo formados, esta información da una pista sobre la correcta aplicación de la vitrificación equilibrada. Sin embargo, seis datos no son suficientes como para atribuir significancia al estudio estadístico. Para afirmar tal hipótesis se deberían hacer más análisis y hacer estudios estadísticos con más datos.

No se pudo evaluar la viabilidad del tejido nervioso ni previamente, ni durante la vitrificación, por lo que no fue posible hacer un análisis de absorción de DMSO en función de la viabilidad del tejido durante la vitrificación. Se observa una absorción máxima conseguida del 36% de DMSO en tejido nervioso. Esta baja absorción máxima en comparación con el tejido

cardíaco puede deberse a la baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica para el intercambio capilar, ya que estos son continuos en el SNC y no fenestrados o sinusoidales.

El pico de temperatura que detectó el termopar en todas las vitrificaciones de encéfalo aproximadamente en el mismo momento en cada vitrificación (se puede observar este pico en la segunda gráfica de la Fig. 38, pasado el minuto 50) podría deberse a esta baja absorción máxima de crioprotector, insuficiente para impedir la formación de cristales a ciertas temperaturas. La cristalización del medio intracelular e intersticial del encéfalo habría provocado un aumento de presión en el sistema que terminara por romper los tejidos, con el consecuente derrame de líquido que pudo haber fluido hasta la cavidad bucofaríngea, lugar donde estaba colocado el termopar que monitoreaba la temperatura. De esta forma se puede explicar el pico constante en todos los ensayos; cuando la temperatura del interior del cráneo, diferente a la de la cavidad bucofaríngea debido al aislamiento físico, llega a poco menos de los 0 °C y cristaliza rompiendo células y tejidos.

Para hacer una evaluación más profunda sobre la absorción del DMSO por parte del tejido nervioso habría que hacer otros análisis, como el de sodio/potasio previo y posterior a la vitrificación, o un electroencefalograma. Lo realmente útil, aunque difícil debido a los recursos limitados, sería una microscopía óptica o electrónica de las rodajas de cerebro post vitrificación, a una temperatura máxima de -22 °C, para ver el daño tisular, el nivel de cristalización y el daño a la barrera hematoencefálica. El análisis de Array de Microelectrodos (MEA) también sería extremadamente útil para ver la actividad eléctrica de numerosas regiones cerebrales simultáneamente. Esto permitiría evaluar el porcentaje del encéfalo no dañado por la vitrificación.

En las imágenes de TAC (Fig. 39 y Fig. 40) se observa que en los órganos mejor perfundidos hay una distribución homogénea del DMSO, lo que significaría dos cosas dependiendo del caso: que el DMSO se haya distribuido a través del sistema vascular y, por tanto, este esté intacto o que, en caso de que se haya igualado la concentración de DMSO en el cráneo con la concentración teórica que le correspondía al corazón estudiado, este se haya movido por difusión durante todo el tiempo de almacenamiento hasta tener una distribución homogénea, como pudiera ser el caso del Cor_17072. Las imágenes donde se encuentra un órgano rodeado de aire y DMSO en el exterior como producto exudado del mismo (Fig. 39 y Fig. 40) se deben a que el tejido se agrieta al pasar de una temperatura de -196 °C a 30 °C de golpe, y estas grietas y daños tisulares pueden provocar el escape del líquido intracelular e intersticial del tejido. Aun así, el resultado sigue siendo representativo, ya que este hecho impide ver si la distribución ha sido homogénea, pero no la cuantificación de DMSO que el tejido ha absorbido durante la vitrificación.

En la Fig. 43 se ha representado un esquema de las relaciones entre variables del método para una mayor aclaración.

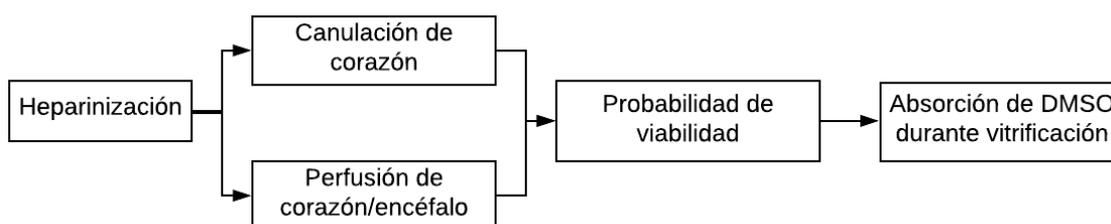


Fig. 43 Esquema de relación entre variables y su causalidad. Fuente: propia.

CONCLUSIONES

Se concluye, pues, que hay una serie de relaciones entre las variables que se han considerado en los apartados anteriores y que una de ellas no era esperada. Se trata de la relación lineal entre la concentración de DMSO retenida en tejido cardíaco y el tiempo de canulación del corazón, asumiendo que el tiempo de canulación está directamente relacionado con la viabilidad del tejido, hecho observado directamente durante la perfusión retrógrada del corazón. Esta relación no era la esperada porque el DMSO es un crioprotector penetrante y, según todas las fuentes consultadas, se difunde de manera pasiva a través de la membrana. La relación entre la viabilidad del tejido y su capacidad para absorber crioprotector solo puede explicarse si se asume que el DMSO atraviesa la membrana plasmática mediante una difusión facilitada o un transporte activo mediado por ATP. Se necesitan, pues, más análisis y pruebas con respecto a esto, para confirmar o rechazar esta hipótesis.

En cuanto a la vitrificación de encéfalo, el método no es el apropiado. En primer lugar, para controlar bien la temperatura del encéfalo, el ratón debe estar totalmente sumergido en el líquido del depósito del BioCool, pero no debería estar en contacto directo con la mezcla de agua y etanol, sino que debería estar cubierto con una bolsa u otro mecanismo que lo aisle físicamente, pero permita la perfecta transferencia de energía. Esto se intentó colocando una bolsa que aislara al ratón, pero al manipular la aguja pinchada en el ventrículo izquierda se movía, provocando daños e incluso la separación total, imposibilitando la perfusión. Es necesario, entonces, diseñar un método más sofisticado y práctico para vitrificación de encéfalo de ratón, así como un método para valorar la viabilidad del mismo antes y después de la vitrificación. Lo ideal sería un método lo menos invasivo posible, como un encefalograma. Hay que estudiar mejor, también, la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Aún y considerando estos problemas, la absorción de DMSO por parte del tejido nervioso fue satisfactoria, considerando que no se perfundía directamente el órgano, sino que se hacía desde el corazón; aunque insuficiente para evitar la formación de cristales.

En realidad, el proyecto empezó con gran ambición y el objetivo era el de llegar al recalentamiento de órganos y posterior análisis de viabilidad de los tejidos, junto con la observación de cristales mediante microscopía óptica e incluso electrónica. No se necesita decir que ha sido totalmente imposible llegar a este punto porque no se consideró, en ningún momento, que el proyecto fuese a requerir tanta complejidad, tanto referido al método, diseño, puesta a punto, adaptaciones y resolución de problemas, como referido a la gestión de permisos, suministro de material y formación requerida.

Como proyecto futuro se propone perfeccionar la fase de enfriamiento y establecer un método reproducible de análisis de viabilidad de tejidos. Este análisis de viabilidad se puede conseguir mediante el análisis de la concentración de sodio y potasio intra y extracelular. Cuando la célula es funcional mantiene una determinada concentración de estos dos iones fuera y dentro de la membrana, debido a que el sodio tiende a entrar siempre a la célula y el potasio a salir de ella, según los gradientes de concentración. La bomba de sodio-potasio mueve estos iones en contra de gradiente utilizando ATP, por lo que cuando deja de ser funcional la bomba deja de ser alimentada por ATP y por tanto deja de mover estos iones en contra de gradiente. De esta manera se puede determinar si la célula es viable o no en función de la concentración de estos dos iones fuera y dentro de la célula. Este método se pretendía aplicar a este proyecto, pero no fue posible debido a que para aplicarlo hay que hacer rodajas de los órganos, y no fue posible debido a las incidencias explicadas en el Anexo IV. Incidencias y problemas, *Intento de corte de rodajas con el Chopper*.

Se considera que los análisis realizados fueron insuficientes como para sacar unas buenas conclusiones sobre la vitrificación, ya que se valoró la penetrabilidad del DMSO en los tejidos, pero no se pudo evaluar ni la viabilidad en el momento post vitrificación ni el daño tisular. Además de ello, el proyecto es muy mejorable en cuanto a metodología mediante la disposición de más equipos de laboratorio, por ejemplo, un espectrofotómetro para medir concentraciones, un oxímetro para medir el oxígeno disuelto en las soluciones de perfusión, un fotómetro de llama para medir la concentración de iones metálicos y un microscopio que mantenga la muestra en frío mientras se observa si se han formado cristales.

Una vez se perfeccione la técnica de enfriamiento y los órganos lleguen a la fase de almacenamiento viables y sin formación de cristales comprobable, es apropiado pasar a la fase de recalentamiento, mucho más compleja, si cabe, debido a que los cristales tienen incluso más probabilidad de crecer en esta fase. Además, es posible el enfriamiento ultrarrápido e incluso instantáneo, pero no se ha descubierto un método que permita un recalentamiento tal y homogéneo. Se estudia la posibilidad de recalentar órganos mediante ultrasonidos, y ese proyecto está ya iniciado por otro equipo de estudiantes en el mismo laboratorio.

REFERENCIAS

- Allan, S., O'Donnell, V., Burnett, B., & Brash, J. (1999). Letters to the Editor. *Progress in Palliative Care*, 7(3), 120–121. <https://doi.org/10.1080/09699260.1999.11746838>.
- Ávila-portillo, L. M., Madero, J. I., & López, C. (2006). *Fundamentos de Crioconservación Basic points in cryopreservation*, 57(4), 291–300.
- Day, R. (2014). *Cómo escribir y publicar trabajos científicos, tercera edición. [disponible solamente en formato electrónico]*. Retrieved from <https://ebookcentral-proquest-com.biblioremot.uvic.cat>
- Electrónico, C. (n.d.). *MINISTERIO DE SANIDAD, CONSUMO Y BIENESTAR SOCIAL GABINETE DE PRENSA*. Retrieved from www.msbs.es
- F Fuentes, R Mendoza, A Rosales, & A Cisneros. (2008). *Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio:Raton. Instituto nacional de salud*. Retrieved from www.ins.gob.pe/insvirtual/images/.../GUIA_ANIMALES_RATON.pdf
- Fahy, G. M., Wowk, B., Wu, J., Phan, J., Rasch, C., Chang, A., & Zendejas, E. (2004). Cryopreservation of organs by vitrification: Perspectives and recent advances. *Cryobiology*, 48(2), 157–178. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.02.002>
- Gibb, A. A., McNally, L. A., Riggs, D. W., Conklin, D. J., Bhatnagar, A., & Hill, B. G. (2016). FVB/NJ Mice Are a Useful Model for Examining Cardiac Adaptations to Treadmill Exercise. *Frontiers in physiology*, 7, 636. doi:10.3389/fphys.2016.00636
- Ho, D., Zhao, X., Gao, S., Hong, C., Vatner, D. E., & Vatner, S. F. (2011). Heart Rate and Electrocardiography Monitoring in Mice. *Current Protocols in Mouse Biology*, 1, 123–139. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo100159>
- HRSA, & Dep. de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. (n.d.). Estadísticas de trasplantes y donación de órganos: datos gráficos | Donante de órganos. Retrieved August 11, 2019, from <https://donaciondeorganos.gov/estadísticas-historias/estadísticas/29cx/datos.html>
- Hrsa. (1999). OPTN: Organ Procurement and Transplantation Network. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Jennifer Welser. (2015). CD-1 Mice Versus C57BL/6 Mice – ScienCell Research Laboratories. Retrieved August 31, 2019, from <https://sciencellonline.com/blog/cd-1-mice-versus-c57bl6-mice/>
- Jennifer Welser. (2015). CD-1 Mice Versus C57BL/6 Mice – ScienCell Research Laboratories. Retrieved August 31, 2019, from <https://sciencellonline.com/blog/cd-1-mice-versus-c57bl6-mice/>
- Khan Academy. (n.d.). El potencial de membrana (artículo) | Khan Academy. Retrieved July 9, 2019, from <https://es.khanacademy.org/science/biology/human-biology/neuron-nervous-system/a/the-membrane-potential>

