

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 265**

21 Número de solicitud: 201300685

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)

**A61B 6/03** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**18.07.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**18.02.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/000121**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)  
Pabellón de Brasil, Pº de las Delicias s/n  
41013 Sevilla ES**

72 Inventor/es:

**CORRAL SOUSA , Ariadna ;  
OLMO HERNÁNDEZ , Alberto ;  
BALCERZYK , Marcin ;  
REGALADO LAMPREA , David ;  
COBOS SABATÉ , Joaquín y  
RISCO DELGADO , Ramón**

54 Título: **Monitorización mediante TAC de procesos de preservación en frío y criopreservación de material biológico**

57 Resumen:

La invención objeto de la presente memoria se refiere al uso novedoso de la tomografía axial computarizada (TAC) para la monitorización de procesos de preservación en frío y criopreservación de material biológico. El uso del TAC permite mejorar significativamente dichos procesos debido a su capacidad de detección de la concentración de crioprotector en los procesos de criopreservación y detección de la formación de hielo en muestras biológicas.

La presente invención se enmarca dentro del sector de la investigación o análisis de materiales por determinación de sus propiedades químicas o físicas, y dentro de éste, es de interés tanto en la conservación convencional de alimentos, como en criopreservación de material biológico de todo tipo (tanto en congelación lenta, vitrificación rápida u otros).

ES 2 529 265 A1

## DESCRIPCIÓN

Monitorización mediante TAC de procesos de preservación en frío y criopreservación de material biológico

### 5 Objeto de la invención

La invención objeto de la presente memoria se refiere al uso novedoso de la tomografía axial computarizada (TAC) para la monitorización de procesos de preservación en frío y criopreservación de material biológico. El uso del TAC permite mejorar significativamente dichos procesos debido a su capacidad de  
10 detección de la concentración de crioprotector en los procesos de criopreservación y detección de la formación de hielo en muestras biológicas.

La presente invención se enmarca dentro del sector de la investigación o análisis de materiales por determinación de sus propiedades químicas o físicas, y dentro de éste, es de interés tanto en la conservación convencional de alimentos, como  
15 en criopreservación de material biológico de todo tipo (tanto en congelación lenta, vitrificación rápida u otros).

### Estado de la técnica

El almacenamiento de material biológico (células, tejidos, etc.) juega un papel  
20 esencial dentro de muchas parcelas de la actividad humana: agricultura (semillas) y ganadería (semen), trasplantes (piel, córneas, huesos, válvulas, órganos), injertos, tejidos artificiales, sangre, medicamentos, material reproductor en casos de infertilidad, alimentos, etc. Las principales técnicas empleadas para conseguir la conservación del material biológico se basan en la utilización de bajas  
25 temperaturas para ralentizar y detener las reacciones químicas responsables del envejecimiento y deterioro celular.

El almacenamiento a largo plazo requiere de muy bajas temperaturas, típicamente entre  $-140^{\circ}\text{C}$  y  $-180^{\circ}\text{C}$ . La aparición de hielo durante la preservación y  
30 criopreservación es un problema, ya sea intracelular, causando daños irreparables en los distintos orgánulos celulares, o extra-celular, rompiendo y desestructurando el tejido u órgano en cuestión. Para evitar la formación de hielo suelen utilizarse los agentes crioprotectores, aunque una concentración elevada de éstos supone un problema igualmente grave para la supervivencia celular.

35

En el caso de células aisladas, existen dos técnicas que consiguen la criopreservación de forma satisfactoria: el enfriamiento lento y la vitrificación. El enfriamiento lento es hasta ahora el procedimiento más usado. Se basa en el control de la tasa de enfriamiento, y por tanto del ritmo de crecimiento de hielo extracelular con el objetivo de crear un delicado equilibrio entre los distintos factores que causan daño celular, entre los que se encuentran la formación de hielo intracelular, fracturas y una excesiva deshidratación de la célula. La vitrificación es un proceso mediante el cual un líquido se solidifica en una fase no cristalina (fase vítrea) con un rápido descenso de la temperatura y un aumento en la viscosidad. La vitrificación elimina completamente la formación de cristales de hielo, mejorando en gran medida los resultados obtenidos por el enfriamiento lento para determinados tipos celulares difíciles de criopreservar.

En lo que se refiere a la conservación de tejidos y órganos, los principios de conservación en frío son los mismos que los aplicables al caso de células aisladas. Sin embargo, aquí el problema es mucho más complejo, debido sobre todo al mayor tamaño de la muestra, lo que dificulta la transferencia de masa (crioprotector) y calor (frío).

En 1957 se perfunde por primera vez un órgano de mamífero con glicerol, enfriado y preservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , en un trabajo publicado por Audrey Smith (A. Smith, 1957) [1]. En estos experimentos pioneros un corazón de hámster fue perfundido con 2M de glicerol y expuesto a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Tras el recalentamiento y lavado del crioprotector, algunas contracciones débiles podían apreciarse en el órgano, pero el funcionamiento de éste estaba todavía bastante lejos del deseado.

En el año 1965, Farrant y Huggins [2], ambos de manera independiente, idearon un nuevo camino hacia la criopreservación de órganos que involucraba una fuerte supresión o incluso total eliminación de la formación de hielo, sin la necesidad de un enfriamiento rápido. El método de Farrant consistía en ir aumentando la concentración del agente crioprotector a la vez que enfriando en múltiples pasos, de manera que la muestra siempre estuviera sobre la curva del punto de fusión del diagrama de fases ternario del sistema DMSO-agua-NaCl. En sus experimentos Farrant utilizó tejido de músculo liso de útero de conejo. Las muestras fueron almacenadas a  $-79^{\circ}\text{C}$  utilizando DMSO como agente crioprotector. La adición de las soluciones crioprotectoras durante el enfriamiento y calentamiento fueron

llevadas a cabo por pasos. Tras la recuperación de las muestras observó que no sólo se había evitado la formación de hielo sino que se obtenía una funcionalidad del músculo mucho mayor que las enfriadas por el método de enfriamiento lento.

