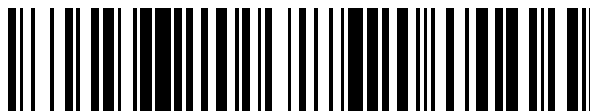


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 102**

21 Número de solicitud: 201400908

51 Int. Cl.:

A01N 1/00 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

13.11.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.05.2016

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)
Secretariado de Transferencia de Conocimiento y
Emprendimiento. Pabellón de Brasil, Paseo de
las Delicias s/n
41013 Sevilla ES

72 Inventor/es:

RISCO DELGADO , Ramón ;
BARRANCO ÁLVAREZ, Daniel;
CABO RUIZ, Verónica y
CORRAL SOUSA , Ariadna

54 Título: **Procedimiento para la conservación de Caenorhabditis elegans en estado adulto mediante vitrificación utilizando velocidades de enfriamiento ultrarrápidas y bajas concentraciones de crioprotector**

57 Resumen:

La presente invención tiene como objeto un procedimiento para la conservación de *Caenorhabditis elegans* en estado adulto mediante vitrificación utilizando velocidades de enfriamiento ultrarrápidas y bajas concentraciones de crioprotector, de aplicación a todos los estados de desarrollo del nematodo, así como a diferentes sistemas vivos con características similares, como células aisladas, fragmentos de tejidos, órganos y otros organismos. Está basado en la vitrificación, utilizando velocidades de enfriamiento ultra-rápidas y bajas concentraciones de crioprotector, evitando daños celulares por toxicidad y formación de hielo.

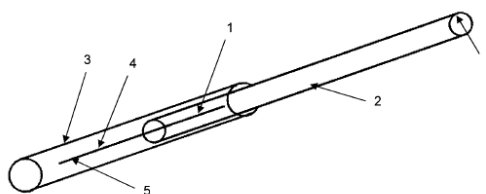


Figura 1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la conservación de *Caenorhabditis elegans* en estado adulto mediante vitrificación utilizando velocidades de enfriamiento ultrarrápidas y bajas concentraciones de crioprotector.

Objeto de la invención

La presente invención tiene por objeto ofrecer un procedimiento eficaz para la criopreservación de *Caenorhabditis elegans*, en estado adulto, ante la inexistencia de un método actual. Este procedimiento es de aplicación a todos los estados de desarrollo del nematodo, así como a diferentes sistemas vivos con características similares, como células aisladas, fragmentos de tejidos, órganos y otros organismos. Está basado en la vitrificación, utilizando velocidades de enfriamiento ultra-rápidas y bajas concentraciones de crioprotector, evitando daños celulares por toxicidad y formación de hielo.

La invención aquí descrita se ubica dentro del área de la biotecnología, y se sitúa dentro del sector de la criopreservación de sistemas biológicos, permitiendo la conservación y almacenamiento durante tiempo indefinido. Se trata de un método de preservación de muestras biológicas a muy baja temperatura, aplicado a *Caenorhabditis elegans* en fase adulta, que permite mantener al nematodo en perfectas condiciones de almacenamiento sin afectar a su viabilidad futura.

Estado de la técnica

La criopreservación es el proceso por el cual sistemas biológicos, como células, tejidos u organismos, son conservados a muy baja temperatura (entre -80 y -196°C) disminuyendo de esa forma todas las funciones vitales de dicho sistema. A esas temperaturas la actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que desencadenan la muerte celular, se detienen [1]. Hoy en día se utilizan principalmente dos métodos, bien diferenciados, para la conservación de células u organismos que son el enfriamiento lento y la vitrificación. Una de las principales diferencias que existen entre ambos métodos radica en la formación o no de hielo extracelular [2, 3].

En el caso de la conservación de *C. elegans*, el único método conocido hasta la fecha se basa en la técnica de enfriamiento lento. En este método, la velocidad de enfriamiento es baja, situándose entre 0.5 y 1° C/minuto durante 12 horas aproximadamente hasta alcanzar los -80°C. Una vez llegada a esta temperatura se puede transferir a un sistema de frío mantenido por nitrógeno líquido (-196°C), conservándose la muestra de este modo por un período de tiempo indefinido [4]. Al descender la temperatura lentamente para preservar la muestra, primero comienza la formación de hielo en el medio extracelular, lo cual produce una disminución en la cantidad de agua en dicha área, generando la salida de agua desde el interior celular por ósmosis. Esto hace que las células queden más concentradas en sales, provocando un descenso crioscópico de la muestra. La necesaria formación de hielo extracelular, que es un elemento imprescindible de esta técnica, tiene también una importante desventaja; y es que el hielo al crecer ejerce una presión contra el material biológico que puede llegar a dañarlo irreversiblemente. Este fenómeno puede ser un problema no muy grave en el caso de conservación de células aisladas, ya que debido a su pequeño tamaño (por lo general entre 10-100 µm) pueden realojarse en los huecos que se forman entre los cristales de hielo; pero supone un gravísimo problema en el caso de muestras de mayor tamaño (tejidos, órganos y organismos). En este último

caso, los cristales de hielo formados actúan como cuchillas, rompiendo el material biológico a conservar, manifestándose en una relación inversa entre la tasa de supervivencia y el tamaño de la muestra [1, 5].

- 5 Para evitar la formación de hielo intracelular es común la adición de unas sustancias químicas llamadas crioprotectores, las cuales disminuyen el punto eutéctico de las muestras. En el método del enfriamiento lento, la función del crioprotector es disminuir la proporción de hielo en el medio extracelular e impedir su formación en el interior durante el descenso de la temperatura, llegando a penetrar con ese fin, en el interior de la célula.
- 10 La deshidratación de la célula y la entrada de los crioprotectores conllevan un aumento en la concentración intracelular de crioprotector, lo cual evita la formación de hielo intracelular. Sin embargo, estos crioprotectores pueden resultar tóxicos para las células cuando la concentración requerida es muy elevada [6, 7]. En la mayoría de los casos, este aumento en la concentración de crioprotector provoca daños de forma inevitable,
- 15 disminuyendo directamente la tasa de supervivencia o generando alteraciones permanentes en el ADN, ya que algunos de ellos son agentes mutagénicos [5, 6, 7].