- Krasowski, M. D., & Harrison, N. L. (2000). The actions of ether, alcohol and alkane general anaesthetics on GABAA and glycine receptors and the effects of TM2 and TM3 mutations. *British Journal of Pharmacology*, 129(4), 731–743. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703087>
- Kuwayama, M., Gandhi, G., Kagalwala, S., & Ramani, R. (2015). Vitrification: An Overview. *Vitrification in Assisted Reproduction*, 1–7. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1527-1_1
- Laboratorio de Genómica Viral y Humana. (2008). *Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS) Procedimiento: Tabla de preparación: Notas: Referencias: Facultad de Medicina UASLP*. Retrieved from http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_Buffer_PBS.pdf
- Liu, S., Xu, M., Cao, X., Hou, J., Chen, N., Pang, F., ... Yan, J. (2017). The effect of laser acupuncture on hypoxia tolerance and inflammation reaction in mice with optical fiber acupuncture needle intra body. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 10(2), 1–7. <https://doi.org/10.1142/S1793545816500395>
- Pritchett, K. R., & Corning, B. F. (2004). Biology and Medicine of Rats. In: Laboratory Animal Medicine and Management. *International Veterinary Information Service (www.Ivis.Org)*, (January 2004), B2503.0904.
- Sago, H., Carlson, E. J., Smith, D. J., Kilbridge, J., Rubin, E. M., Mobley, W. C., ... Huang, T. T. (1998). Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6256–6261. doi:10.1073/pnas.95.11.6256
- Tomasi, V. (2010). Fijación de muestras biológicas. Retrieved August 4, 2019, from <http://educacionhistotecnologiafijacion.blogspot.com/>
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2018). *Principios de anatomía y fisiología*. Médica Panamericana. Retrieved from <https://www-medicapanamericana-com.biblioremot.uvic.cat/VisorEbookV2/Ebook/9786078546121#%7B%22Pagina%22:%22Portada%22,%22Vista%22:%22Indice%22,%22Busqueda%22:%22%22%7D>
- Zárate Méndez, L. H., & Valenzuela Montero, A. (2012). Sodium-potassium balance in the regulation of high blood pressure. *Medwave*, 12(02), e5301–e5301. <https://doi.org/10.5867/medwave.2012.02.5301>

Obras citadas en el texto:

- Alcalá, E., (2019). Trabajo Fin de Grado. Grado en Ingeniería Electrónica, Robótica y Mecatrónica. Universidad de Sevilla.
- Bell, R. M., Mocanu, M. M., & Yellon, D. M. (2011). Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(6), 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.02.018>
- Erhardt W, Hebestedt A, Aschenbrenner G, Pichotka B, Blumel G. A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate) *Res Exp Med (Berl)* 1984;184:159–169. [PubMed]
- Farrant, J. (1965). Mechanism of Cell Damage During Freezing and Thawing and its Prevention. *Nature* 205, 1284–1287.

- Ho, D., Zhao, X., Gao, S., Hong, C., Vatner, D. E., & Vatner, S. F. (2011). Heart Rate and Electrocardiography Monitoring in Mice. *Current Protocols in Mouse Biology*, 1, 123–139. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo100159>
- <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00345>
- Kaese, S., & Verheule, S. (2012). Cardiac electrophysiology in mice: A matter of size. *Frontiers in Physiology*, 3 SEP(September).
- Kuwayama, M., Gandhi, G., Kagalwala, S., & Ramani, R. (2015). Vitrification: An Overview. *Vitrification in Assisted Reproduction*, 1–7. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1527-1_1
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 247(3 Pt 1), 125-142.
- Pegg, D.E., Wang, L., & Vaughan, D. (2006). Cryopreservation of articular cartilage. Part 3: the liquidus-tracking method. *Cryobiology*, 52(3), 360-368.
- Pichugin, Y., Fahy, G. M., & Morin, R. (2006). Cryopreservation of rat hippocampal slices by vitrification. *Cryobiology*, 52(2), 228–240. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.11.006>
- Rall, W.F., Fahy, G.M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature*, 313(6003), 573-5.
- Risco, R., Gallardo, M., Saenz, J. (2018). Human oocytes and zygotes are ready for ultra-fast vitrification after 2 minutes of exposure to standard CPA solutions. Submitted to "Scientific Reports" SREP-18-27494.
- Stypmann J. Doppler ultrasound in mice. *Echocardiography*. 2007; 24:97–112. [PubMed]
- Suckow, M. A., Danneman, D. V. M. P., Brayton, V. M. D. C., Raton, B., New, L., & Washington, Y. (2001). *A Volume in The Laboratory Animal Pocket Reference Series MOUSE*. Retrieved from www.crcpress.com
- Uechi M, Asai K, Osaka M, Smith A, Sato N, Wagner TE, Ishikawa Y, Hayakawa H, Vatner DE, Shannon RP, et al. Depressed heart rate variability and arterial baroreflex in conscious transgenic mice with overexpression of cardiac G α . *Circ Res*. 1998a; 82:416–423.
- Uechi M, Uechi H, Nakayama T, Wakao Y, Ogasawara T, Takase K, Takahashi M. The circadian variation of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and gamma-glutamyl transpeptidase in clinically healthy cats. *J Vet Med Sci*. 1998b; 60:1033–1034. [PubMed]
- Yan L, Vatner DE, O'Connor JP, Ivessa A, Ge H, Chen W, Hirotsu S, Ishikawa Y, Sadoshima J, Vatner SF. Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell*. 2007; 130:247–258. [PubMed]
- Yang XP, Liu YH, Rhaleb NE, Kurihara N, Kim HE, Carretero OA. Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. *Am J Physiol*. 1999;277:H1967–1974. [PubMed]

ANEXOS

Anexo I. Material

Anexo Ia. Diseño y modificación de equipos e impresión 3D

Adaptación del Electrocardiograma a Mus musculus

Para poder analizar la señal del corazón Alcalá diseñó un programa en Matlab que leyese, en dos columnas de un archivo de texto, el instante de tiempo y el valor (en mV) de la señal. Para probar el programa se visitó una base de datos de bioseñales para investigación y desarrollo de acceso abierto (www.physionet.org) donde se pueden obtener gráficos, tablas, archivos .m y .txt así como información de la serie de datos. Se analizó con el programa diseñado en Matlab una señal de 10 segundos de duración sacada de esta base de datos y se comprobó que los valores coincidiesen.

“Con el análisis obtenemos una frecuencia cardíaca aproximada de 78 PPM, mientras que el cálculo de media de intervalos RR nos daba una frecuencia de 74,4 PPM. Se comprobó el intervalo RR medio de 0.804 segundos del análisis, coincidiendo con los datos publicados en Physionet” (Alcalá, 2019).

El ECG incluía la placa de medición, tres electrodos (R, L y COM) y diversos parches adhesivos para colocar y acoplar los electrodos. En la Fig. 44 se representan de forma esquemática los bloques del experimento que hicieron falta para poder acondicionar el ECG primero para personas y luego su adaptación a ratones.

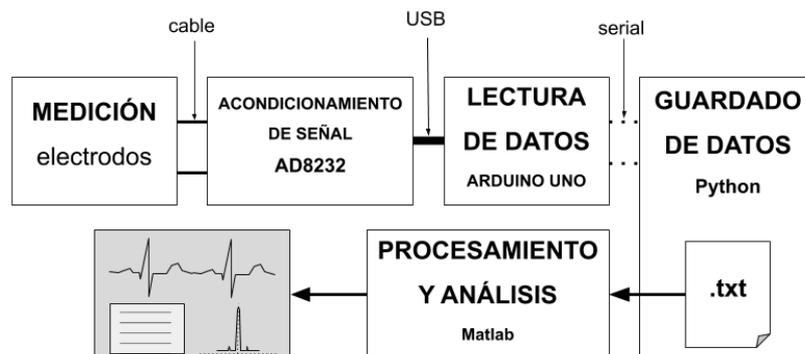


Fig. 44 Esquema de los bloques del experimento de ECG. Fuente: Alcalá, 2019.

“Se conectó el Leads-off + al pin digital 13, y el Leads-off – al pin digital 12. Las lecturas se hicieron por puerto analógico (A0), el circuito se alimentó con 3.3V nivel lógico. Los datos se enviaron a través de comunicación serial por el puerto COM14 en un string que contenía 2 datos y 3 almohadillas para segmentación. El primer dato es el instante de tiempo (se crea una variable contador interno que incrementa cada 10 ms) y la segunda con el valor de la señal adquirida y entregada por el AD8232. Puesto que Arduino no disponía de un método de guardado de datos, se ha optó por enviar esta información a un programa en Python que interpreta los string recibidos por COM14 y los guarda en un fichero de texto”, (Alcalá, 2019).

Se realizaron pruebas con personas para verificar que el ECG estaba leyendo la bioseñal correctamente, dando como resultado los datos resumidos en la Tabla 6.

Tabla 6 Datos de frecuencia cardíaca (ppm), intervalo RR (s) y magnitud del pico R (mV) de cuatro ECG realizados a 4 personas. Fuente: propia.

Sujeto	Frecuencia cardíaca (ppm)	Intervalo RR (s)	Magnitud del pico R (mV)
1 ♂	77.8160	0.7711	0.3322
2 ♂	75.6922	0.7927	0.3414
3 ♀	98.6388	0.6083	0.1509
4 ♂	67.5855	0.8878	0.2016

Una vez verificado el buen funcionamiento del ECG se procedió a adaptar los electrodos, que eran parches adhesivos de aproximadamente 3x3 centímetros, para poder ponerlos en contacto con puntos específicos de un ratón de peso medio de 30 gramos. “Para ello se elaboraron unos electrodos adicionales que se conectarían a los puertos LA, RA y RL de la placa electrónica”, (Alcalá, 2019).

Los electrodos se elaboraron con 3 monedas de 1 céntimo de euro. Se lijó el recubrimiento de cobre en una cara hasta dejar expuesto el acero para usarlo como electrodo, obteniendo una superficie suave y homogénea para el contacto con la piel. A la parte trasera de las monedas (la cubierta de cobre) se añadió una generosa gota de estaño y se soldaron cables de cobre para placas de prototipado. “Estos cables están crimpados en el otro extremo, facilitando la conexión con la placa del AD8232”, (Alcalá, 2019). La cara conductora de los nuevos electrodos se aisló con cinta adhesiva y se alargó, mediante empalme, “el cable de conexión RL (normalmente usado como tierra o COM cuando hay 3 electrodos)” (Alcalá, 2019) para que llegase a la parte abdominal del ratón.