5 En 1970, en colaboración con Farrant, el equipo de Mill Hill en Londres, y Adem y Harness construyeron el primer equipo capaz de perfundir un órgano entero con un agente crioprotector y eliminarlo posteriormente de una forma adecuada y bien documentada. Aún así, para un sistema ternario DMSO-agua-NaCl, el método de Farrant resultaba de difícil manejo experimental, debido al cuidado que se requiere  
10 en el diagrama de fases, ya que las perturbaciones debidas al cambio de condiciones de contorno en concentración y temperatura pueden llevar a una desviación significativa de la curva del punto de fusión.

No obstante, el grupo del profesor David E. Pegg en la Universidad de York ha  
15 mejorado este método, obteniendo un mejor control y estudiando las distintas tolerancias a las que un órgano puede prestarse ante un daño osmótico debido al crioprotector. El trabajo presentado por Pegg en 2006 (Pegg 2006) [3,4,5] obtuvo excelentes resultados en criopreservación de cartílago con el método llamado Liquidus-Tracking. El objetivo de éste era seguir apropiadamente la curva de  
20 líquido del sistema DMSO-agua-NaCl con un aumento continuo de la concentración al mismo tiempo que disminuía la temperatura. Esto ha conducido a un mejor entendimiento del concepto de vitrificación de un órgano, o preservación libre de hielo en un estado amorfo. Para incrementar la concentración de crioprotector utilizaba dos bombas (una para el medio isotónico y otra para el  
25 crioprotector) conectadas a un intercambiador de calor dentro de la máquina de enfriamiento. El programa de control estaba basado en experimentos previos, donde termopares y un conductivímetro eran empleados para medir la temperatura y concentración de crioprotector respectivamente. En estos experimentos el conductivímetro medía sólo la concentración del flujo de perfusión  
30 residual, y no la concentración de crioprotector dentro del material biológico, lo cual supondría una necesaria y crucial mejora del método.

Por otra parte, en 1998 Gregory Fahy empezó a estudiar cómo obtener mejoras en  
35 el control de la toxicidad de los crioprotectores y del proceso de nucleación y del crecimiento de cristales de hielo. Sus estudios se basan en la tolerancia de las muestras de distintas mezclas de crioprotectores perfundidas a distintas

temperaturas, siempre probando la toxicidad en riñones de conejo. Una de sus soluciones vitrificantes con mejores resultados es la denominada M22, donde el número hace referencia a la conveniencia de incubar los riñones con esta solución a -22°C (Fahy *et al.*, 2004) [6]. En un reciente trabajo (Fahy *et al.* 2009) [7], Fahy  
5 presentó los resultados de un riñón de conejo vitrificado que fue posteriormente trasplantado sin presentar rechazo alguno y con evidencias de funcionalidad.

En cualquier caso, ya sea con la utilización de los crioprotectores presentados por Fahy, con el método de Liquidus-Tracking de Pegg, o como parte de otros  
10 protocolos de criopreservación, conocer la concentración de crioprotector durante el proceso de enfriamiento es muy importante, ya que nos proporciona información fundamental para optimizar dichos protocolos, ajustando los tiempos de perfusión y minimizando de esta forma tanto la toxicidad causada por el crioprotector como la posibilidad de formación de hielo. De igual forma, obtener información acerca de  
15 la eventual formación de hielo en el órgano es fundamental, al ser los daños producidos por éste uno de los mayores problemas a solucionar para conseguir la correcta criopreservación (Pegg 2006) [3,4,5].

Diferentes métodos han sido desarrollados con el fin de poder monitorizar la  
20 concentración de crioprotector junto a la temperatura. Dr. Pegg, en su trabajo de criopreservación de cartilago, comenzó midiendo la concentración de crioprotector basándose en el trabajo de Elford de 1969 [8], que muestra que cuando una pieza de tejido es sumergida en una solución de crioprotector, los tiempos de cambio de peso sumergido pueden ser usados para monitorizar el proceso de permeación de  
25 crioprotector en el tejido.

En 2007, Dr. Pegg (Pegg 2007) [9] mejoró su medida de crioprotector mediante volumetría y cromatografía. Para determinar el contenido de agua usó la reacción de Karl Fischer (KF). Colocaba el tejido en un exceso de reactivo KF y, una vez  
30 que toda el agua había reaccionado, el exceso era valorado con una solución conocida de agua en metanol. Cada día estandarizaba el sistema añadiendo una cantidad conocida de agua, sobre 10 mg, al mismo volumen de reactivo de KF. El contenido de DMSO se medía mediante HPLC (High Pressure Liquid Chromatography). Los datos eran expresados en términos del peso de tejido y la  
35 concentración del CPA venía dada por la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{peso.normalizado.Me}_2\text{SOx100}}{\text{peso.normalizado.agua} + \text{peso.normalizado.Me}_2\text{SO}} \%w/w$$

5 Fuller (Fuller, Busza and Proctor 1989) [10] utilizó técnicas de resonancia nuclear magnética (NMR) para la medida de concentración de crioprotector en hígado de rata y Taylor y Busza (1992) [11] para la medida en córnea. Poco después, en 1994, Bateson [12] y su grupo usaron el NMR para medir la concentración de DMSO al penetrar en la arteria carótida de un conejo.

10

Este método ha sido también utilizado con otros crioprotectores, por ejemplo por Po-Wah y Fuller en 2001 (Fuller, Takahashi and Hurrell 2001) [13] para determinar la difusión de solutos en hígado de rata durante almacenamiento hipotérmico (histidina y carnosina). Los protones aromáticos de la histidina y las frecuencias de resonancia del grupo histidilo de la carnosina eran observados en el espectro. La integración de las resonancias permitía establecer la cantidad de soluto presente en la muestra, aunque el principal inconveniente del NMR protónico está en su relativamente baja precisión, ya que los errores son del mismo orden de magnitud que las medidas.