Por otro lado, existen problemas de permeabilidad de los crioprotectores hacia el interior de la muestra a conservar. Esta permeabilidad es muy dependiente de su naturaleza química; al aumentar el volumen de la muestra a preservar, disminuye la accesibilidad del crioprotector al interior de la muestra, aumentando por tanto la probabilidad de formación de hielo en el interior celular [7, 8]. Este fenómeno disminuye el éxito de conservación de muestras de volumen mayor al celular (como el caso de *C. elegans*), ya que para favorecer una mayor entrada de crioprotector en la célula, se debe aumentar el tiempo de incubación de la muestra en presencia del crioprotector, lo que finalmente puede acabar produciendo daños (por toxicidad). Por todo ello, la tasa de supervivencia alcanzada en la criopreservación de *C. elegans* mediante enfriamiento lento, se encuentra alrededor del 35-45% para un estado larvario L1 y L2 (entre 250-380 μm de longitud). Para estados posteriores del desarrollo, L3 (490-510 μm), L4 (620-650 μm) y adulto (900-1150 μm) no existe ningún protocolo basado en el enfriamiento lento que permita la supervivencia del organismo [4].

La vitrificación, por el contrario, consiste en la transición de las soluciones acuosas de un estado líquido a un estado vítreo (sólido amorfo) sin la formación de cristales de hielo.

35 Para conseguirla, en el caso de la vitrificación celular, se obliga a: i) un aumento en la viscosidad (mediante la sustitución del agua por agentes vitrificantes) y, sobre todo, ii) usando un rápido descenso de la temperatura de la célula (generalmente sumergiendo la muestra en nitrógeno líquido). Este enfriamiento rápido de la muestra impide que las moléculas de agua tengan tiempo de ordenarse para crear la estructura cristalina del hielo, formando por lo tanto un sólido amorfo. En el caso del agua pura se requiere una velocidad de enfriamiento de 107°C/min a aproximadamente -138°C [9].

Por lo tanto, si se añade una gran cantidad de crioprotector a la solución acuosa, se incrementa la viscosidad de la mezcla crioprotector-agua de tal manera que durante el enfriamiento es más probable la formación de un sólido vítreo en lugar de un cristal de hielo [10], dependiendo de dicha velocidad de enfriamiento. Concentraciones altas de crioprotector requieren velocidades de enfriamiento más bajas para garantizar la vitrificación; pero como se ha descrito anteriormente, la exposición a una alta concentración de crioprotector puede producir daños por toxicidad a las muestras biológicas.

Se puede conseguir una vitrificación efectiva llegando a un equilibrio entre la máxima velocidad de enfriamiento posible y la cantidad de crioprotector tolerable por las muestras biológicas, como se describe en el tradicional procedimiento desarrollado para *Saccharomyces cerevisiae* [11]. Al producirse un rápido descenso de la temperatura de 30.000°C/min, la viscosidad de la muestra aumenta hasta un punto en el cual las moléculas se inmovilizan. De esta forma, se consigue un estado sólido, aunque su estructura molecular sea la de un líquido extremadamente viscoso, evitándose de este modo, la formación de hielo intracelular y extracelular. Este método presenta la ventaja del uso de una baja concentración de crioprotector [3, 12]. La velocidad de recalentamiento también es clave para el funcionamiento de esta técnica, ya que existe el mismo riesgo de formación de hielo al atravesar la temperatura de transición al estado vítreo (T_g) [3]. De hecho, la velocidad de recalentamiento tiene un efecto mayor en la formación de hielo y, hasta ahora se consideraba que ésta dependía en gran medida de la velocidad de enfriamiento y que las muestras debían ser enfriadas a la máxima velocidad posible [13]. Sin embargo, recientes experimentos con ovocitos muestran cómo velocidades de enfriamiento muy bajas (95°C/min) pueden dar tasas de recuperación muy altas siempre y cuando la velocidad de recalentamiento sea suficientemente alta [14, 15, 16, 17, 18].

En muestras de mayor tamaño, además de los problemas de permeabilidad de los crioprotectores citados anteriormente, aparece una dificultad añadida en relación a la velocidad de enfriamiento; ya que, la velocidad de enfriamiento necesaria para evitar los gradientes térmicos es mucho mayor, lo cual requiere concentraciones muy elevadas de crioprotectores. Esto hace que para sistemas biológicos de mayor volumen sean necesarias otras técnicas de vitrificación más complejas no relevantes en nuestro caso [10].

Los sistemas que actualmente permiten ser correctamente vitrificados a altas velocidades de enfriamiento son sistemas que tienen un pequeño volumen, como pueden ser: óvulos y embriones humanos [1, 19], área en la cual hay un gran desarrollo de esta técnica debido a la necesidad actual de preservar la fertilidad en casos de pacientes que padecen enfermedades (o su tratamiento) que afectan a su fertilidad futura. El éxito de la vitrificación también está limitado por la misma razón por el volumen de solución que se va a vitrificar. Los protocolos de conservación de muestras biológicas utilizados actualmente, requieren la utilización de microcapilares de cuarzo o policarbonato, que permiten cargar un pequeño volumen de solución, limitando el tamaño de la muestra y permitiendo mantener una alta velocidad de enfriamiento y recalentamiento que le otorgan la efectividad al proceso [2, 19].

Para concluir, las diferencias fundamentales que presenta el método aquí propuesto para la criopreservación *Caenorhabditis elegans*, la vitrificación utilizando velocidades ultrarrápidas y bajas concentraciones de crioprotector, frente al enfriamiento lento son las siguientes:

- Velocidades de enfriamiento muy rápidas, actualmente de hasta 300.000°C/min.
- Uso de bajas concentraciones de crioprotector.

Para finalizar, remarcar la inexistencia actual de un protocolo de criopreservación (enfriamiento lento o vitrificación) que permita la conservación del nematodo *Caenorhabditis elegans* en un estadio larvario superior al L1 y L2 [3, 20]. Sin embargo,

existe la necesidad de desarrollo de un procedimiento que permita la conservación de este organismo en estadios larvario posteriores al L1 y L2, como ocurre en grupos de investigación que requieren el uso de estirpes de *C. elegans* que presenten una baja fertilidad; como el caso de las estirpes transgénicas utilizadas en investigación contra el Alzheimer [21], Parkinson [22], cáncer [23] o directamente que requieran la conservación del organismo en estado adulto, como en los estudios de estrés oxidativo asociados con el envejecimiento celular; donde las características fenotípicas a estudiar se manifiestan al final del ciclo de vida (en estado adulto) [24].