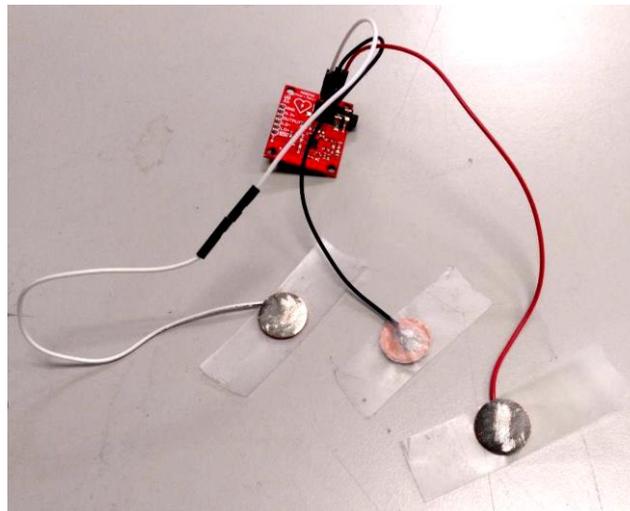


Fig. 45 Electrocardiograma con los electrodos adaptados para ratón (*Mus musculus*). Fuente: Alcalá, 2019.

Para hacerle el ECG al corazón *ex vivo* al mismo ECG se le sustituyeron las monedas de 1 céntimo por puntas de acero (agujas) al comprobar que de esta manera el resultado de la señal eléctrica no distaba tanto que la obtenida con los electrodos anteriores. La sujeción de las agujas a las aurículas y ventrículo izquierdo se hizo sosteniendo los cables manualmente durante el método Langendorff.

Diseño de piezas e impresión 3D

El soporte se diseñó en el programa de CAD (Google Sketchup Pro 2016). Se diseñaron dos piezas prototipo antes de la definitiva que resultaron no adaptarse completamente a las necesidades del experimento. La primera tenía un asa demasiado corta como para poder sujetar el soporte una vez sumergido en el depósito del BioCool, ya que al tener el corcho aire entre el material, el soporte entero tendía a flotar, por lo que era necesario presionar el asa continuamente para que no se moviera; además las aletas de sujeción de la tabla de corcho (Fig. 24-9) eran demasiado débiles. En la segunda versión se trató de corregir estos defectos y se agrandó el diámetro del agujero por donde pasaría el tubo de perfusión. El tercer diseño fue el que finalmente se utilizó para los experimentos, habiendo corregido los defectos anteriores (Fig. 46) mediante el alargado del asa a 10 centímetros y el diseño de las aletas en cruz para mayor refuerzo.

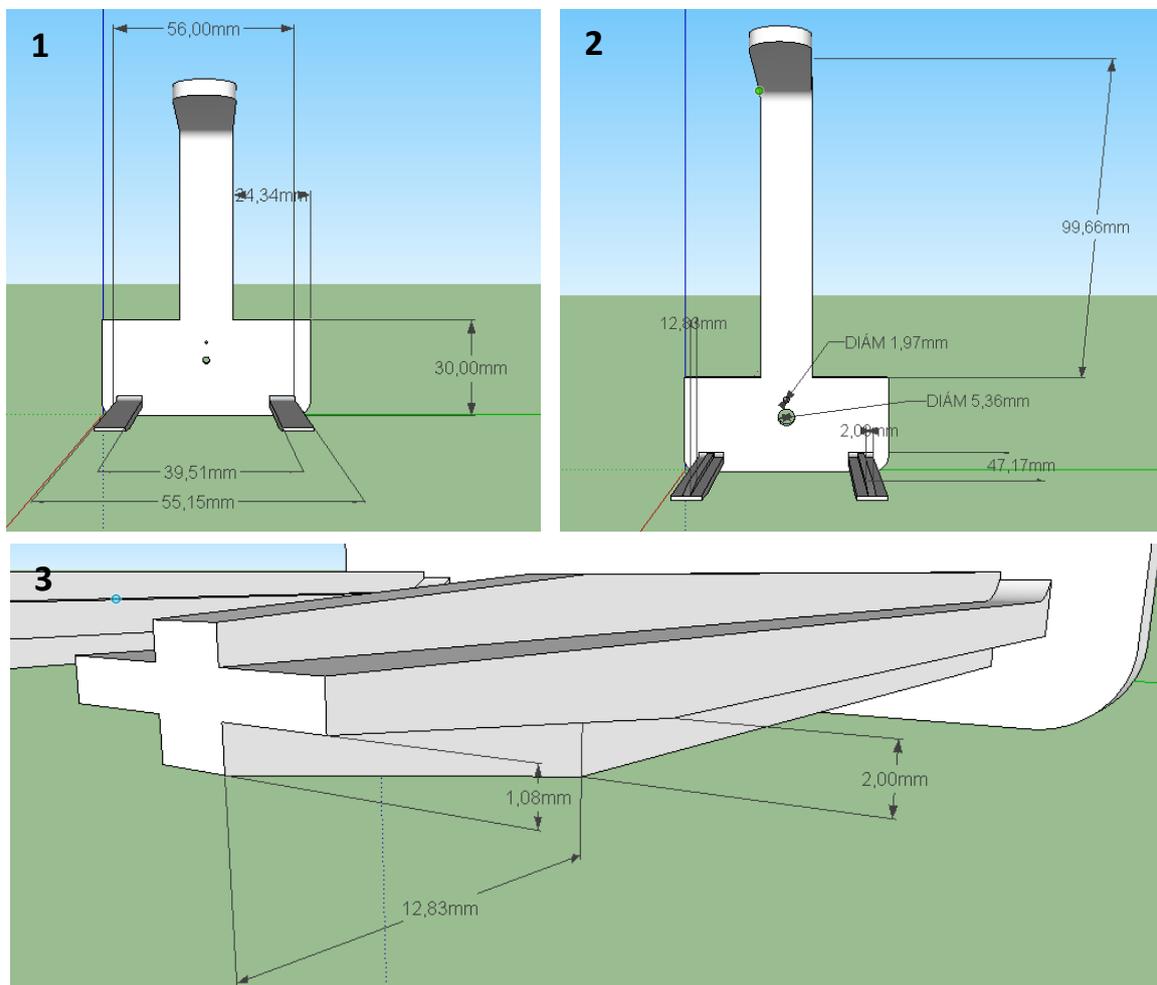


Fig. 46 Primera, segunda y tercera versión de la pieza de soporte para vitrificación de encéfalo y la evolución de las mejoras. Fuente: Alcalá, 2019.

“Las pruebas de encaje y holguras se hicieron dentro del propio entorno de diseño, con las medidas del depósito y un modelo de corcho de sujeción del animal para comprobar los espacios. En la figura Fig. 47 se muestra que las tres versiones sólo crecen en dirección Z (altura)” (Alcalá, 2019).

Se dejó un espacio de 3 centímetros para que el eje del agitador pudiera entrar sin colisionar con el soporte. La impresión se realizó con una impresora 3D modelo Ender 3 de Creality.

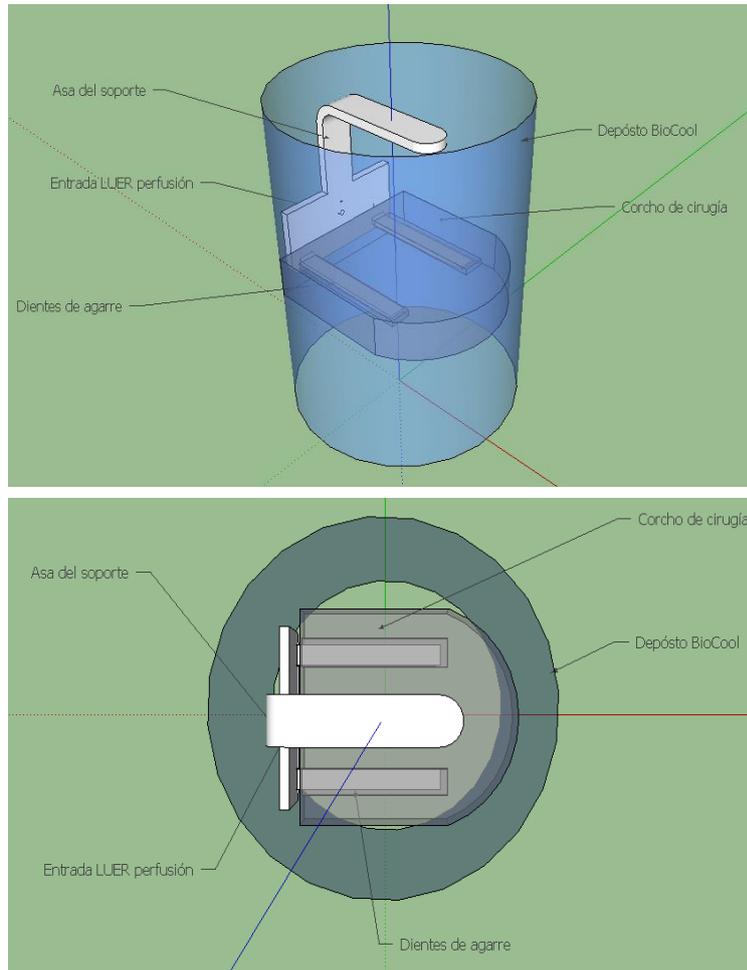


Fig. 47 Pruebas preimpresión de encaje y holgura realizadas en el programa de CAD en base a las medidas tomadas del depósito del BioCool. Fuente: Alcalá, 2019.

En la Tabla 7 se ofrecen los parámetros que se utilizaron para la impresión de la pieza.

Tabla 7. Parámetros de impresión 3D para impresora 3D Ender 3 de Creality. Fuente: Alcalá, 2019

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

La disposición y orientación para la impresión (cortado en capas y visualizado en Slic3r) fue la representada en la Fig. 48.

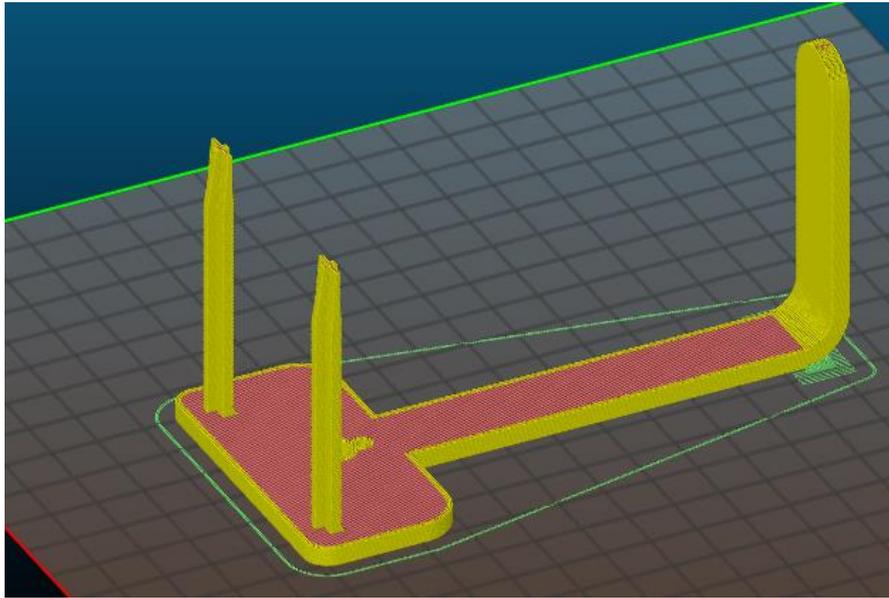


Fig. 48 Disposición y orientación para la impresión de la pieza 3D. Fuente: Alcalá, 2019.

Se soldó con estaño la pinza de cocodrilo al alambre se introdujo a un trozo de tubo de perfusión de silicona con el diámetro interior estrecho, a fin de que la silicona produjese fricción para el movimiento vertical del alambre. El alambre con la silicona se introdujo por el agujero del asa del soporte, de forma que el tubo de silicona quedase justo a la altura del agujero, y se fijó en esta posición con pegamento (Fig. 24-2).