20

Los métodos anteriormente descritos sólo dan una idea global sobre la cantidad de crioprotector que ha entrado en la muestra, pero no dan ninguna información sobre la distribución de este crioprotector dentro del tejido. Esta información es fundamental, puesto que podría haber regiones del tejido cargadas con un exceso de crioprotector, mientras que otras podrían estar cargadas con una concentración insuficiente. Por tanto, ninguno de estos métodos descritos hasta ahora alcanza la precisión necesaria para un control de la concentración del crioprotector requerido para una vitrificación con éxito. El proceso de la eventual formación de hielo tampoco ha sido medido hasta ahora con precisión en el interior de órganos, reduciéndose esta medida a inspecciones visuales a posteriori y poco cuantitativas.

30

#### DOCUMENTOS RELEVANTES

35 [1] A.U. Smith, *Proceedings of the Royal Society Series B* 147 (1957) 533–544.

- [2] J. Farrant, *Nature* 205 (1965) 1284-1287.
- [3] D.E. Pegg, M.C. Wusteman, L. Wang, *Cryobiology* 52 (2006) 335-346.
- [4] D.E. Pegg et al, *Cryobiology* 52 (2006) 347-359.
- [5] D.E. Pegg, L. Wang, D. Vaughan, *Cryobiology* 52 (2006) 360-368.
- 5 [6] G.M. Fahy et al, *Cryobiology* 48 (2004) 157.
- [7] G.M. Fahy et al, *Organogénesis* 5:3 (2009) 167-175.
- [8] B.C. Elford et al, *Nature New Biology* 236 (1972) 58.
- [9] D.E. Pegg et al, *Cryobiology* (2007) 55: 138-147.
- 10 [10] B.J. Fuller, A.L. Busza and E. Proctor, *Cryobiology* 26 (1989) 112.
- [11] M.J. Taylor and A.L. Busza, *Cryo-Lett.* 13 (1992) 273.
- [12] E.A. Bateson et al, *Cryobiology* 31, (1994) 393.
- [13] P. Wah and B.J. Fuller, *Cryobiology* 42 (2001) 307-313.
- 15 [14] National Institute of Standards and Technology:  
<http://physics.nist.gov/PhysRefData/Xcom/html/xcom1.html>

20 **Descripción del contenido de las figuras**

**Figura 1.** En esta gráfica se muestra la atenuación de masa ( $\text{cm}^2/\text{g}$ ) en el eje de ordenadas para una solución 50% v/v de DMSO en PBS debido a los diferentes tipo de scattering (Fotoeléctrico, Rayleigh y Compton) y debido a la suma de todos los efectos (Total), en función de la energía utilizada en KeV (eje de abscisas). En el caso de la energía característica de nuestros experimentos, en torno a 20 KeV, la primera curva (de mayor coeficiente de atenuación de masa) corresponde al total de todos los efectos, muy seguido del scattering correspondiente al efecto fotoeléctrico, siendo éste el efecto con más relevancia en el caso de las energías utilizadas en nuestro TAC.

25

30

**Figura 2.** Representación en escala logarítmica (Figura 2 a) y en escala lineal (Figura 2 b) de la atenuación de masa ( $\text{cm}^2/\text{g}$ ) respecto a la energía (KeV) para distintas soluciones: 5% v/v y 70% v/v de DMSO en PBS, 5% v/v y 70% v/v de Glicerol en PBS, 5% v/v y 70% v/v de Etilenglicol en PBS, y agua pura ( $\text{H}_2\text{O}$ ). En el rango de energías correspondiente a nuestros experimentos, en torno a 20 KeV,

35

se observa una mayor atenuación de masas para el caso de la solución 70% v/v de DMSO, seguida de la solución 5% v/v de DMSO. Para el resto de las soluciones la atenuación es del mismo orden que la atenuación de masa debido al H<sub>2</sub>O. Ambas gráficas muestran la influencia del átomo de azufre del DMSO en la atenuación de los rayos X. Las curvas para el glicerol 5% y el etilenglicol 5% se solapan. También las curvas para el glicerol 70% y el etilenglicol 70% se solapan. Por ello resultan difíciles de distinguir en la figura.

**Figura 3.** Valores de TAC en unidades Hounsefields (HU) obtenidos para las siguientes soluciones, de izquierda a derecha: PBS, 2, 4, 6 y 8 M de DMSO en PBS. El eje x representa la distancia en mm del corte a lo largo del eje z de la camilla del TAC donde están dispuestas las muestras. La gráfica muestra unos valores de TAC crecientes para mayores concentraciones de DMSO.

**Figura 4.** Valores de TAC (HU) obtenidos para soluciones, de derecha a izquierda, de PBS, 1, 3, 5 y 7 M de DMSO en PBS. El eje x muestra la distancia en mm del corte a lo largo del eje z de la camilla del TAC donde están colocadas las muestras. La gráfica vuelve a mostrar valores de TAC más elevados para mayores concentraciones de crioprotector (DMSO).

**Figura 5.** Representación del nº de píxeles (esferas de 2 cm de diámetro) que tienen el mismo valor de TAC (eje de ordenadas) para cada una de las concentraciones PBS, 10% v/v, 20%v/v... hasta 80%v/v de DMSO en PBS. El eje de abscisas muestra el valor de TAC para las distintas soluciones desde la curva de PBS (menor valor de TAC) hasta la de 80%v/v DMSO (mayor valor de TAC). Esta gráfica muestra además la dispersión de los datos, siendo mayor en las soluciones de mayor concentración de crioprotector (curva de más anchura).

**Figura 6.** Representación del número de píxeles (esferas de 2 cm de diámetro) que tienen el mismo valor de TAC para tres soluciones distintas de PBS. La gráfica muestra como para la misma solución las curvas tienen la misma forma y se mantienen entre los mismos valores de TAC, reflejando la reproducibilidad del TAC como método de medida.