Referencias bibliográficas

1. **Mazur P. 1984.** *Freezing of living cells: mechanisms and implications. American Journal of Physiology* **247**: 125-142.
2. **Vajta G., Kuwayama M. 2006.** *Improving cryopreservation systems. Theriogenology* **65**:236-244.
3. **Risco R., Elmoazzen H., Doughty M., He X., Toner M. 2007.** *Thermal performance of quartz capillaries for vitrification. Cryobiology* **55**: 222-229.
4. **Brenner S. 1974.** *The Genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics* **77**: 71-94.
5. **Mazur M. 1977.** *The Role of Intracellular Freezing in the Death of Cells Cooled at Supraoptimal Rates. Cryobiology* **14**: 251-272.
6. **Fahy G.M. 1986.** *The Relevance of Cryoprotectant "Toxicity" to Cryobiology. Cryobiology* **23**: 1-13.
7. **Szurek E., Eroglu A. 2011.** Comparison and avoidance of toxicity of penetrating cryoprotectants. PLoS One 6(11):e27604. doi: 10.1371/journal.pone.0027604.
8. **Pegg D. E. 2010.** *The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. Cryobiology* **60**: 36-844.
9. **Bald W. B. 1986.** *On Crystal Size and Cooling Rate. Journal of Microscopy* **143**: 89-102.
10. **Fahy G.M., MacFarlane D.R., Angell C.A. Meryman H.T. 1984.** *Vitrification as an approach to Cryopreservation Cryobiology* **21**: 407-426.
11. **Dumont F., Marechal P.A., Gervais P. 2003.** *Influence of cooling rate on Saccharomyces cerevisiae destruction during freezing: unexpected viability at ultra-rapid cooling rates. Cryobiology* **46**: 33-42.
12. **Berejnov V., Hussein N.S., Alsaied O.A., Thorne R.E. 2006.** *Effects of cryoprotectant concentration and cooling rate on vitrification of aqueous solutions. Journal of Applied Crystallography* **39**: 244.
13. **Hopkins J.B., Badea R., Warkentin M., Thorne R. E. 2012.** *Effect of common cryoprotectants on critical warming rates and ice formation in aqueous solutions. Cryobiology* **65**: 169-178.

14. **Mazur P, Seki S. 2011.** *Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196°C at 95° to 70,000°C/min and warmed at 610° to 118 000°C/min: A new paradigm for cryopreservation by vitrification.* *Cryobiology* **62**: 1-7.
- 5 15. **Seki S, Mazur P. 2008.** *Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice.* *Biol Reprod* **79**:727-37.
16. **Seki S, Mazur P. 2012.** *Ultra-Rapid Warming Yields High Survival of Mouse Oocytes Cooled to -196°C in Dilutions of a Standard Vitrification Solution.* *PLoS ONE* **7**: 1.
- 10 17. **Seki S, Mazur P. 2009.** *The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure.* *Cryobiology* **59**:75-82.
- 15 18. **Seki S, Jin B, Mazur P. 2013.** *Extreme rapid warming yields high functional survivals of vitrified 8-cell mouse embryos even when suspended in a half-strength vitrification solution and cooled at moderate rates to -196°C.* *Cryobiology* (Article in press, 13 Dec 2013).
- 20 19. **Kuwayama M. 2007.** *Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method.* *Theriogenology* **67**: 73-78.
- 25 20. **Wergin W.P., Yaklich R.W., Carta L.K., Erbe E.F., Murphy C.A. 2000.** *Effect of an Ice-Nucleating Activity Agent on Subzero Survival of Nematode Juveniles.* *Journal of Nematology* **32**: 198-204.
21. **Wu Y., Luo Y. 2005.** *Transgenic C. elegans as a Model in Alzheimer's Research.* *Current Alzheimer Research* **2**: 37-45.
- 30 22. **Jadiya P., Khan A., Sammi S.R., Kaur S., Mir S.S., Nazir A. 2011.** *Anti-Parkinsonian effects of Bacopa monnieri: insights from transgenic and pharmacological Caenorhabditis elegans models of Parkinson's disease.* *Biochemical Biophysical Research Communication* **413**: 605-10.
- 35 23. **Siddiqui S.S., Loganathan S., Krishnaswamy S., Faoro L., Jagadeeswaran R., Salgia R. 2008.** *C. elegans as a model organism for in vivo screening in cancer: effects of human c-Met in lung cancer affect C. elegans vulva phenotypes.* *Cancer Biology & Therapy* **7**: 856-863.
- 40 24. **An J.H., Vranas K., Lucke M., Inoue H., Hisamoto N., Matsumoto K., Blackwell T.K. 2005.** *Regulation of the Caenorhabditis elegans oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3.* *PNAS* **102**: 16275-16280.

Descripción de las figuras

45

Figura 1: Contenedor de muestras biológicas. Microcapilar de poli carbonato (1), capilar adjunto (2), capilar de protección (3), zona donde se sitúa la muestra (4), zona de termosellado (5), Zona donde se coloca el adaptador para la carga (6).

Figura 2. Recipiente para la preparación del nitrógeno slush. Contenedor propio del nitrógeno slush (7), embudo para aumentar el volumen de nitrógeno líquido durante la fabricación de slush (8).

Figura 3: Dispositivo mecánico de vitrificación. 3A Mecanismo interno del dispositivo, 3B Detalle del mecanismo interior del dispositivo, 3C Cubierta completa del dispositivo. Contenedor para el nitrógeno slush (7), contenedor para la solución de recalentamiento (9), agitador magnético (10), adaptador del microcapilar (11), situación de la muestra (12) y trayectoria de movimiento (13).

Figura 4: Tasa de supervivencia de *Caenorhabditis elegans* en estado larvario (L1-L4) y adulto tras diferentes metodologías de conservación y almacenamiento. Enfriamiento lento y almacenamiento a -80°C, enfriamiento lento y almacenamiento a -196°C, vitrificación ejemplo 1 (almacenamiento a -196°C) y vitrificación ejemplo 2 (almacenamiento a -196°C).