Durante la construcción, se comprobó que el conector LUER macho-macho del perfusor estaba defectuoso y tenía fugas. Se reemplazó con un nuevo conector fabricado en el laboratorio. Se colocó un arco de metal hecho de alambre para colocar sobre la caja torácica del ratón acoplado al soporte, con el fin de proteger la zona de presiones mecánicas y de sujetar el hilo del termopar que iría introducido en la boca hasta la base del hueso esfenoideos (punto más cercano hasta el cerebro desde la boca). En la Fig. 49 se puede observar el montaje final del soporte.

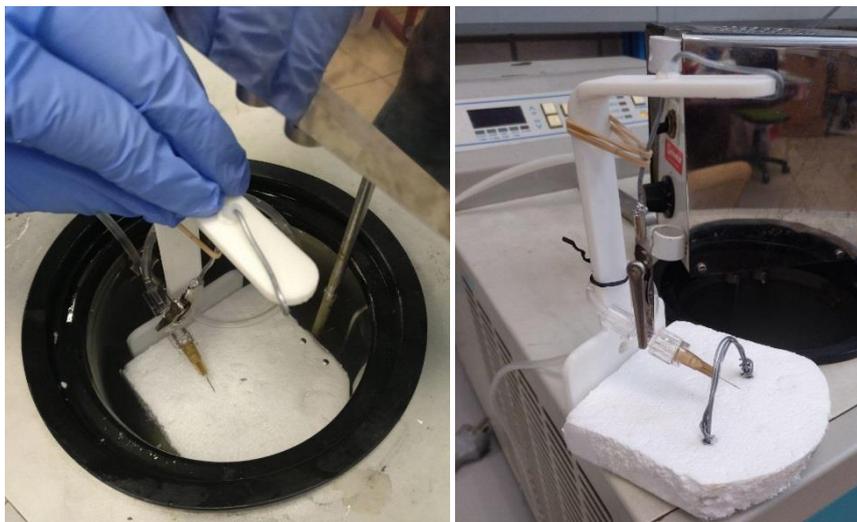


Fig. 49 Montaje final del soporte para vitrificación equilibrada de encéfalo. Fuente: propia.

Diseño de sistemas hidráulicos

Todos los sistemas hidráulicos utilizados para los procedimientos han sido diseñados y construidos a partir del material y equipos disponibles en el laboratorio, y se han ido mejorando con la experiencia experimental. A continuación, se describe el diseño final de los dos sistemas hidráulicos: para método de perfusión retrógrada de corazón *ex vivo* y para vitrificación.

Aguja de perfusión de corazón

La aguja de perfusión se acopló a un luer o llave de paso aprovechando su capacidad para acoplarse a jeringuillas, tubos de perfusión u otras llaves de paso. De esta manera se obtuvo una aguja acoplable a cualquier sistema hidráulico y portátil, característica necesaria para la canulación de corazón. El acople se hizo sellando con Epoxi y probando de hacer pasar líquido a alta presión para comprobar fugas y volverlas a sellar, hasta conseguir un completo hermetismo.

Sistema hidráulico del método Langendorff

El método Langendorff puede dividirse en dos etapas del proyecto, marcadas por la disposición de una nueva bomba Harvard modelo PHD 4400 que funciona moviendo el émbolo de una jeringa cargada. Su descripción se encuentra en el apartado de Metodología, Material inventariable.

Los primeros meses se disponía de una bomba peristáltica semejante a las del sistema hidráulico para vitrificación, pero esta tenía su capacidad máxima de perfusión por debajo de las necesidades de la presión arterial del corazón de *Mus musculus* (75/120 mmHg) (Suckow et al., 2001), por lo que el método no lograba llegar a los requerimientos para mantener viable un corazón *ex vivo*. En este circuito un tubo succionaba Tyrode's de un depósito, lo dirigía hacia la bomba peristáltica y esta impulsaba el líquido hasta la salida de la aguja de perfusión. La bomba estaba alimentada por una fuente de tensión a la que se le podía regular el voltaje de salida, afectando a la velocidad de los rodillos de la bomba peristáltica. El caudal máximo que podía mover la bomba estaba en los 0.32 mL/min, lo que equivale a una presión de salida de 78.2 mmHg, y el voltaje máximo al que dejaba de responder era aproximadamente 3.22 V. Los cálculos de presión y caudal de la bomba se encuentran en el Anexo III. "*Cálculos de presión respecto a voltaje*".

Con la nueva bomba HARVARD estos problemas se eliminaron, dado que esta provee caudales mayores programables. En este sistema el intervalo de presiones (75 – 120 mmHg) se alcanza con caudal programado de entre 1.9 y 3 mL/min, y dado que el caudal coronario de un ratón se encuentra en el intervalo de 2.0 y 5.5 mL/min (Bell et al., 2001, p. 947), se considera un rango ideal para la perfusión mediante la bomba HARVARD. En la Fig. 50 se representa un esquema del circuito de perfusión diseñado y construido, diferenciado en dos etapas: circuito para carga y purga y circuito para la perfusión.

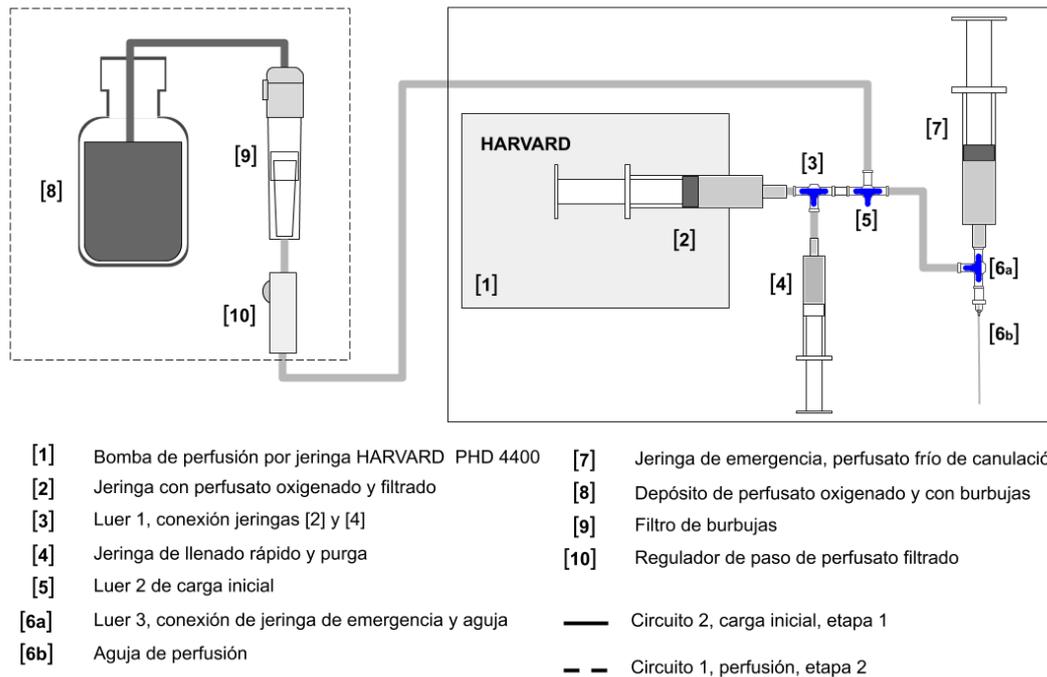


Fig. 50 Esquema del sistema hidráulico de perfusión del método Langendorff. Fuente: Alcalá, 2019.

“Siguiendo la numeración de la figura, la bomba Harvard [1] ejerce presión sobre el pistón de la jeringa principal de perfusión [2]. Esta, cuando la llave de tres vías luer [3] está en posición de paso principal, perfunde con Tyrode’s hasta [6a], donde el rutado de la llave dirige el perfusato hasta la salida de la aguja [6b]. La jeringa [4] es una jeringa de emergencia y precarga. Su función es depurar los conductos de toda posible burbuja de aire, y cebar el conducto principal antes de cada perfusión. La llave [5] se habilita cuando se va a cargar la jeringa principal. Esto se realiza mediante el filtro médico de burbujas [9] si se ha habilitado el bloqueo [10]. El depósito [8] contiene Tyrode’s oxigenado, en el que hay posibilidad de presencia de burbujas, y por ello se requiere el filtro [9]. La jeringa [7] es residual de la canulación, y se utiliza para perfundir durante el proceso de programación de la bomba y conexión de los tubos, para no interrumpir la perfusión” (Alcalá, 2019).

Sistema hidráulico del método de vitrificación en equilibrio

El sistema hidráulico consta de dos depósitos (uno de DMSO y uno de PBS) de donde se succiona líquido mediante dos tubos de perfusión. Cada uno de estos tubos se dirige a una bomba peristáltica diferente (cada una se mueve a una velocidad diferente en cada momento, controlada por el sistema informático que sigue la curva de concentración en función del tiempo). Después de que el líquido pase por las bombas, es impulsado por aproximadamente 50 cm de tubo hasta una unión de ambos en forma de T, por donde se mezclan ambas sustancias y salen por la aguja de perfusión a un caudal y presión determinados.

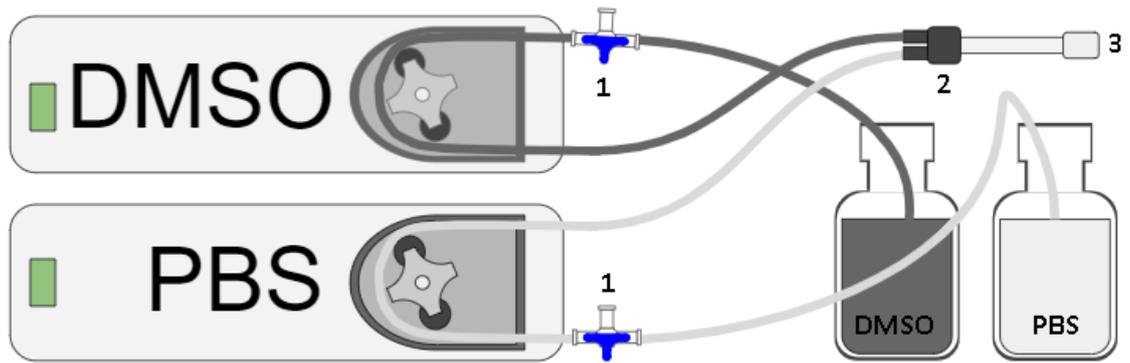


Fig. 51 Circuito hidráulico diseñado para el método de vitrificación equilibrada. 1/ Llaves de paso o luers. 2/ Unión en forma de T (mezclador). 3/ Salida del sistema de perfusión (donde se acopla la aguja para perfundir). Fuente: Alcalá, 2019.

En la Fig. 51 se ha representado esquemáticamente el circuito hidráulico de la vitrificación. Cabe señalar que tiene algunas diferencias respecto al circuito final, dado que por los problemas causados por las propiedades disolventes del DMSO a temperatura ambiente los tubos de plástico fueron, en numerosas ocasiones, dañados hasta provocar fugas del líquido. Esto provocó que se tuviesen que cambiar los tubos constantemente y evocó al equipo al posterior cambio en el diseño, en el que se sustituyeron los tubos de plástico por fragmentos de tubos de silicona unidos mediante baipás (Fig. 52) con otro tubo (de mayor diámetro) de polietileno, y selladas las uniones con Epoxi al principio, y posteriormente con silicona, dado que el DMSO también disolvía el Epoxi. La silicona y el polietileno fueron los dos únicos materiales encontrados que el DMSO no fuera capaz de disolver y que sirvieran para acoplar al sistema hidráulico. Se puntualiza que a los órganos no los daña debido a la baja temperatura a la que se somete el DMSO en el interior del BioCool. Los luers fueron eliminados del circuito del DMSO, ya que no pudieron ser sustituidos.