**Figura 7.** Representación de la curva de calibración que relaciona la concentración de DMSO (M) frente al valor de TAC calculada a partir de los resultados de los experimentos previos (figura 3 y figura 4). La gráfica muestra una

linealidad entre la concentración del crioprotector y las señales obtenidas en el TAC con un coeficiente de correlación de  $r = 0,990$ . Esta curva permite calcular la concentración de crioprotector para cualquier muestra de concentración desconocida a partir de una medida de TAC sobre la muestra con los correspondientes valores de TAC obtenidos en la medida.

### Descripción de la invención

Se ha desarrollado un sistema basado en la tomografía axial computarizada (TAC) para la detección de hielo dentro del material biológico, así como para la medida de la concentración de crioprotector perfundido en los procesos de criopreservación en tiempo real.

Convencionalmente la tomografía axial computarizada es una técnica de imagen médica que utiliza radiación X para obtener proyecciones o secciones de objetos anatómicos con fines diagnósticos. Los rayos X son la radiación del espectro electromagnético comprendido en el rango aproximado de  $3 \times 10^{16}$  Hz a  $3 \times 10^{19}$  Hz (i.e., energías de entre 120 eV y 120 keV). A partir de 12 keV la capacidad de penetración de esta radiación los hacen adecuados para el estudio de tejidos vivos. El TAC está basado en la medida de la pérdida de intensidad de rayos X a través de distintas direcciones en el objeto, lo que permite reconstruir el factor de atenuación tridimensionalmente en todo el volumen a partir de técnicas de reconstrucción. Dicho factor de atenuación permite discernir qué tipo de material existe en cada punto. Las señales del TAC reflejan la atenuación de las sustancias y se expresan en unidades Hounsefields (HU). Se toma como referencia la densidad del agua o valor de TAC, obteniendo cada pixel un valor determinado (HU) que se corresponde con un color en la escala de grises (de blanco a negro),.

El uso novedoso del TAC para la caracterización de la concentración de crioprotector y detección de hielo dentro de material biológico se describe a continuación. Cuando un haz de rayos X incide en un objeto, a una distancia  $d$ , la intensidad del haz se ha reducido de la manera:

$$I = I_0 \exp(-\mu d) = I_0 \exp(-(\mu/\rho) \rho d),$$

donde  $I_0$  es la intensidad del haz a la entrada,  $\mu$  es una característica del material denominada atenuación, y  $\rho$  es la densidad (máscica) del material. La constante  $\mu/\rho$  se denomina atenuación de masa del material. Esta atenuación puede deberse

a distintos procesos físicos, siendo los principales la atenuación coherente (Rayleigh), la atenuación incoherente (Compton), el efecto fotoeléctrico, la producción de pares y el efecto fotonuclear. La importancia relativa de cada uno de estos procesos viene dada por la sección eficaz y depende de la energía de trabajo. La producción por pares sólo se produce a partir de energías de 1.022 MeV, y el efecto fotonuclear sólo se da a energías mayores de 5 MeV. A energías en torno a los 65 keV, el efecto predominante es el fotoeléctrico, como puede apreciarse en la figura 1.

Aunque las densidades de los distintos crioprotectores son similares entre sí y a la del agua (la sección eficaz del efecto Compton depende básicamente de la densidad), la sección eficaz del efecto fotoeléctrico tiene una dependencia de  $Z^\alpha$ , con  $Z$  el número atómico y  $\alpha$  un número entre 4 y 4,8. De esta manera, la presencia del átomo de azufre ( $Z=16$ ) en el caso del DMSO (uno de los crioprotectores más importantes y más extensamente usados) aumenta la atenuación de masa sensiblemente, como se puede observar en la figura 2, calculada a partir de los datos de XCOM [14]. Esto consigue que las diferencias de concentraciones del crioprotector pueden ser distinguidas con un aparato TAC, lo cual es de gran interés pues garantiza la correcta perfusión de crioprotector, protegiendo el sistema tanto de la indeseable formación de hielo, como del exceso de crioprotector y su daño por toxicidad.

De igual forma, es posible utilizar el aparato de TAC para conocer la posible existencia de hielo y su exacta localización dentro del material biológico, para de esta forma diseñar protocolos de criopreservación que consigan evitar correctamente esta formación de cristales de hielo, o, en su caso, la posibilidad de controlar el daño provocado por el hielo en otro tipo de aplicaciones.

La posibilidad de detectar la presencia de hielo radica en la posibilidad de distinguir con TAC el hielo (agua pura) en un órgano cargado a una cierta concentración de crioprotector. En la figura 2 se observa igualmente la diferencia obtenida entre el agua pura y las distintas concentraciones de crioprotectores. Ya que el hielo es agua pura, la cual vemos que tiene una señal mucho menor que cualquier concentración de DMSO. Los cristales de hielos con tamaños mayores que la mínima resolución del TAC utilizado pueden ser detectados con esta técnica.

35

En los siguientes ejemplos se muestran distintos experimentos concretos realizados con un micro-TAC, un crioprotector específico (DMSO) y muestras biológicas concretas (riñones de conejo) para caracterizar la concentración de crioprotector y detectar la presencia de hielo.

5

### **Modo de realización de la invención**

#### *Ejemplo 1. Caracterización de la concentración de crioprotector DMSO*

Este ejemplo muestra la aplicación práctica del método para la caracterización de distintas concentraciones de un determinado tipo de crioprotector, DMSO, y de la medida de concentración de éste en el interior de riñones de conejo.

10

#### Medida de la concentración de DMSO en soluciones acuosas

Para los primeros experimentos se prepararon diez tubos Eppendorf (V=2mL) cuyos contenidos eran:

15

- 1 Eppendorf con agua destilada,
- 1 Eppendorf con PBS,
- 8 Eppendorfs con DMSO en PBS en concentraciones desde 1M, 2M... hasta 8M.