Descripción de la invención

Actualmente no se conoce procedimiento alguno que permita la criopreservación de *Caenorhabditis elegans* en fase adulta. Para las fases de desarrollo comprendidas entre L1 y L2, existe el método de enfriamiento lento que consigue una supervivencia aceptable del nematodo (35-45%), pero no se obtienen resultados satisfactorios para ejemplares de mayor tamaño. La ineficacia del enfriamiento lento en la fase adulta radica en la necesidad de una concentración más alta de crioprotector y un mayor tiempo de incubación, ya que la accesibilidad del crioprotector (al interior celular) es menor en ejemplares de mayor tamaño. Estas condiciones impiden la formación de hielo intracelular sin embargo se generan daños producidos por la toxicidad de los crioprotectores.

Como solución a este problema, se ofrece un método aplicado para la criopreservación de *C. elegans* en fase adulta basado en la vitrificación. Este proceso permite un equilibrio entre la velocidad de enfriamiento (ultra-rápida) y la concentración y tiempo de incubación del crioprotector; evitando el daño celular causado por la formación de cristales de hielo (ya que no se produce congelación, sino que se obtiene un estado vítreo) y los daños por toxicidad asociados al uso de altas concentraciones de crioprotector.

Las ventajas metodológicas que presenta el método aquí propuesto, la vitrificación a velocidades ultrarrápida usando bajas concentraciones de crioprotector, frente al enfriamiento lento son las siguientes:

- Eliminación de la formación de hielo, disminuyendo por tanto el daño celular generado por la presión de los cristales de hielo.
- Utilización de crioprotector a una baja concentración y tiempo de incubación, y con ello disminución del daño celular relacionado con la toxicidad de los crioprotectores.
- Conservación de muestras de mayor tamaño al celular mediante un sistema cerrado y de fácil manejo.

Este procedimiento permite preservar al nematodo en todos sus estadios larvarios con una tasa de supervivencia mayor (98%, para L1-L2) y sobre todo la gran ventaja es la posibilidad de conservar al organismo en estado adulto (95%).

El objetivo fundamental de este procedimiento, es ofrecer un sistema eficaz para la criopreservación de *Caenorhabditis elegans*, en especial, en aquellas fases del desarrollo en las que otros métodos no han obtenido resultados satisfactorios (L3, L4 y adultos), así como para otro tipo de material biológico de características similares. Este método se basa en dos características principalmente, una alta velocidad de enfriamiento de la muestra biológica y el uso de crioprotectores a baja concentración. Estas dos condiciones son fundamentales para disminuir la toxicidad del proceso y la formación de hielo en el interior del material biológico a conservar.

En primer lugar, se pone en contacto la muestra biológica con una solución crioprotectora de baja concentración. La muestra se mantiene en presencia de crioprotector (como por ejemplo glicerol o etilenglicol, dimetilsulfóxido y sacarosa) durante un tiempo de incubación determinado, que depende del tipo de muestra que se trate. Este tiempo será el necesario para que la solución crioprotectora penetre en el interior del sistema biológico y se minimice el contenido de agua de la muestra.

A continuación, la muestra en solución crioprotectora se introduce en el contenedor para muestras biológicas que se vaya a utilizar en el proceso de vitrificación (Figura 1). La incubación de la muestra en crioprotector puede realizarse fuera o dentro de dicho contenedor. Para garantizar que el volumen total que se va a vitrificar sea pequeño, se aconseja utilizar un contenedor de muestra de tipo microcapilar o similar, de cualquier material (cuarzo, policarbonato, etc.), siempre y cuando cumpla su cometido (ser resistente al proceso de vitrificación y afectar en lo mínimo a la transferencia de calor). Se recomienda que el tamaño de dicho contenedor sea del orden de unas 200 µm de diámetro exterior y con un grosor de pared lo menor posible (Figura 1). El contenedor o microcapilar elegido puede encontrarse adherido de forma permanente a otro dispositivo de mayor tamaño para facilitar su manejo y adaptabilidad. Se recomienda el uso de un mecanismo de succión para situar la muestra en el interior del contenedor elegido para el proceso. La naturaleza de este mecanismo puede ser de tipo manual o automática siempre que permita una buena unión con el contenedor y una alta precisión durante el proceso.

Una vez que la muestra se encuentra en el interior del contenedor o microcapilar y para asegurar que no se producen problemas de contaminación cruzada o entrada de líquido a lo largo del la vitrificación, lo que puede afectar a la eficacia del proceso, se recomienda el sellado del contenedor por ambos extremos (Figura 1). El sellado se puede realizar, por ejemplo, con cualquier tratamiento térmico, siempre que se compruebe que no existe transferencia de calor entre el lugar del sellado y el lugar donde se dispone la muestra o que esta transferencia de calor no afecte a la viabilidad futura de la muestra, o de cualquier otra forma siempre y cuando sea eficaz.

Para iniciar el proceso de vitrificación, la muestra situada en el interior del contenedor, se introduce en líquido refrigerante. Es muy importante que la entrada en el líquido refrigerante se realice de forma muy rápida, bien de forma manual, o mediante un dispositivo mecánico automático que permita eliminar los problemas asociados a la mala práctica de los usuarios inexpertos. Al utilizar cualquier dispositivo mecánico se asegura

la misma velocidad de enfriamiento y recalentamiento cada vez que se repita dicho procedimiento garantizando el éxito de la técnica (Figura 3).

El líquido refrigerante utilizado para el enfriamiento de la muestra deberá tener características similares al nitrógeno líquido o slush. El nitrógeno slush es una interfase entre sólido y líquido que se encuentra a una temperatura de alrededor -210°C . Con este tipo de refrigerantes se pueden alcanzar unas velocidades de enfriamiento de hasta $650.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Además, con el uso de estos refrigerantes, se evita el efecto Leidenfrost, al impedir que se genere una cubierta de vapor alrededor del contenedor de la muestra, lo que puede alterar la transferencia de calor y, por tanto, la velocidad de enfriamiento.

Para el almacenamiento de la muestra vitrificada, se aconseja el uso de sistemas mantenidos con nitrógeno líquido; para ello se introduce el contenedor donde está situada la muestra vitrificada en un tanque con nitrógeno líquido, pudiendo quedar almacenada durante un tiempo indefinido, conservándose el material biológico en las mismas condiciones.