Fig. 52 Baipás entre tubos de silicona mediante tubo de polietileno de mayor diámetro (negro), con las conexiones selladas con silicona. Fuente: propia.

Anexo Ib. Especificaciones técnicas de reactivos y preparación de medios*Especificaciones técnicas de reactivos*

En la siguiente Tabla 8 se detallan las especificaciones técnicas de todos los reactivos utilizados durante el proyecto.

Tabla 8 Especificaciones técnicas de los reactivos utilizados en el proyecto. Fuente: propia.

Reactivo	Fórmula	Pureza (%)	Referencia	Marca
Buffer HEPES	Disolución ^a	—	51558-50ML	Sigma Aldrich
Cloruro de Calcio Dihidratado	CaCl ₂ · 2H ₂ O	99	21100	Fluka Chemika
Cloruro de Magnesio anhydrous	MgCl ₂	95	M8266-100G	Sigma
Cloruro de Magnesio Hexahidratado	Cl ₂ Mgg · 6 H ₂ O	99	A1447,1000	AppliChem
Cloruro de Potasio	KCl	> 99.5	60130	Fluka Chemika
Cloruro de Sodio	NaCl	≥ 99.0	7647-14-5	Cosela
Dimetil Sulfoxido	C ₂ H ₆ OS	99.0	141954.1214	Panreac
Etilenglicol	C ₂ H ₆ O ₂	99.5	33068	Riedel-de Haën
Fosfato de Sodio dibásico anhydrous	Na ₂ O ₄ P	≥ 99.0	71640	Fluka Chemika
Fosfato Dipotásico anhydrous	K ₂ HPO ₄	98	141512.1210	Panreac
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	≥ 99.5	G7893-500ML	Sigma Aldrich
Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	< 99.5	G6152-100G	Sigma
Hidróxido de Sodio	NaOH	≥ 98%	S8045-500G	Sigma Aldrich
2,2,2-Tribromoethanol	CBr ₃ CH ₂ OH	97	FG282.77	Sigma Aldrich
Tyrode's HEPES comercial	Disolución ^b	—	T2145-10L	Sigma Aldrich

^a Concentration (in H₂O): 10 g/l HEPES; 16 g/l NaCl; 0.74 g/l KCl; 0.27 g/l Na₂HPO₄·2H₂O; 2.0 g/l dextrose

^b Calcium Chloride (anhydrous) 0.2, Magnesium Chloride (anhydrous) 0.1, Potassium Chloride 0.2, Sodium Chloride 8.0, Sodium Phosphate Monobasic 0.05 (anhydrous), D-Glucose 1.0

Preparación de medios

Algunos de los reactivos/medios que se utilizaron se prepararon en el laboratorio, ya sea mediante disolución o mediante dilución. Los dos medios que se usaron, Tyrode's HEPES y PBS, fueron preparados en el laboratorio a partir de los reactivos disponibles hasta junio, donde llegaron sobres de preparado en polvo de medio Tyrode's que sólo había que disolver en 1 L de agua destilada. En la Tabla 9 se describe la composición detallada de ambas disoluciones.

Tabla 9 Composición de la disolución Tyrode's HEPES y Phosphate Buffer Saline (PBS), en g/L. Fuente: propia.

(g/L)	NaCl	KCl	Na ₂ HPO ₄	MgCl ₂	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂ · 2H ₂ O	Buffer HEPES	Glucosa
Tyrode's	5.844	0.403	—	0.203	—	0.265	2.383	4.504
PBS ⁹	8.0	0.2	1.444	—	0.24	—	—	—

Se pesaron cada uno de los reactivos en balanza analítica, con un error de ± 0.001 g, tarando previamente el contenedor (vaso de precipitados de 250 mL, lavado con agua destilada y seco). En cada pesada se limpió la espátula con agua destilada y se secó con papel de laboratorio para no contaminar los demás reactivos. Los solutos pesados se fueron añadiendo a un vaso de precipitados de 500 mL que estaba sobre un agitador magnético con agua destilada y la mosca (imán). En cada pesada se taró el vaso de precipitados antes de pesar el siguiente reactivo.

Una vez pesados todos los reactivos y disueltos en agua destilada uno por uno, se realizaron tres lavadas del vaso de precipitados de 250 mL con agua destilada, que se depositó al vaso de precipitados con la mezcla de solutos, arrastrando las partículas de las pesadas.

A continuación, se trasvasó el contenido del vaso de precipitados de 500 mL a un matraz aforado de 1 L, se volvió a lavar también tres veces con agua destilada para arrastrar las posibles partículas disueltas que se hubiesen podido quedar, y se enrasó con agua destilada hasta la línea del aforado del matraz, procurando que el menisco del líquido tocara, con su punto más bajo, la línea de aforado. Se homogeneizó la disolución volcando el matraz aforado tres veces con el tapón puesto, y se guardó en botes de vidrio limpios y secos.

El tribromoethanol (TBE), la anestesia utilizada para sacrificar a los ratones destinados a vitrificación de encéfalo tenía una pureza del 99.5% y estaba contenido en polvo en su recipiente comercial. Para disolverlo en una disolución al 2% se añadieron 2 g de TBE a 98 mL de agua pura.

⁹ La elaboración del PBS se basó en el trabajo de La elaboración del PBS es referida de (Laboratorio de Genómica Viral y Humana, 2008) - *Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS)*.

Anexo Ic. Fotografías de los equipos

Equipos de perfusión retrógrada de corazón (método Langendorff)



Fig. 53 Bomba de jeringa HARVARD modelo PHD 4400 Programmable, con jeringa cargada y conectada a circuito hidráulico con aguja de perfusión. Manómetro. Fuente: propia.

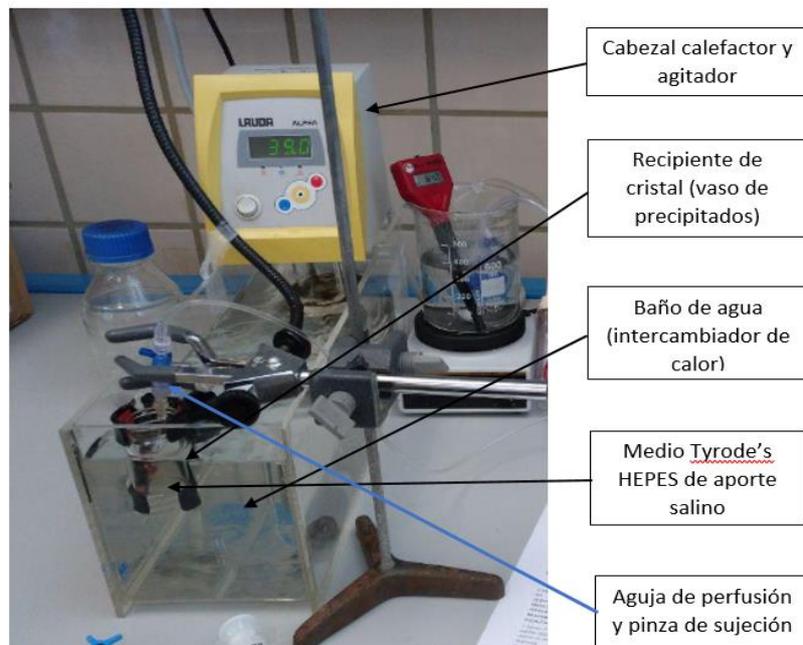


Fig. 54 Baño de incubación para soporte vital de corazón ex vivo. Fuente: Alcalá, 2019.



Fig. 56 Tubo del circuito de carbógeno (superior izquierda). Tubo de circuito de carbógeno junto con manorreductores (inferior izquierda). Bombona de carbógeno (derecha). Fuente: propia.



Fig. 55 Multiparamétrico utilizado esencialmente para medir el pH y la temperatura. Fuente: propia.

Equipos de vitrificación en equilibrio

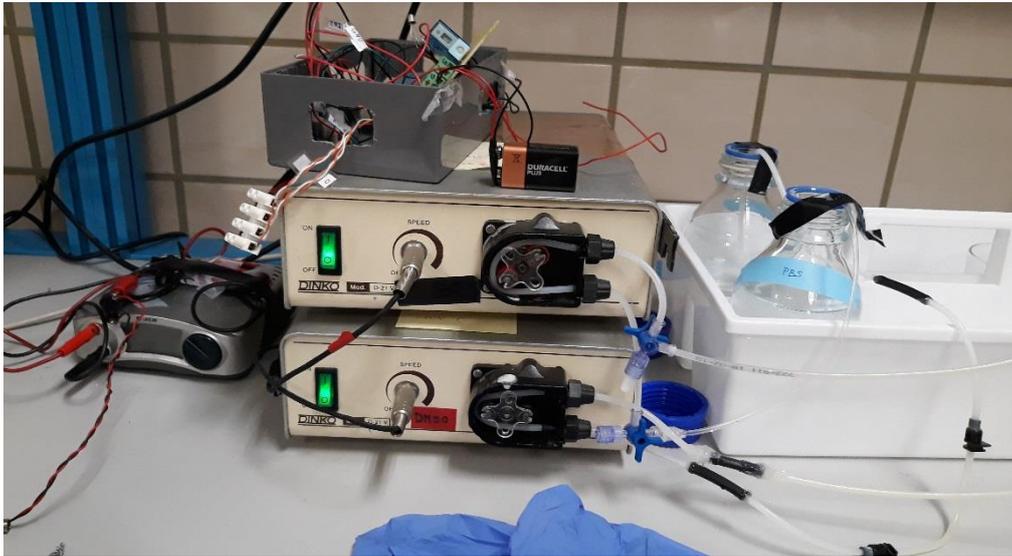


Fig. 57 Bombas peristálticas de PBS y DMSO utilizadas en vitrificación en equilibrio. Fuente: propia.



Fig. 58 BioCool junto con Picolog. Fuente: propia.



Fig. 59 Refractómetro. Fuente: propia.



Fig. 60 Cántara de seguridad de contención de nitrógeno líquido. Fuente: propia.

Equipos de análisis de resultados



Fig. 61 Equipo de Tomografía Axial Computerizada (TAC). Fuente: propia.

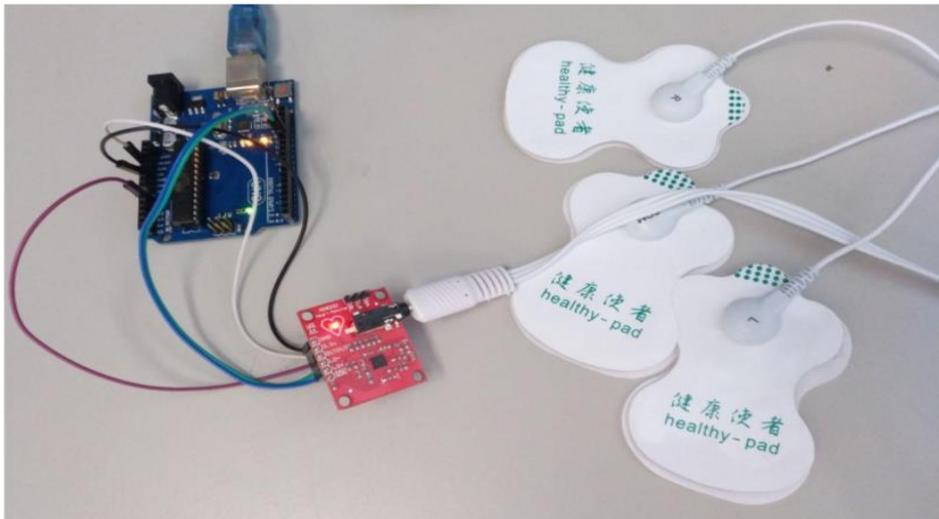


Fig. 62 Electrocardiograma con electrodos acoplados a parches adhesivos. Aún sin adaptar. Fuente: propia.