20

Los parámetros de adquisición de datos utilizados en el TAC fueron los siguientes:

25

1. Fuente de rayos X: 65 kV
2. 180 proyecciones alrededor de 360°
3. Resolución espacial: 200 micras
4. Tiempo de exposición: 1500 ms

30

En la figura 3 se representan los valores de densidad TAC (HU) para las siguientes soluciones, de izquierda a derecha: PBS, 2M, 4M, 6M, 8M. Puede verse como la atenuación va aumentando a medida que aumenta la concentración del crioprotector. Las mismas medidas fueron realizadas esta vez para las soluciones de PBS y 1M, 3M, 5M y 7M de DMSO, obteniéndose la imagen que se muestra en la figura 4.

35

Una vez obtenidas las señales para cada concentración el siguiente paso consistió en obtener una curva de calibración que relacione estas señales con la concentración a la que corresponden. En la figura 5 se ha representado, para cada una de las soluciones (PBS, 10%v/v, 20%v/v...80%v/v DMSO), la señal en

unidades de TAC (HU) frente al número de píxeles que tienen un determinado valor TAC. Cada píxel tiene un tamaño de  $0.2 \times 0.2 \times 0.2 \text{ mm}^3$ . La figura 5 nos muestra, una vez más, de que las diferencias en las concentraciones pueden ser apreciadas con precisión adecuada.

5

La misma representación del número de píxeles con el mismo valor TAC se hace en la siguiente gráfica (figura 6) pero esta vez para tres medidas distintas de la misma solución (PBS). Esto demuestra la reproducibilidad de las medidas y la fiabilidad del método, ya que para las tres medidas las curvas obtienen unos valores similares.

10

En la figura 7 se obtiene la curva de calibración que representa la concentración molar de DMSO (M) frente al valor TAC obtenido por el micro-TAC (HU). Como se ve en la gráfica, la señal de TAC obtenida es proporcional a la concentración, como muestra su coeficiente de regresión ( $R^2$ ). Con esta gráfica podemos conocer la concentración de crioprotector en cada momento conociendo la señal de la medida TAC.

15

#### Medida de la concentración de DMSO en riñón.

20

Los pasos que se llevan a cabo para realizar este experimento son los siguientes

- Se procede al llenado de un 20% v/v de DMSO del sistema de perfusión, es decir los tubos y el contenedor que contendrá el riñón (reactor).
- Se realiza la extracción del riñón del conejo.
- Se extrae toda la sangre del sistema vascular del riñón mediante perfusión con PBS a  $4^\circ\text{C}$ .
- Se introduce el riñón en un contenedor con PBS y se transporta en una nevera con hielo hasta el lugar del micro-TAC.
- Se introduce el riñón en el reactor.
- Se procede a la perfusión del riñón. Para ello se programa una perfusión lineal de 2 horas desde 20 %v/v DMSO hasta 70% v/v DMSO siempre a temperatura ambiente.
- Se realizan 3 medidas en el micro-TAC. La primera al inicio de la perfusión, la segunda transcurrida una hora de perfusión, y la última al

25

30

35

final de la perfusión.

Los parámetros de adquisición de datos utilizados en el TAC fueron los siguientes:

1. Fuente de rayos X: 65 kV
2. 360 proyecciones alrededor de 360°
- 5 3. Resolución espacial: 200 micras
4. Tiempo de exposición: 1500 ms

Las imágenes obtenidas muestran claramente la medida de la concentración de crioprotector en el interior del riñón.

10

*Ejemplo 2. Detección de hielo*

Para los experimentos se introdujo una pieza de hielo, de dimensiones 2x2x2,5 cm<sup>3</sup>, en un reactor con solución al 50% v/v de DMSO.

15

Los parámetros de adquisición de datos utilizados en el TAC fueron:

1. Fuente de rayos X: 65 kV
2. 360 proyecciones alrededor de 360°
3. Resolución espacial: 200 micras
- 20 4. Tiempo de exposición: 1500 ms

El hielo aparece en un color amarillo verdoso mientras la solución aparece en un color rojizo, diferenciándose de forma clara. Esto nos permite detectar la formación de hielo durante el proceso de enfriamiento, y así crear un perfil adecuado de temperatura en un tiempo que permita equilibrar nuestro órgano con la concentración adecuada para cada temperatura.

30

35

**REIVINDICACIONES**

- 5
1. Monitorización de procesos de preservación en frío y criopreservación de material biológico, caracterizado porque la presencia de hielo y la concentración de dimetil sulfóxido como crioprotector son detectadas con un micro-TAC.
- 10
2. Monitorización de procesos de preservación en frío y criopreservación según la reivindicación 1, basado en la medida de la pérdida de intensidad de rayos X a través de distintas direcciones en el objeto, por lo que el factor de atenuación permite determinar la concentración de crioprotector en el material biológico.
- 15
3. Procedimiento de monitorización de procesos de preservación en frío y criopreservación según reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la fuente de rayos X tiene un voltaje de aceleración bajo, desde 45 hasta 75 kV, usando preferentemente 65 o 75 kV, en el que se realizan 360 proyecciones de rayos X alrededor de 360°, con un tiempo de exposición de entre 500 y 1500 ms y una resolución espacial de 200 micras, pudiendo aumentarse la resolución hasta 100 y 50 micras.
- 20
- 25
4. Monitorización de procesos de preservación en frío y criopreservación de material biológico, según las reivindicaciones 1, 2 y 3, caracterizado por el uso de dimetil sulfóxido como agente crioprotector.