Para recuperar una muestra que se encuentre vitrificada, se procede al recalentamiento de la misma. Para ello, se extrae la muestra elegida del tanque de nitrógeno líquido y se introduce en la solución de recalentamiento. Al igual que para el proceso de enfriamiento, la muestra vitrificada situada en el contenedor o microcapilar se puede introducir en la solución de recalentamiento, bien mediante un equipo automático o de forma manual, siempre y cuando se asegure que la velocidad de recalentamiento sea la máxima, ya que este factor también es importante para asegurar la viabilidad de la muestra. Se recomienda que desde la extracción de la muestra del tanque de nitrógeno líquido hasta que entra en contacto con la solución de recalentamiento, ésta se encuentre en contacto con nitrógeno líquido, para evitar la formación de hielo.

La composición de la solución de recalentamiento es indiferente, siempre y cuando previamente se haya procedido al sellado del contenedor de la muestra. Si el contenedor de la muestra no se encontrase sellado, se aconseja que la composición de la solución de recalentamiento sea igual en concentración a la solución utilizada para el enfriamiento, para así evitar que la muestra sufra un choque osmótico durante este proceso y, con ello, provocar daños al sistema biológico.

La temperatura de la solución de recalentamiento recomendada es de unos 37°C , ya que es una temperatura media, en la cual los sistemas biológicos generalmente se desarrollan; también se puede mantener esta solución en continua agitación durante todo el proceso de recalentamiento, para favorecer que el líquido que esté en contacto directo con el contenedor de la muestra vitrificada siempre se encuentre a una temperatura homogénea de 37°C (aproximadamente). Tanto el aumento de la temperatura como la agitación de la solución de recalentamiento producen un aumento en la velocidad de recalentamiento que facilita el paso de la solución que acompaña a la muestra de un estado vítreo a un estado líquido, impidiendo la formación de cristales de hielo, que podrían afectar a la efectividad del proceso. La agitación continua de la solución de recalentamiento puede realizarse, por ejemplo, mediante un mecanismo magnético de agitación, que puede estar acoplado en el caso de utilizar un dispositivo automático en el proceso (Figura 3).

Una vez desvitrificada la muestra, se puede proceder a la descarga de la muestra, de forma similar a la carga en el interior del contenedor, en el medio adecuado según su naturaleza y a determinar su estado tras dos horas de reposo a la temperatura idónea.

5 Modo de realización de la invención

Ejemplo 1. Procedimiento de conservación de Caenorhabditis elegans en estado adulto:

A) Materiales:

• Soluciones:

Vitrificación 1: 750 µl etilenglicol, 750 µl de dimetilsulfóxido y enrasar hasta 10 ml con H₂O_d

Vitrificación 2: 1400 µl etilenglicol, 1400 µl de dimetilsulfóxido, 1.711 g sacarosa y enrasar hasta 10 ml con H₂O_d.

Recalentamiento 1: 3.423 g sacarosa y enrasar hasta 10 ml con H₂O_d. Esta solución debe permanecer para su uso a 37°C.

Recalentamiento 2: 1.711 g sacarosa y enrasar hasta 10 ml con H₂O_d.

PBS: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄ y enrasar hasta un litro con H₂O_d.

Solución de recalentamiento: agua a 37°C.

• Mechero Bunsen.

• Lupa .

• Pipeta Pasteur vidrio .

• Micropipeta 10-100 µl.

• Micropipeta 100-1000 µl.

• Microcapilares de policarbonato ID/OD = 167/200 µm.

• Capilar 1: ID/OD = 3/3.2 mm

• Capilar 2: ID/OD = 3.4/3.6 mm

• Termoselladora industrial.

• Nitrógeno líquido.

• Agitador magnético.

• Placas de Petri de 60 mm de diámetro vacías.

- Placas de Petri de 60 mm de diámetro saturadas con *C. elegans* en estado adulto:

Las placas de Petri contienen agar y un césped de *Escherichia coli* OP50.

5 B) Protocolo de vitrificación:

Primero encender el mechero Bunsen y crear una atmósfera libre de contaminación externa.

- 10 Comenzar a partir de una placa saturada de *C. elegans* de 60mm de diámetro, con la mayoría de los individuos en estado adulto. Lavar la placa con 1 ml de solución PBS y resuspender los *C. elegans* que se encuentren sobre la superficie de la placa con la ayuda de una varilla estéril. Para facilitar la realización del protocolo colocar pequeños volúmenes (50-100 µl) de cada una de las soluciones sobre superficies planas y transparentes como por ejemplo placas de petri, identificado en cada caso el tipo de solución. Introducir un individuo adulto resuspendido en PBS en el interior de una pipeta Pasteur de vidrio y transferirlo al interior de la solución de vitrificación 1, durante un tiempo de 15 minutos. A continuación, transferir el individuo a la solución de vitrificación 2 durante un tiempo total de 1 minuto. Rápidamente introducir el individuo dentro del contenedor de la muestra.

El contenedor de la muestra está formado por un microcapilar de policarbonato adherido al capilar 1 para facilitar su manejo (Figura 1). Bajo la luz de la lupa, introducir el *C. elegans* en estado adulto en el interior del microcapilar con la ayuda de un sistema de succión unido al capilar 1; situar el nematodo 1-1.5 cm del extremo del microcapilar (Figura 1). Para evitar problemas de contaminación y de entrada de solución al interior del microcapilar proceder al sellado del mismo y del capilar 1 al que va unido, por el extremo contrario (Figura 1). El sellado se puede realizar por cualquier tratamiento térmico, como por ejemplo mediante una termoselladora industrial.

30 Para realizar la vitrificación de la muestra introducir el microcapilar de policarbonato en un tanque con nitrógeno líquido de forma manual y lo más rápido posible. En este momento la muestra puede permanecer almacenada durante un tiempo indefinido siempre y cuando no se modifiquen las condiciones de temperatura (-196°C). Para proceder al recalentamiento de la muestra, introducir el microcapilar, de forma manual y lo más rápido posible, dentro de un tanque con agua a 37°C en agitación continua. A continuación proceder con la apertura del microcapilar e introducir la muestra en la solución de recalentamiento 1 a 37°C durante 1 minuto. Transferir la muestra con la ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio a la solución de recalentamiento 2 durante 3 minutos. Para finalizar realizar dos lavados de la muestra en PBS de 5 y 3 minutos respectivamente y transferir el nematodo a una placa de petri sembrada previamente con *E. coli* OP50.