Anexo Id. Caracterización de las cepas de ratón (*Mus musculus*)

FVB – Corazón y cerebro

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

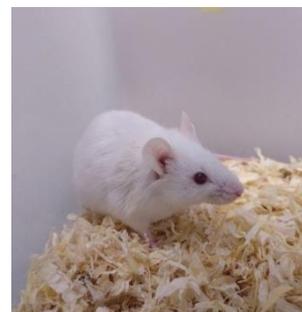


Fig. 63 Cepa FVB. Fuente: propia.

C-D1 – Corazón

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



Fig. 64 Cepa CD1. Fuente: propia.

C57-C3H – Corazón

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



Fig. 65 Cepa C57C3H. Fuente: propia.

TS1CJE – Corazón

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

C57 – Corazón

(C57BL/6) Primera cepa que se usó para los experimentos. Nos proporcionó una visión clara de la aorta y sirvió como modelo para la canulación de ese momento en adelante. Es una cepa que compite con la CD-1 en laboratorio dada su versatilidad y similitud a nivel fisionómico (pesos similares a edades similares). Las crías nacidas por relaciones endogámicas son casi idénticas entre ellas y sus progenitores, por lo que esta cepa crea un grupo estable para experimentación reiterada y ofrece muestras con baja variabilidad interindividual. (Welser, J., 2015)

Beige – Cerebro

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



Fig. 66 Cepa Beige. Fuente: propia.

Anexo III. Cálculos

Caracterización de la bombas peristálticas para vitrificación

Se hicieron 5 mediciones del volumen de líquido expulsado por la salida del tubo del sistema hidráulico, utilizado para la perfusión retrógrada por la aorta del corazón, a diferentes voltajes aplicados mediante la fuente de alimentación, con un rango de 0 a 10 V. Se recogieron los datos a partir de los cuales se elaboró la recta de la Fig. 67.

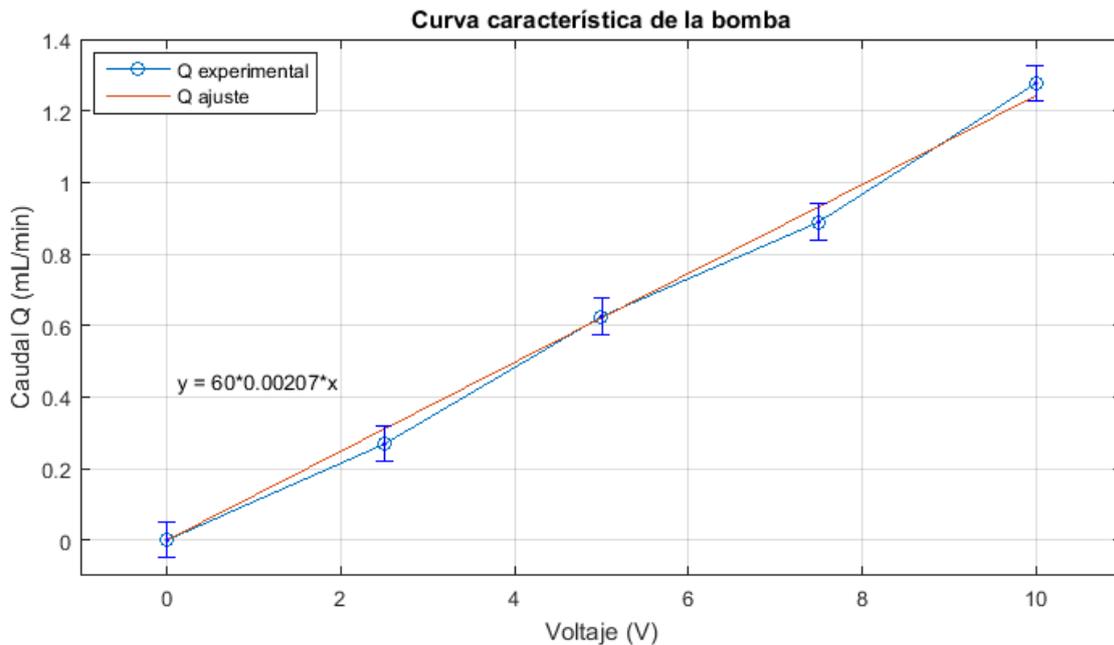


Fig. 67 Curva de caracterización de la bomba peristáltica para perfusión retrógrada. Fuente: Alcalá, 2019.

Para tener un correcto funcionamiento de las bombas durante la perfusión, es necesario cebar los tubos como se indicará posteriormente en el protocolo. En mediciones experimentales se ha comprobado que el conducto de PBS tarda unos 11 minutos en cargar completamente el tubo del líquido tras iniciar el programa de perfusión, mientras que el tubo del DMSO tarda 27 minutos en llegar desde el depósito hasta la salida. Esto significa que antes de comenzar la perfusión para vitrificación, ambos tubos deben estar completamente cargados y sin burbujas de aire. Además, se ha observado que hay un tiempo muerto de la bomba de DMSO desde el inicio del programa hasta el minutos 13, cuando le llega un voltaje suficiente como para hacerla mover. Debido a la poca cantidad de DMSO que se perfunde en estos primeros 13 minutos, se ha despreciado el valor perdido y se ha seguido adelante en todos los experimentos a pesar del tiempo muerto.

Dosis de heparina

El cálculo de la dosis de heparina necesaria para ratón se hizo considerando la dosis de heparina en función de volumen total de sangre. Un ser humano tiene entre 5 y 6 L de volumen de sangre total y un ratón entre 2 y 3 mL y por cada litro de sangre se necesita 0.1 mL de heparina ((Kaese y Verheule, 2012)).

Si por cada litro de sangre se deben aplicar 0.1 mL de heparina y cada ratón tiene una media de 2 mL de sangre total, la dosis media de heparina necesaria para cada ratón será:

$$2 \text{ mL sangre} \cdot \frac{0.1 \text{ mL heparina}}{1000 \text{ mL sangre}} = 0.0002 \text{ mL heparina/ratón}$$

No obstante, esta cantidad de volumen de heparina no es posible de administrar con los medios disponibles en el laboratorio, ya que la heparina debía ser inyectada mediante una jeringa de insulina de 1 mL de capacidad. La heparina total disponible en el laboratorio era de 0.2 mL, dosis necesaria para heparinizar un total de 2 litros de sangre, es decir, suficiente como para heparinizar 1000 ratones. Por esto se decidió diluir el contenido total a una dilución que permitiese coger una dosis equivalente a 0.0002 mL de heparina por inyección.

Para tener 1000 dosis de 0.1 mL inyectables se necesitan:

$$0.1 \text{ mL dosis inyectable} - 0.0002 \text{ mL heparina} = 0.0998 \text{ mL de agua pura}$$

$$1000 \cdot 0.0998 \text{ mL} = 99.8 \text{ mL de agua pura}$$

Por lo que se diluyeron los 0.2 mL de heparina en 99.8 mL de agua pura y se administraron dosis de 0.1 mL por ratón. En función del peso del ratón y de la experiencia, el volumen de dilución de heparina se incrementó al tener fenómenos de coagulación en algunos experimentos, indicio de heparinización insuficiente.

Equivalencia % Brix – Molaridad

Para hacer la conversión de % Brix a Molaridad se hizo un banco de diluciones a diferentes concentraciones conocidas de DMSO, v/v, en intervalos del 10% de concentración respectivamente, desde el 0% hasta el 100%, sobre matriz de PBS.

Se midieron los % Brix que indicaba cada una de las concentraciones hasta el 40% de concentración, última medida antes de que los % Brix se saliesen de la escala medible del instrumento. A partir de esta medida, se diluyeron las concentraciones de DMSO desde el 50 hasta el 100%, se midieron los % Brix de estas nuevas diluciones y el valor se multiplicó por el factor de dilución.

La molaridad de las soluciones se calculó utilizando la densidad del DMSO comercial, la masa molar del DMSO y el volumen conocido de DMSO en cada dilución. Los cálculos son los siguientes:

$$Mol_{DMSO} = V_{DMSO}(mL) \cdot \frac{1000 \text{ g DMSO}}{1000 \text{ mL DMSO}} \cdot \frac{1 \text{ mol DMSO}}{78.13 \text{ g DMSO}}$$

$$Molaridad \left(\frac{mol}{L} \right) = \frac{mol \text{ DMSO}}{L \text{ totales disolución}}$$

El PBS (matriz) indicaba 2 % Brix, por lo que se asumió que el error de las mediciones del refractómetro era de, como máximo, el 2%, ya que este mide cantidad de solutos y el PBS es una solución salina.

A partir de los datos obtenidos se elaboró una recta de ajuste que permitiese predecir la molaridad de la solución a partir de los % Brix medidos experimentalmente (Fig. 68).

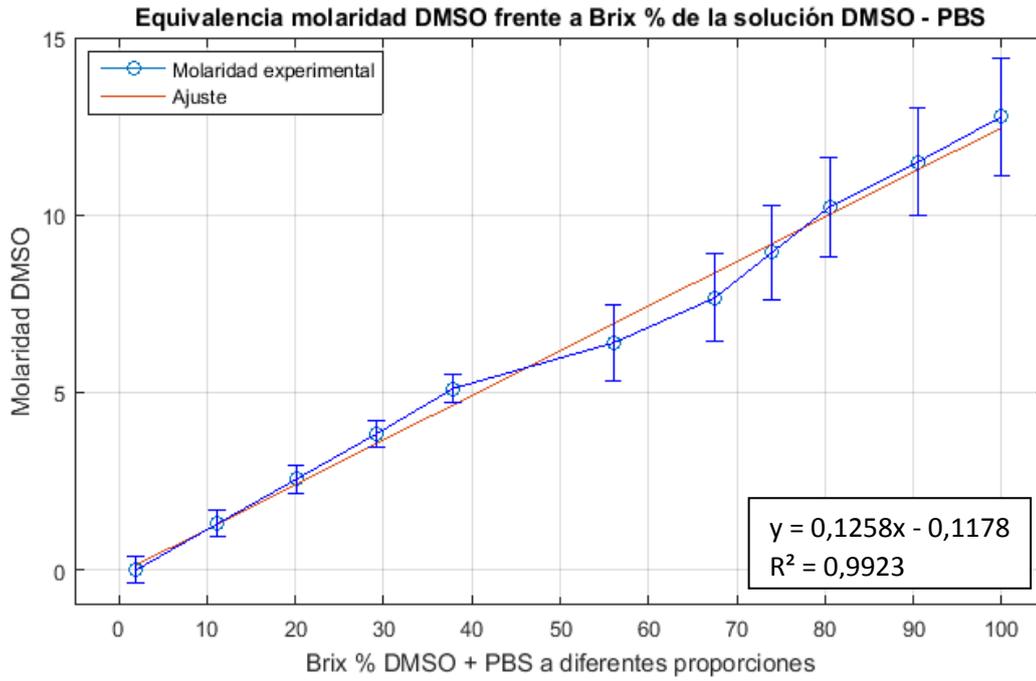


Fig. 68 Recta de ajuste a partir de los valores % Brix medidos y del cálculo de molaridad a partir de la concentración conocida del banco de diluciones. A partir de la ecuación de la recta se puede predecir la molaridad a partir de la medición en % Brix. Fuente: propia.