30

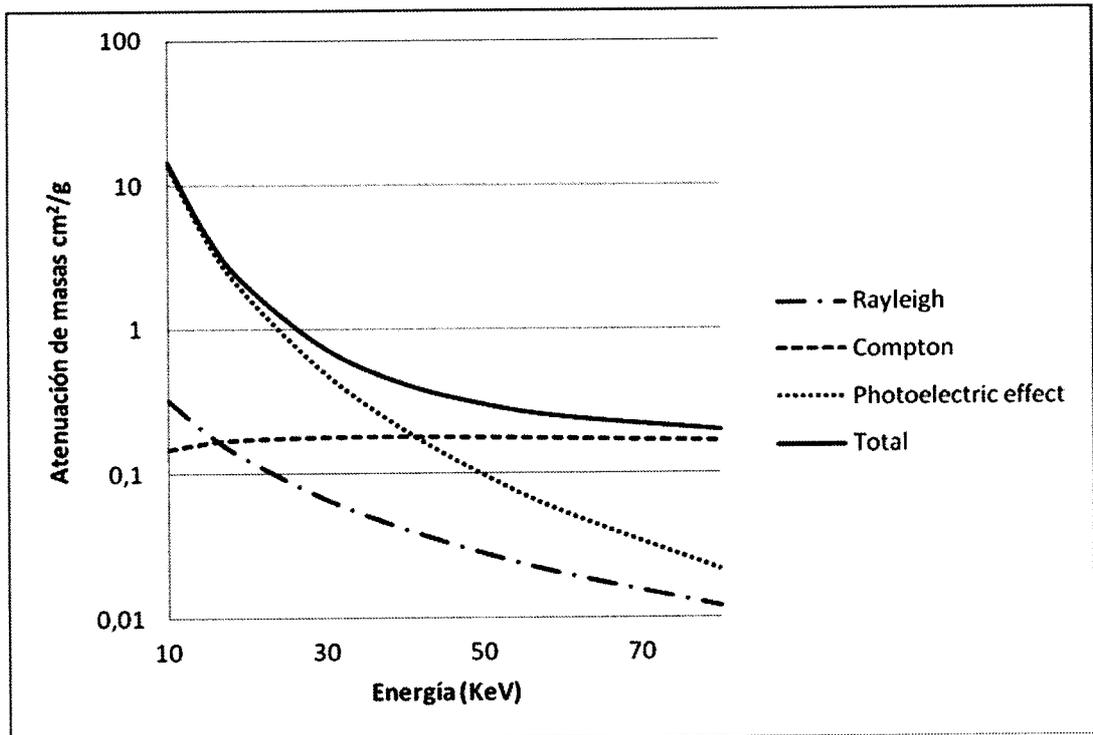


Figura 1

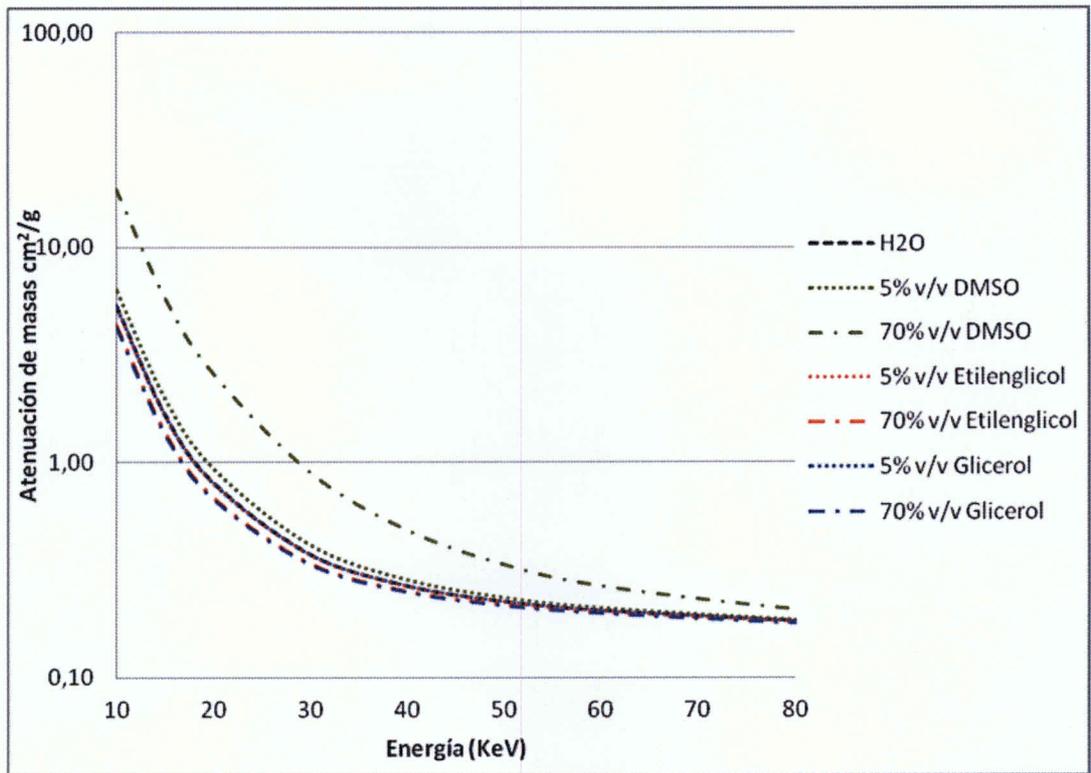


Figura 2 a

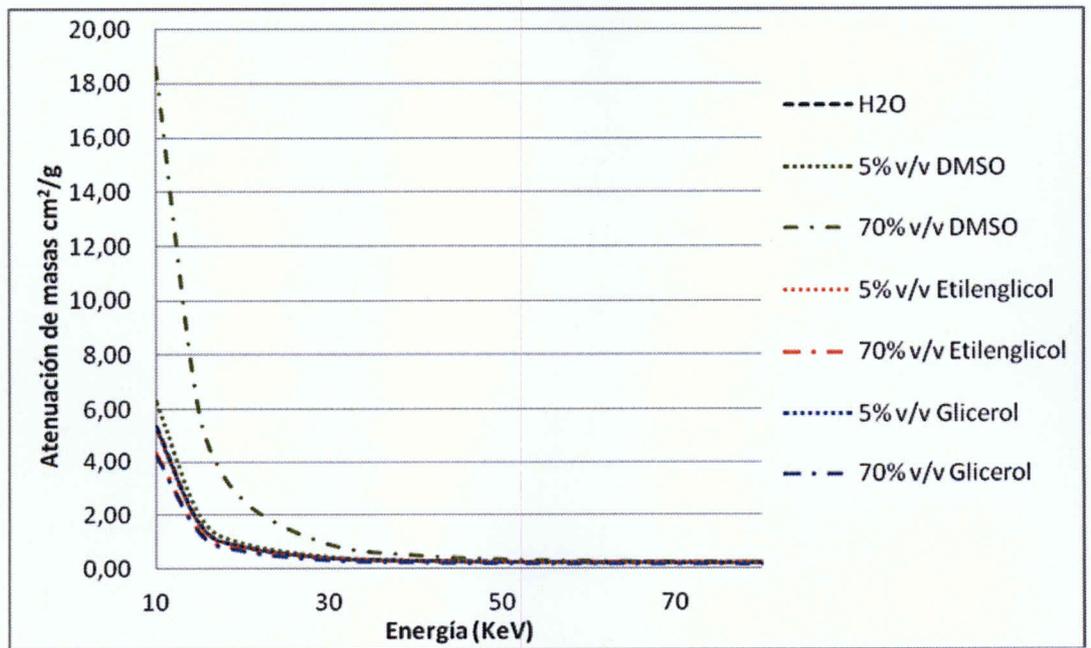