45 Para conservar a largo plazo los *C. elegans* en estado adulto, una vez que la muestra se encuentre vitrificada en contacto con nitrógeno líquido, colocar el capilar 2 sobre el microcapilar, utilizándolo como mecanismo de protección (Figura 1) e introducir el complejo en el interior de un tanque lleno de nitrógeno líquido.

50 Para recalentar muestras almacenadas durante un periodo de tiempo largo, proceder de la misma forma explicada anteriormente.

C) Resultados:

Mediante esta técnica se obtuvo una supervivencia de *C. elegans* en estado adulto del 95% (Figura 4). El porcentaje restante hasta alcanzar el máximo puede ser debido a errores de manipulación no detectados por el personal durante la realización de la técnica. Además esta técnica es aplicable a los demás estadios de desarrollo del nematodo obteniendo una tasa de supervivencia similar al individuo en estado adulto, mejorando los resultados obtenidos para la técnica tradicional de enfriamiento lento (Figura 4).

*Ejemplo 2. Procedimiento de conservación de Caenorhabditis elegans en estado adulto:*A) Materiales:

• Soluciones:

M9 (1L): 3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl, 1 ml 1M MgSO_4 , 1 L H_2O_d , enrasar hasta 1 L con H_2O_d , autoclavar durante 20m in.

Medio de vitrificación (1L): 6.8 g KH_2PO_4 , 5.865 g NaCl, 300 ml glicerol, 5.6 ml 1M NaOH, enrasar hasta 1L con H_2O_d , autoclavar durante 20 min y añadir 3 ml 0.1M de MgSO_4 (filtrada previamente).

Solución de recalentamiento: agua a 37°C.

- Mechero Bunsen.
- Lupa.
- Micropipeta 10-100 μl .
- Micropipeta 100-1 000 μl .
- Tubos eppendorf.
- Porta objetos.
- Microcapilares de policarbonato 10/00= 167/200 μm .
- Capilar 1: ID/OD = 3/3.2 mm
- Capilar 2: ID/OD = 3.4/3.6 mm
- Termoselladora industrial.
- Bomba de vacío (Telstar 2F3) y campana de vacío.
- Dispositivo mecánico para vitrificar.
- Nitrógeno líquido.

- Placas de Petri de 60mm de diámetro saturadas con *C. elegans* en estado adulto:

Las placas de Petri contienen agar y un césped de *Escherichia coli* OP50.

5 B) Protocolo de vitrificación:

Primero encender el mechero Bünsen y crear una atmósfera libre de contaminación externa.

- 10 Comenzar a partir de una placa saturada de *C. elegans* de 60 mm de diámetro, con la mayoría de los individuos en estado adulto. Lavar la placa con 1 ml de solución M9 y resuspender los *C. elegans* que se encuentren sobre la superficie de la placa con la ayuda de una varilla estéril. Transferir, con una micro pipeta (100-1000 µl), todo el líquido que contenga la placa de Petri a un tubo eppendorf 1.

- 15 Observar la placa de Petri bajo la lupa para ver si aún quedan *C. elegans*, y realizar de nuevo el lavado de la placa con 0.5 ml de M9. Transferir, el líquido que se obtenga del segundo lavado, al mismo tubo eppendorf 1. Esperar 2 minutos para que los *C. elegans* se depositen en el fondo del tubo eppendorf 1 y transferir, con la ayuda de una micropipeta, 500 µl del fondo de la solución del eppendorf 1, a un nuevo eppendorf 2.

- 20 Añadir 500 µl de la solución de vitrificación al tubo eppendorf 2. Realizar este paso lentamente y por el borde del tubo para que el contacto de los *C. elegans* que se encontraban en M9 con la solución de vitrificación, que contiene glicerol (crioprotector), sea despacio y continuo, y evitar así que los *C. elegans* se presenten en una alta concentración de glicerol (lo que puede producir daños).

- 25 Una vez que se añada la solución de enfriamiento, agitar el tubo eppendorf suavemente un par de veces, para conseguir una mezcla homogénea y mantener la muestra en presencia del crioprotector durante un tiempo de incubación total de 20 minutos. La concentración final de crioprotector es del 15%, de glicerol.

- 30 El contenedor de la muestra está formado por un microcapilar de policarbonato adherido al capilar 1 para facilitar su manejo (Figura 1). Para la carga de *C. elegans* en el interior del microcapilar esperar un par de minutos y utilizar una lupa; tomar una muestra de 10 µl del fondo del tubo eppendorf 2 y depositarla sobre un porta objetos. Bajo la luz de la lupa, introducir 1 *C. elegans* en estado adulto en el interior del microcapilar con la ayuda de un sistema de succión unido al capilar 1; situar el nematodo 1-1.5 cm del extremo del microcapilar (Figura 1). El resto del tiempo de incubación necesario (hasta 20 minutos) se puede realizar en el interior del microcapilar.

- 35 Para evitar problemas de contaminación y de entrada de solución al interior del microcapilar proceder al sellado del mismo y del capilar 1 al que va unido, por el extremo contrario (Figura 1). El sellado se puede realizar por cualquier tratamiento térmico, como por ejemplo mediante una termoselladora industrial.

- 40 Para la fabricación del nitrógeno slush utilizar un recipiente de poliespan de capacidad para 180 ml y un embudo del mismo material para aumentar su volumen durante la fabricación (Figura 2). Llenar el recipiente con nitrógeno líquido e introducirlo en el interior de una campana conectado a una bomba de vacío durante 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, situar el recipiente con nitrógeno slush en el lugar indicado del

dispositivo mecánico de vitrificación. Colocar también un recipiente similar con la solución de recalentamiento compuesta por agua a 37°C en agitación continua.