Cálculos de presión respecto a voltaje (Bernoulli)

En este anexo se describe el cálculo de las presiones de salida del sistema de perfusión retrógrada de corazón (método Langendorff).

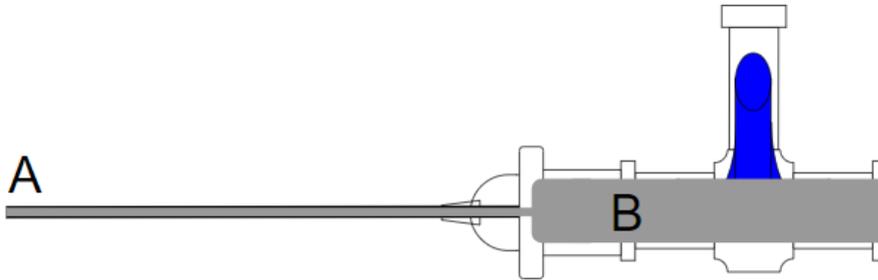


Fig. 69 Esquema de la aguja de perfusión retrógrada. (A) Salida. (B) Entrada. Fuente: Alcalá, 2019.

Los valores dimensionales de la aguja utilizada para este método se detallan en la Tabla 10.

Tabla 10 Valores dimensionales de la aguja de perfusión. Fuente: Alcalá, 2019.

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

La presión a la salida de la aguja (Fig. 69 Esquema de la aguja de perfusión retrógrada. (A) Salida. (B) Entrada. Fuente: Alcalá, 2019. Fig. 69-A) debe ser inferior a la presión arterial murina (de entre 75 y 120 mmHg). La geometría de la aguja determina la relación entre la presión de entrada y salida, dependiente del caudal en el punto de trabajo, según Bernoulli. Al tener un tubo de sección constante con un estrechamiento entre dos constantes y considerando al fluido poco viscoso y de densidad semejante a la del agua, se calcula la presión a la salida de la aguja:

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

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

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

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

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

Donde las secciones A_{en} y A_{sal} son datos conocidos.

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

El primer detalle muestra la pequeñísima diferencia entre la presión a la entrada y la presión a la salida, pero siendo P_{sal} siempre inferior a P_{en} , como dicta el comportamiento de fluidos en un estrechamiento. Esta pequeña diferencia se comprende si se consideran las bajas velocidades a las que circula el fluido por el estrechamiento. Pese a ser la diferencia en la sección de los tubos del orden de 100, y por tanto la diferencia de velocidad del orden de 100, al elevarse al cuadrado valores tan pequeños hacen que apenas se aprecie esta caída de presión. Es de considerarse que la aportación del término de altura, ρgh , es despreciable respecto al valor de P_{en} al encontrarse un extremo elevado 1 cm sobre el otro” (Alcalá, 2019).

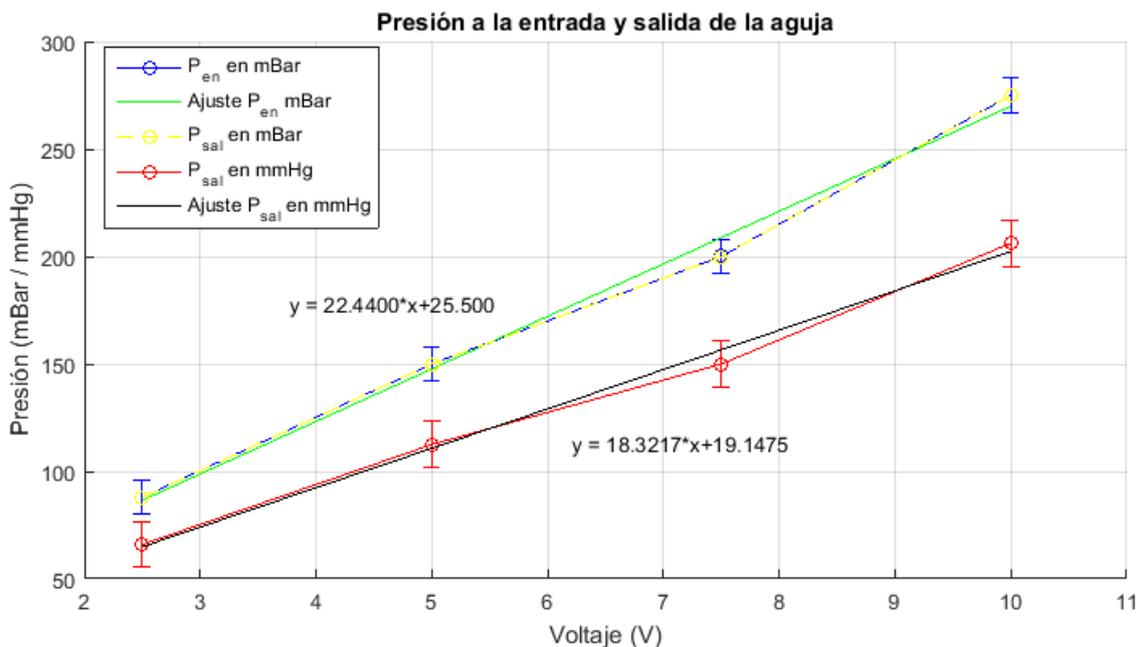


Fig. 70 Curvas de presiones a la entrada y salida de la aguja. Fuente: Alcalá, 2019.

Calibración del TAC

Para realizar la recta de calibración del TAC y poder calcular los valores de concentración v/v de DMSO a partir de los datos RAW o HU del TAC, se hizo un banco de diluciones de concentraciones conocidas de DMSO sobre PBS, en intervalos de concentración de 20% entre el 0 y 100% de DMSO.

Los crioviales que contenían las diluciones se introdujeron en la máquina del TAC para obtener los valores de densidad y poder así sacar una recta y su ecuación. Se cogió el PBS como blanco, puesto que el banco de diluciones está hecho en matriz de PBS. Se obtuvo la recta representada en la Fig. 71:

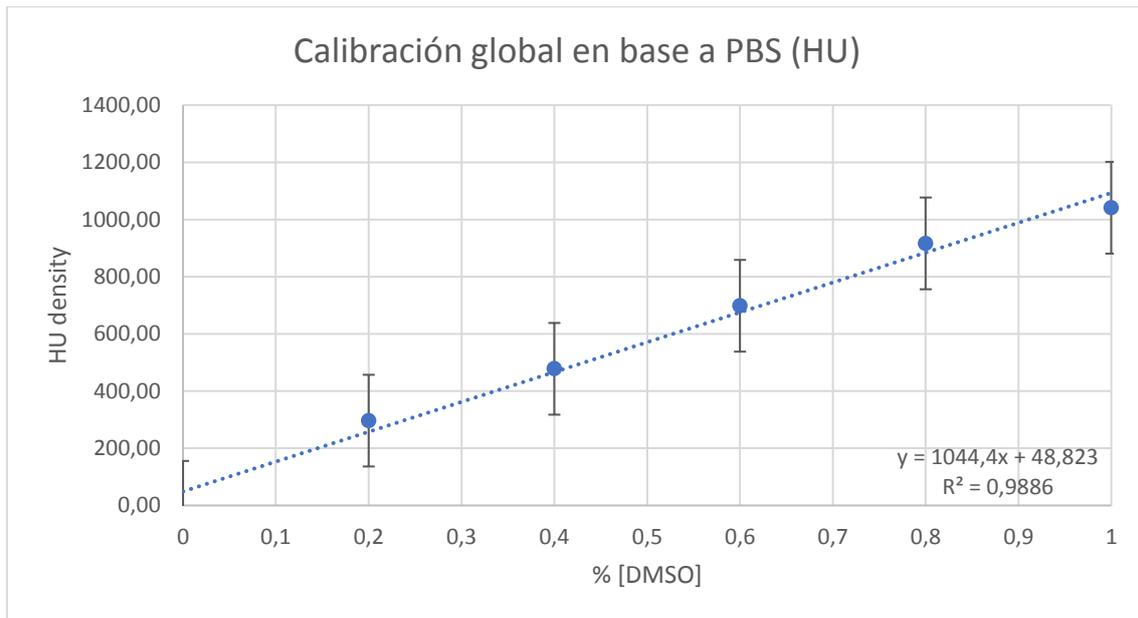


Fig. 71 Recta de calibración del TAC. Valores de densidad dados en RAW y pasados a HU a partir de la concentración de DMSO conocida de las diluciones. Fuente: propia.

Para conocer la concentración de DMSO (v/v) de los órganos a partir de los valores RAW dados, estos se convirtieron a HU, se aisló "x" de la ecuación de la recta sustituyó "y" por el valor HU calculado.

$$\text{Pasar de RAW a HU: } HU = 1000 \cdot \frac{\mu_t - \mu_{\text{agua}}}{\mu_{\text{agua}}}$$

Donde μ_{agua} es el coeficiente de atenuación lineal del agua destilada y μ_t el coeficiente de atenuación lineal del tejido o material de interés.

$$\text{Calcular \%DMSO: } \%[DMSO] = \frac{(HU - 48,823)}{1044,4}$$

Anexo IV. Incidencias y problemas

DMSO como disolvente

Debido a las propiedades disolventes del DMSO a temperatura ambiente, se tuvieron muchos problemas con el circuito hidráulico ya que los tubos fueron dañados continuamente provocando fugas en el sistema y arrastre de partículas de plástico en el líquido de perfusión. Esto provocó que se tuvieron que sustituir varias veces hasta que se logró diseñar el circuito con materiales que el DMSO no fuese capaz de disolver, estos eran la silicona y el polietileno. Por ello se acoplaron tubos de silicona extraídos de otras bombas peristálticas del laboratorio y se empalmaron entre sí haciendo baipás con otro tubo de polietileno de mayor diámetro, de color negro, y se sellaron las conexiones con Epoxi.

De nuevo con el problema de que el DMSO también disolvía el Epoxi y las llaves de paso de plástico, se procedió a sellar las conexiones con silicona, solucionando definitivamente el problema.

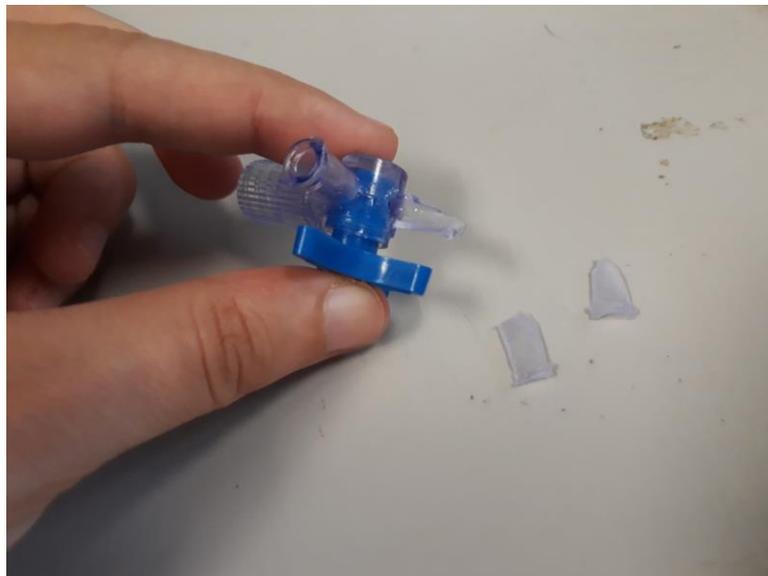


Fig. 72 Llave de paso después de entrar en contacto con DMSO durante un minuto. Fuente: propia.

