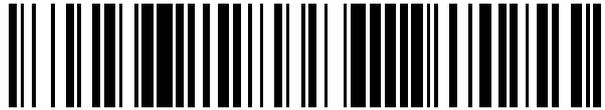


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 697**

21 Número de solicitud: 201830707

51 Int. Cl.:

A61B 18/04 (2006.01)

A61F 7/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

13.07.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.01.2020

71 Solicitantes:

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

72 Inventor/es:

**RISCO DELGADO, Ramón;
BARROSO RODRÍGUEZ, Pablo;
OLMO FERNÁNDEZ, Alberto;
CAÑO CHAICHIO, María y
TORRES ROLDÁN, Alvaro**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO PARA EL RECALENTAMIENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO CRIOPRESERVADO, BASADO EN ULTRASONIDOS FOCALIZADOS DE ALTA INTENSIDAD**

57 Resumen:

Procedimiento y dispositivo para el recalentamiento de material biológico criopreservado, basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad.

Se describe un dispositivo y un procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad, que parte de un material biológico criopreservado mediante un proceso de vitrificación. Sobre éste se aplican unas ondas ultrasónicas mediante un transductor o preferentemente mediante un conjunto de transductores de ultrasonido de alta intensidad a una determinada frecuencia de ultrasonidos y potencia para conseguir un calentamiento homogéneo a alta velocidad del material biológico criopreservado que evite la recristalización/devitrificación en el material biológico criopreservado.

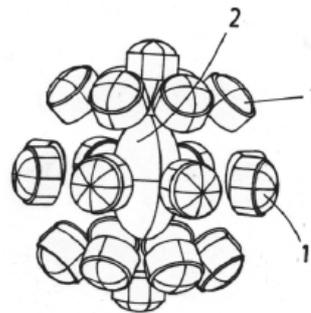


FIG.14B

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO PARA EL RECALENTAMIENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO CRIOPRESERVADO, BASADO EN ULTRASONIDOS FOCALIZADOS DE ALTA INTENSIDAD

5

OBJETO DE LA INVENCION

10 Este procedimiento y dispositivo se encuadran en el sector de la técnica dedicado a la Biotecnología y a la Ingeniería Biomédica; en particular son de especial utilidad para la criopreservación de tejidos y órganos.

La presente invención se refiere a un procedimiento para conseguir la recuperación efectiva del material biológico criopreservado y su dispositivo asociado.

15 El procedimiento objeto de esta invención permite realizar el recalentamiento de material biológico criopreservado, particularmente órganos, obtenido por vitrificación hasta temperatura ambiente de forma rápida y homogénea, de modo que se evita el crecimiento de los pequeños núcleos de hielo que *i)* o bien pudieron formarse, de manera indeseable, durante el proceso de enfriamiento (recristalización), *ii)* o bien hayan podido aparecer durante el propio recalentamiento (devitrificación).

20 La tecnología descrita en la presente invención emplea un sistema de transductores de ultrasonidos. El procedimiento tiene en consideración la geometría del sistema, y la intensidad y la frecuencia de los ultrasonidos, que se ajustan a las características del órgano diana: deben de ser optimizados para garantizar máximas velocidades de recalentamiento y mínimos gradientes de temperatura durante el proceso.

25

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Estado de la criopreservacion de tejidos y órganos

30 La criopreservación de material biológico es una práctica que permite su almacenamiento a muy bajas temperaturas, generalmente a -196 °C, durante un tiempo indefinido. Su aplicación es vastísima, extendiéndose desde un uso rutinario en laboratorios de investigación biomédica hasta su aplicación en bancos de tejidos para

trasplantes, pasando por repositorios de especies en peligro de extinción o como parte de la praxis habitual en los centros dedicados a reproducción asistida.

5 En la literatura es fácil encontrar un agrupamiento de las técnicas de criopresevación en dos bloques: la llamada congelación lenta (o más comúnmente “slow freezing”, por su extendido uso en inglés) (Mazur, 1984), y la vitrificación (Rall WF, 1985). Esta distinción, común y útil desde un punto de vista eminentemente práctico, resulta, sin embargo, un tanto confusa y artificiosa cuando se atiende a los mecanismos últimos que gobiernan el proceso. La forma más sencilla de comprender el porqué es desarrollando, como se hará en el siguiente párrafo, los procesos físicos que subyacen a ambas estrategias. Esto, a su vez, permitirá enmarcar correctamente la presente invención.