- 5 Una vez transcurrido el tiempo de incubación necesario para la muestra en presencia del crioprotector, colocar el microcapilar en el adaptador del dispositivo mecánico de vitrificación (Figura 3), activar el dispositivo e introducir la muestra en el interior del contenedor de nitrógeno slush; mantener la muestra durante 5-8 segundos inmersa en el nitrógeno para asegurar que se ha vitrificado.
- 10 Si se desea recuperar la muestra de inmediato, activar el dispositivo mecánico e introducir el microcapilar en la solución de recalentamiento. Mantener el microcapilar durante 5-8 segundos inmerso en esta solución, para asegurar un correcto recalentamiento. Separar el microcapilar del dispositivo mecánico y cortar el extremo del microcapilar y el capilar 1 sellado, con la ayuda de una cuchilla afilada bajo la lupa, para
- 15 permitir la descarga del nematodo. Descargar el *C. elegans* adulto en una placa de petri con agar, previamente sembrada con *E. coli* OP50.

- 20 Si se desea conservar a largo plazo los *C. elegans* en estado adulto, una vez que la muestra se encuentre vitrificada en contacto con nitrógeno slush, colocar el capilar 2 sobre el microcapilar, utilizándolo como mecanismo de protección (Figura 1) e introducir el complejo en el interior de un tanque lleno de nitrógeno líquido. Para recalentar muestras almacenadas durante un periodo de tiempo largo, proceder de la misma forma explicada anteriormente.

25 C) Resultados:

- Mediante esta técnica se obtuvo una supervivencia de *C. elegans* en estado adulto superior al 85% (Figura 4), el porcentaje restante hasta alcanzar el máximo puede ser debido a errores manuales no detectados cometidos por el personal a lo largo del
- 30 protocolo y no a fallos de la propia técnica en si. Del mismo modo, este procedimiento permite la conservación de *C. elegans* en estado larvario L 1-L4 con una supervivencia superior al 98% (Figura 4), el porcentaje restante hasta alcanzar el máximo puede ser debido a errores manuales no detectados cometidos por el personal a lo largo del protocolo y no a fallos de la propia técnica en si. Este resultado, supone por tanto una
- 35 alternativa con un grado de éxito mayor al obtenido por lo protocolos tradicionales de criopreservación de *C. elegans* mediante enfriamiento lento, almacenados tanto a -80°C como a -196°C (Figura 4).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la conservación de *Caenorhabditis elegans* mediante vitrificación utilizando velocidades de enfriamiento ultrarrápidas y bajas concentraciones de crioprotector, **caracterizado** por las siguientes etapas:
- 5 a) la muestra biológica se pone en contacto con una solución crioprotectora de baja concentración. La muestra se mantiene en presencia del crioprotector, preferentemente glicerol o etilenglicol, dimetilsulfóxido y sacarosa durante un tiempo de incubación determinado, dependiendo del tipo de muestra que se trate.
- 10 b) la muestra en solución crioprotectora se introduce en un contenedor para muestras biológicas de tipo microcapilar o similar, de cualquier material, preferentemente cuarzo o policarbonato y cuyo tamaño sea del orden de unas 200 µm de diámetro exterior y con un grosor de pared lo menor posible, que puede estar abierto o cerrado por ambos extremos, mediante cualquier tratamiento térmico, durante el proceso. La introducción de la muestra en el interior de dicho recipiente puede realizarse mediante el uso de un mecanismo de succión. La naturaleza de este mecanismo puede ser de tipo manual o automática siempre que permita una buena unión con el contenedor.
- 20 c) la muestra situada en el interior del contenedor, se introduce en líquido refrigerante, preferentemente nitrógeno líquido o slush, de forma muy rápida, bien de forma manual, o mediante un dispositivo mecánico automático.
- 25 d) Para el almacenamiento de la muestra vitrificada, se introduce el contenedor donde está situada la muestra vitrificada en un tanque preferentemente con nitrógeno líquido, pudiendo quedar almacenada durante un tiempo indefinido, conservándose el material biológico en las mismas condiciones.
- 30 2. Procedimiento para la conservación de *Caenorhabditis elegans* mediante vitrificación utilizando velocidades de enfriamiento ultrarrápidas y bajas concentraciones de crioprotector, según reivindicación 1, **caracterizado** porque para recuperar la muestra vitrificada, se procede al recalentamiento de la misma, extrayendo el contenedor con la muestra del tanque de nitrógeno líquido e introduciéndolo en la solución de recalentamiento, cuya temperatura recomendada es de 37°C. La solución de recalentamiento puede ser inespecífica siempre que el contenedor de la muestra esté cerrado o similar a la solución crioprotectora usada en el enfriamiento, siempre que esté abierto.
- 35 3. Procedimiento para la conservación de *Caenorhabditis elegans* mediante vitrificación utilizando velocidades de enfriamiento ultrarrápidas y bajas concentraciones de crioprotector, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque es aplicable a todos los estados de su desarrollo, incluido en estado adulto.
- 40