Indisposición de la bomba de jeringa

La bomba de jeringa HARVARD PHD 4400 no estuvo disponible desde el principio del proyecto, sino que se disponía de una bomba peristáltica que se controlaba con una fuente de alimentación que le proporcionaba un voltaje controlable manualmente. Esta bomba, antigua, no era capaz de mover más de 0.30 mL/min de caudal, y habiendo calculado la presión de salida a este caudal, estaba al límite del umbral inferior aceptable de presión arterial de ratón.

La llegada de la bomba, proporcionada por el dpto. de Física de Fluidos de la US, marcó la diferencia en los resultados del método de perfusión retrógrada de corazón.

Indisposición de Carbógeno

Hubo enormes dificultades para obtener una bombona de Carbógeno, ya que este tipo de bombonas de alta presión solo se venden a Instituciones registradas con un gran seguimiento

de seguridad. Hubo que hacer una serie de gestiones para obtenerla y esto llevó meses. Mientras tanto el equipo se vio forzado a utilizar un aireador normal de uso general en acuarios.

Una vez obtenida la bombona de Carbógeno, este llegó sin manorreductor especial de bombona de Carbógeno, por lo que no se pudo disponer igualmente de él hasta que el personal de Air Liquide, después de otro mes, buscó encarecidamente la manera de ayudar proporcionando un manorreductor adecuado.

Indisposición de material volumétrico y quirúrgico

Dado que el laboratorio no es especializado en química ni biología se tuvo que pedir un presupuesto de todo el material básico de laboratorio necesario para llevar a cabo el proyecto con calidad. Después de unos meses de espera del presupuesto, la aprobación, la gestión y la llegada del material, al fin, se dispuso de casi todo el material necesario para continuar con fases más avanzadas del proyecto. Mientras tanto se estuvo dependiendo del dpto. de Química de la US.

Avería del BioCool (ventilador y agitador)

El BioCool sufrió una avería de hardware que dificultó enormemente el proyecto, ya que es el equipo eje de la vitrificación. Se tuvo que parar unas semanas porque el sistema de refrigeración del BioCool no funcionaba y se sobrecalentaba demasiado, y no había presupuesto suficiente para repararlo. Este problema se solucionó mediante la compra de dos grandes ventiladores que se dispusieron de forma que se creara un circuito de aire dentro del BioCool, y de esta manera se pudo seguir experimentando sin provocar la sobrecarga del equipo.

Indisposición de animales

La gestión de obtención de animales también llevó varios meses, ya que se necesitan muchos permisos para la experimentación animal y el proyecto no era estudiantil. La solicitud de suministro de animales también tardó meses en aprobarse, ya que todas las solicitudes de este tipo tienen que pasar por muchos departamentos para su aprobación. Finalmente se obtuvo el permiso de disponer de los animales sobrantes del IBIS dispuestos a sacrificio, aunque no se disponía, igualmente, de instalaciones para el almacenamiento en condiciones de los animales. Este problema se solucionó, finalmente y después de varias semanas más, por el ofrecimiento del Animalario del Hospital Virgen de la Macarena de Sevilla de mantener a los animales disponibles para el equipo en sus instalaciones. Mientras tanto no se dispuso de animales, o se dispuso en contadas ocasiones puntuales.

Indisposición de heparina

En los primeros meses tampoco se disponía de heparina y se hicieron los primeros experimentos sin ella. Esta es la razón por la que no se vitrificaron tantos corazones en los primeros ratones. El tutor del equipo fue quien proporcionó la heparina personalmente.

Intento de corte de rodajas de encéfalo mediante Chopper

Para el análisis tisular y aplicación de otros métodos de vitrificación, así como la aplicación del Array Microelectrodes (MEA) en rodajas de encéfalo, se diseñaron protocolos para llevar a cabo una fase más compleja del proyecto, concretamente la reproducción de un artículo científico de G. M. Fahy. El IBIS nos proporcionó un equipo para ello, el Chopper.

El Chopper es un equipo que dispone de una cuchilla muy afilada que corta automáticamente, en dirección vertical, al tejido biológico que se sitúa en la platina. Esta platina se va moviendo horizontalmente mientras la cuchilla corta en vertical. El grosor de las rodajas de tejido biológico es regulable, ya que se puede manipular la platina y cuchilla para que se muevan a la velocidad exacta para cortar las rodajas con el grosor programado, llegando a unos micrómetros de grosor.

Después de muchos intentos, finalmente no se logró hacer las rodajas de encéfalo debido a que este se encontraba en un estado demasiado gelatinoso. El método del corte de tejidos biológicos se aplica normalmente cuando estos pueden fijarse con parafina u otros fijados, o en tejidos congelados. En este caso no se podía aplicar ninguna de esas técnicas, ya que con la fijación el tejido no sobrevivía y, al ser un proyecto sobre la criopreservación, la cristalización del tejido antes del corte carecía de todo sentido.

Después de probar varias técnicas para intentar el corte, la textura y consistencia del órgano no permitió esta operación.



Fig. 74 Equipo Chopper para el corte de rodajas de encéfalo, proporcionado por el IBIS. Fuente: propia.



Fig. 74 Resultado del corte de encéfalo con la intención de hacer rodajas. Fuente: propia.

Anexo V. Programación

Códigos del ECG

Código de Arduino: ECG_read.ino



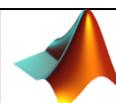
```
#define LOminus 12
#define LOplus 13
#define ECG A0
float t = 0.0;
void setup() {
  Serial.begin(9600);
  pinMode(LOminus, INPUT);
  pinMode(LOplus, INPUT);
}
void loop() {
  if ((digitalRead(LOminus) == 1) || (digitalRead(LOplus) == 1))
    Serial.println(1024/2);
  else
    //Serial.println("#"+String(t)+"#+analogRead(ECG)+"#");
    Serial.println(analogRead(ECG)); // borrar cuando funcione
  delay(1);
  t = millis();
}
```

Código de Python: ECG_guardar.py



```
import serial, time
from io import open
arduino_com = serial.Serial('COM15', 9600)
time.sleep(1)
count = 0;
while count < 5000:
  lecturas = arduino_com.readline()# readline sent by Arduino
  print(str(lecturas)+'\r\n')
  fichero_texto=open("ECG_nombre.txt","a")
  datosLista = str(lecturas).split('#')
  datosLista = datosLista[1:len(datosLista)-1]
  for dato in datosLista:
    fichero_texto.write(dato+'\t')
  fichero_texto.write("\n")
  cont+=1
  print(str(cont)+'\r\n')
  fichero_texto.close()
arduino_com.close()
```

Código de Matlab: ECGAnalysis.m



```
%% ===== Limpieza de workspace y consola
clc; clear all; close all;
```

```

% Carga de datos
datos = load('ECG_Enrique.txt');
t = datos(1:end,1)/1000;
ECG = datos(1:end,2); % en este archivo ECG vienen en uV
ECG = ECG./1000;
threshold = 0.6;
duracion = t(end); %seconds
%% Análisis frecuencial
n = length(ECG);
Fs = n / duracion;
T = 1/Fs;
ECG_fft = fftshift(fft(ECG));
f = (-n/2:n/2-1)*(Fs/n);
Potencia = abs(ECG_fft).^2/n;
% Finding R maxima
[pks, idx] = findpeaks(ECG);
for i=1:1:length(pks)
    if pks(i) > threshold
        loc(i) = idx(i);
    end
end
end
nzLoc = find(loc);
pks_loc = t(loc(nzLoc));
R_loc = ECG(loc(nzLoc));
% Mean magnitude of R peak
ECG_media = mean(ECG)
R_media = mean(R_loc)
R_media_magnitud = R_media - ECG_media
% Finding Heart Rate -- this will be done taking the points in time
for i=2:1:length(pks_loc)
    intervalo(i-1) = pks_loc(i)-pks_loc(i-1); % subtract the time between R peaks
end
intervalo_RR = mean(intervalo) % seconds / beat
pulsPorSeg = 1 / intervalo_RR;
% The approximated and real HR (RR interval)
PPM_calc = pulsPorSeg * 60 % in one minute
PPM_aprox = length(pks_loc) * 60 / duracion % based on number of peaks through the
recording
% Gráficas
figure;
hold on;
subplot(2,2,1:2);plot(t,ECG);grid;axis([0 10 0 0.95]); hold on;
xlabel('Tiempo (s)');ylabel('Señal cardíaca (mV)');title('ECG sujeto 2 - con pad');
plot(pks_loc,R_loc,'ro');
legend('ECG', 'Valores de R');
subplot(2,2,3);plot(t,ECG);grid; axis([2 3.8 0 0.95]);
xlabel('Tiempo (s)');ylabel('Señal cardíaca (mV)');title('ECG intervalo RR');
legend(['Frecuencia Cardíaca ' num2str(PPM_calc) ' PPM']);
subplot(2,2,4);plot(f,abs(ECG_fft));grid;
xlabel('Frecuencia (Hz)');ylabel('ECG FFT');title('ECG FFT on 0');

```

Todos los códigos de programación fueron realizados por el compañero de laboratorio e ingeniero Enrique Alcalá.

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

Anexo VI. Principios ético en investigación y docencia con modelos animales

La siguiente información proviene de la **Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio** y fue debidamente proporcionada por el Instituto de Investigación Biomédica de Sevilla (IBIS). Todos los procedimientos animales seguidos en este proyecto han seguido estos preceptos estrictamente.

1. Se debe evitar el uso de animales cuando exista un método alternativo que proporcione resultados satisfactorios.
2. El beneficio final del uso de animales de experimentación debe estar claramente definido en cada protocolo. La evaluación de la necesidad de su uso debe realizarse a través de un Comité Ético de Experimentación Animal.
3. Los ensayos que incluyan animales como modelo experimental deben realizarse en Establecimientos Usuarios registrados. Los animales deben proceder de Establecimientos de Cría registrados en aquellos casos en que así lo establezca la legislación vigente.
4. Las personas que tomen parte en los experimentos (diseño, manipulación, cuidados) deben tener formación específica en las ciencias del animal de laboratorio. Los animales estarán siempre bajo control veterinario.
5. En cada ensayo hay que utilizar el mínimo número de animales posible que garantice resultados estadísticamente fiables.
6. Los animales tienen que ser estabulados en jaulas y recintos apropiados, en espacios con condiciones ambientales estandarizadas y controladas. Igualmente debe estar garantizada la posibilidad de que los animales desarrollen los comportamientos propios de su especie siempre que las necesidades experimentales lo permitan.
7. Los ensayos deben realizarse con un grado de refinamiento que evite el dolor, sufrimiento o angustia de los animales. Se deben establecer criterios de punto final y pautas de anestesia y analgesia en función de la severidad de cada procedimiento.
8. Para la eutanasia, cuando sea necesario, se debe aplicar un método ético y científicamente aprobado que reduzca al máximo el dolor y el estrés en los animales.
9. Legislación básica actual: REAL DECRETO 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Anexo VII. Tratamiento de residuos químicos y biológicos

Residuos químicos

No se ha tratado con residuos químicos que necesiten un tratamiento especial, ya que todos los reactivos eran sales y DMSO. No se ha tratado con ácidos, bases, metales pesados o colorantes, por lo que los residuos han sido depositados en la red general de aguas residuales. El DMSO no apto para utilización se ha dispuesto en un contenedor aparte.

Residuos biológicos

El material utilizado para procedimientos biológicos fue debidamente desinfectado. Las agujas, jeringuillas y material desechable que hubiese entrado en contacto con sangre u otros fluidos o tejidos biológicos internos se depositaron en los contenedores especiales de residuos biológicos.

Los cadáveres de los ratones se envolvieron en papel de laboratorio, se dispusieron dentro de guantes cerrados y se congelaron para la posterior gestión de este tipo de residuos.