Figura 2 b

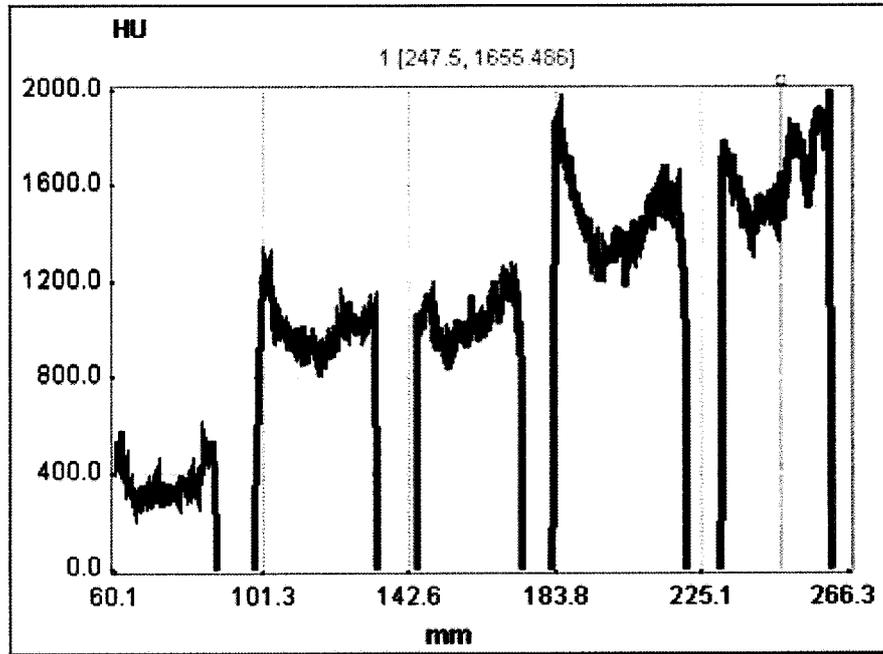


Figura 3

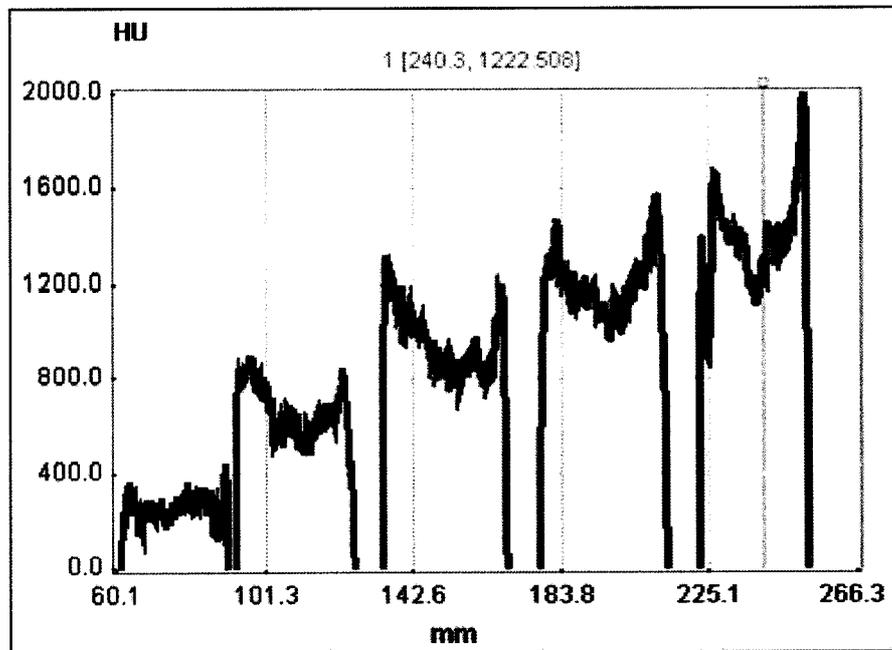


Figura 4