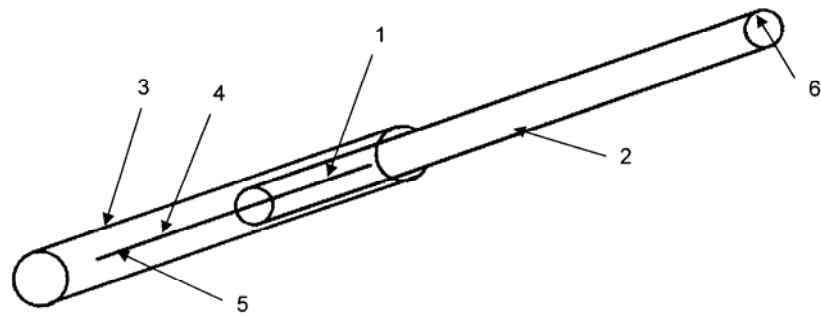


Figura 1

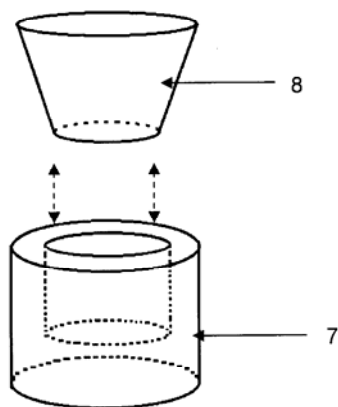


Figura 2

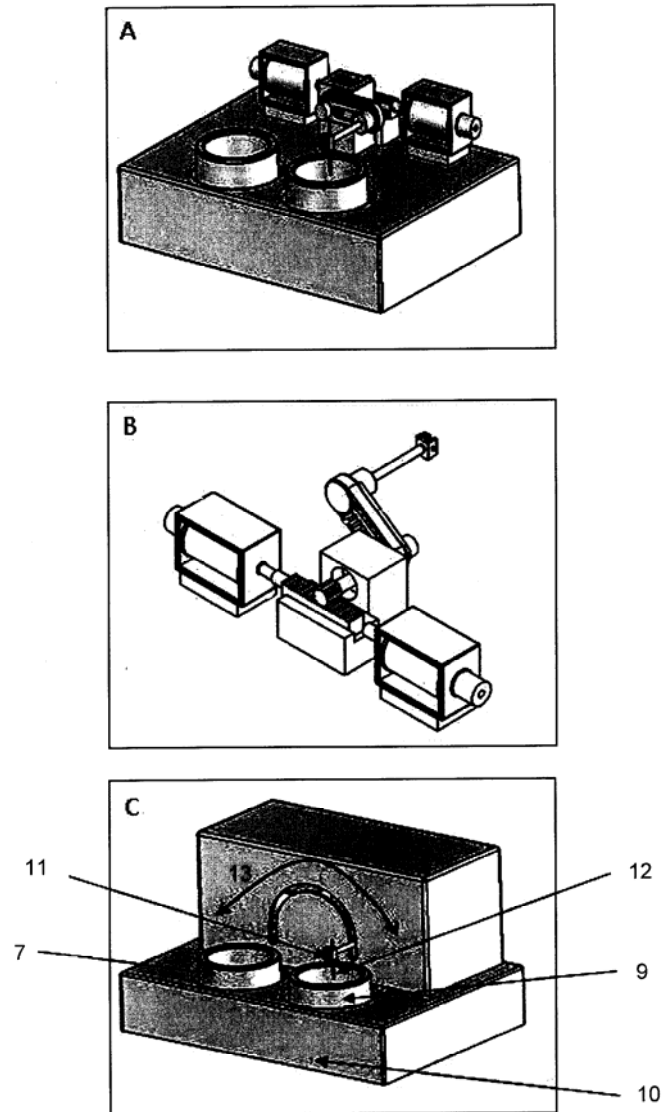


Figura 3

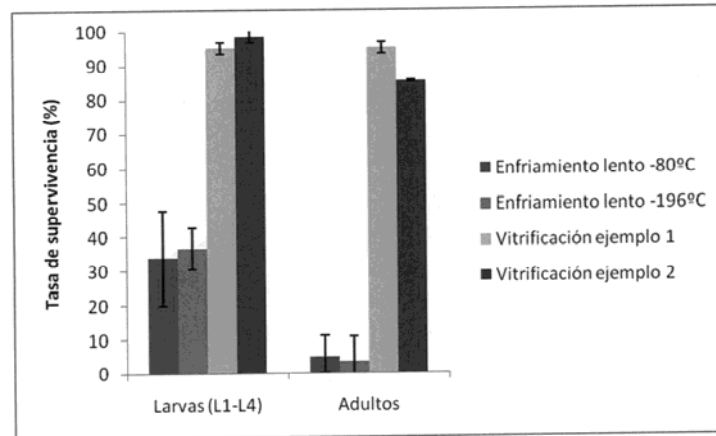


Figura 4



- ②① N.º solicitud: 201400908
②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.11.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A01N1/00** (2006.01)
A01N1/02 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	IRDANI TIZIANA et al. Low cryoprotectant concentrations and fast cooling for nematode cryostorage. <i>Cryobiology</i> 2011 VOL: 63 No: 1 Págs: 12-16 ISSN 0011-2240 Doi: doi:10.1016/j.cryobiol.2011.04.003, páginas 12 y16.	1,2
A	HAYASHI MASAKAZU et al. CRYOPRESERVATION OF NEMATODE <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> IN THE ADULT STAGE. <i>CryoLetters</i> 2013 VOL: 34 No: 4 Págs: 388-395 ISSN 0143-2044(print) ISSN 1742-0644(electronic), resumen.	1-3
A	VAJTA GABOR et al. Improving cryopreservation systems. <i>Theriogenology</i> 2006 VOL: 65 No: 1 Págs: 236-244 ISSN 0093-691X, resumen.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.04.2016

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.04.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-3	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 3	SI
	Reivindicaciones 1, 2	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	IRDANI TIZIANA et al. Low cryoprotectant concentrations and fast cooling for nematode cryostorage. <i>Cryobiology</i> 2011 VOL: 63 No: 1 Págs: 12-16 ISSN 0011-2240 Doi: doi:10.1016/j.cryobiol.2011.04.003, páginas 12 y16	31.07.2011
D02	HAYASHI MASAKAZU et al. CRYOPRESERVATION OF NEMATODE <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> IN THE ADULT STAGE. <i>CryoLetters</i> 2013 VOL: 34 No: 4 Págs: 388-395 ISSN 0143-2044(print) ISSN 1742-0644(electronic), resumen	30.06.2013
D03	VAJTA GABOR et al. Improving cryopreservation systems. <i>Theriogenology</i> 2006 VOL: 65 No: 1 Págs: 236-244 ISSN 0093-691X, resumen	31.12.2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

En las reivindicaciones 1-3 de la solicitud de patente se reivindica un procedimiento para la conservación de *Caenorhabditis elegans* mediante vitrificación utilizando velocidades de enfriamiento ultrarrápidas y bajas concentraciones de crioprotector.

El documento D01 muestra un procedimiento que puede ser empleado para el mantenimiento de diferentes especies de nematodos en colecciones vivas (ver página 16). El citado documento muestra (ver página 12) una técnica de crioconservación que emplea concentraciones bajas y que no sean tóxicas de crioprotector, combinadas con una fase de enfriamiento rápido en nitrógeno líquido. A partir de la información divulgada en el documento D01 resultaría evidente, para un experto en la materia, el desarrollo del procedimiento reivindicado en la solicitud de patente. Por tanto, las reivindicaciones 1 y 2 de la solicitud de patente presentan novedad, pero no actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 LP11/86.