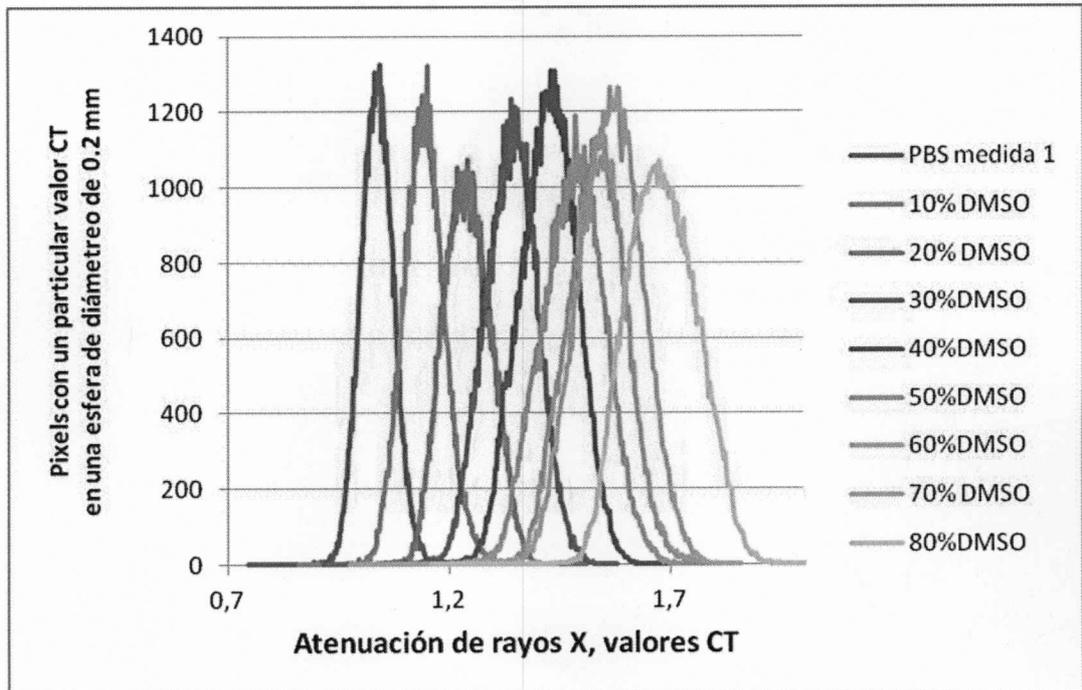


Figura 5

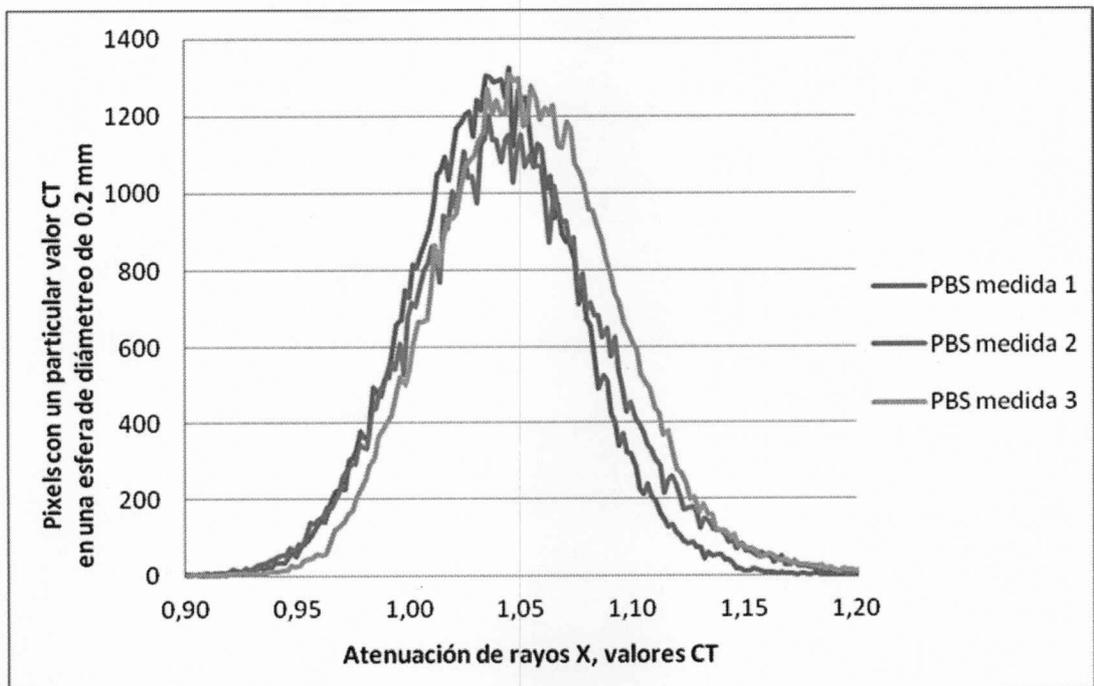


Figura 6

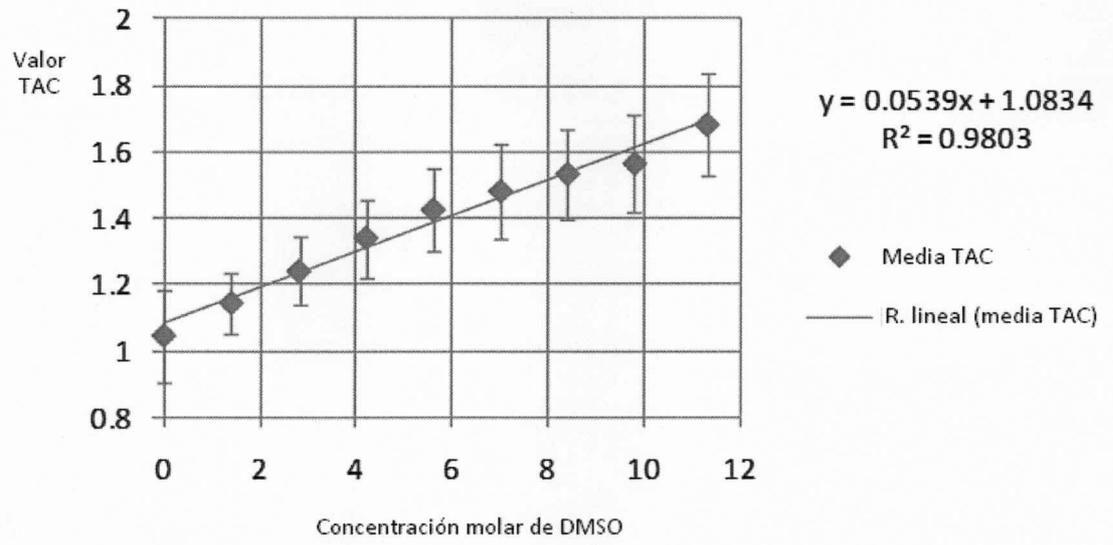


Figura 7