15 En la congelación lenta, la muestra biológica, bañada por una solución isotónica, es introducida en un recipiente. Dicha solución suele contener un 10% de un agente crioprotector. Este debe de poseer tres propiedades básicas: que las membranas celulares sean permeables a él, que se mantenga disuelto en agua en un rango amplio de temperaturas (subcero) y que no tenga una toxicidad elevada. Las células aisladas en suspensión son los candidatos ideales para su conservación mediante congelación lenta, donde tiene, por tanto, su aplicación más frecuente. El proceso comienza con un enfriamiento gradual del recipiente con las células y la solución isotónica con crioprotector; para la mayoría de las células ~ 1 °C/min. Cuando se alcanza el punto de congelación de la solución, que generalmente está en torno a -5 °C, se induce la formación de hielo en el medio extracelular; esta inducción de hielo es crítica y si no se realizase, entonces, dado que estas soluciones tienden a subenfriar, el hielo aparecería de forma incontrolada a cualquier temperatura, imposibilitando la aplicación de esta técnica, como se entenderá a continuación. Dicho hielo inducido, al ser agua pura, resta agua a la solución extracelular, concentrándola. Ello provoca la consiguiente salida de agua de interior de las células por ósmosis, concentrando a su vez los solutos del citosol. Y esto, a su vez, consigue un descenso del punto de congelación dentro de la célula. Si el crecimiento del hielo extracelular es lo suficientemente lento, el agua del interior de la célula tiene tiempo de ir saliendo, paulatinamente, y el crioprotector tiene tiempo de ir entrando; de esta manera, para cada temperatura, la concentración intracelular de solutos consigue ser siempre lo suficientemente alta como para que no se forme hielo en su interior; así, la solución intracelular se acabará convertido en un vidrio, un sólido amorfo, evitando la formación de lo que de otro modo serían letales cristales de agua congelada. Para que esta

técnica funcione, la entrada del crioprotector dentro de la célula es fundamental, como decíamos anteriormente. Si esto no ocurriese, los solutos propios del citosol, al concentrarse, precipitarían formando cristales, pues dichos solutos son fundamentalmente sales que tienen un bajo límite para su solubilidad, lo que suele impedir un descenso crioscópico por debajo de -22 °C (límite para el cloruro sódico, que es el soluto dominante): es el llamado punto eutéctico; sin embargo, las soluciones acuosas de crioprotectores tienen un punto eutéctico mucho más bajo, pudiendo llegar a temperaturas donde la viscosidad es tan alta que no existe posibilidad de formar estructuras cristalinas. La congelación lenta, por tanto, solo es útil si las células (en suspensión) pueden irse reubicando entre las dendritas del hielo extracelular, o ase, las zonas que van adquiriendo una alta concentración en solutos. Es cierto que esta técnica también se aplica a algunos tejidos, como el tejido ovárico, con un relativo éxito. En este caso, aunque está probado que aparece hielo dentro del tejido (Corral A., 2018), siempre quedan algunas células que se libran de él, siendo estas pocas células las que acaban sobreviviendo y aprovechándose.

Tras la descripción del “slow freezing”, hablemos a continuación de la segunda técnica, la vitrificación. En la vitrificación, en contraposición al “slow freezing”, no se forma hielo ni dentro ni fuera de las células. Esta se basa en el hecho de que cualquier líquido, cuando es enfriado a una velocidad suficientemente alta, solidifica sin formar cristales; y en que un subconjunto de ellos, aquellos que se mantienen líquidos en un amplio rango de temperaturas, también vitrifican incluso aunque la velocidad enfriamiento no sea especialmente alta. Así, el agua pura requiere una velocidad de enfriamiento en torno a 107 °C/min para vitrificar (Farrant, 1965); la adición de ciertos solutos reduce esta velocidad tanto como se quiera, sin más que añadirlos en una concentración suficientemente elevada (Risco R., 2017, Gallardo M., 2016). Atendiendo a estos dos comportamientos, se suelen distinguir dos formas distintas de realizar la vitrificación: mediante un enfriamiento ultrarrápido (vitrificación de no equilibrio) y vitrificación de equilibrio.

La vitrificación mediante un enfriamiento ultrarrápido (en adelante, vitrificación ultrarapida) está especialmente indicada en aquellos sistemas susceptibles de ser dañados por el frío per se (en inglés, “chilling injury”), sin necesidad de la aparición de hielo para que se produzca daño. Tal es el caso de los estadlos tempranos del desarrollo: gametos, embriones y células madre embrionarias. En la vitrificaron ultrarrápida, al no existir una exposición prolongada al frío, como ocurre en el “slow freezing” o en la vitrificación de equilibrio, de la que hablaremos extensamente en el

siguiente párrafo, no se da el “chilling injury”. De otra parte está, como decimos, la vitrificación de equilibrio; encuentra su mejores candidatos en sistemas compactos y voluminosos, como tejidos y órganos. En estos sistemas no es aplicable el slow freezing pues las células no se pueden reubicar en las zonas libres de hielo, dado que están inmóviles formado el tejido; y tampoco es viable la vitrificación ultrarrápida a día de hoy, pues con las tecnologías de enfriamiento presentes es imposible enfriar un sistema voluminoso a gran velocidad. Es en la vitrificación por equilibrio donde nuestra tecnología encuentra una aplicación directa, con lo que describiremos esta técnica con detalle a continuación.

10 Como decimos, la vitrificación por equilibrio es de especial utilidad en muestras de gran tamaño (tejidos u órganos), pues en este caso no es posible, con la tecnología actual, enfriarlas a una velocidad lo suficientemente alta como para solidificarlas sin formar hielo. La adición de solutos en altas concentraciones consiguen reducir sensiblemente esta velocidad. Sin embargo, aunque no se hubiesen formado grandes
15 cristales de hielo durante el enfriamiento, estos pueden aparecer durante el recalentamiento si este no se realiza también a una velocidad lo suficientemente elevada; son los fenómenos conocidos como devitrificación y recristalización, de los que hablaremos en el siguiente párrafo. Por ello, la concentración de solutos debe de ser no solo compatible tanto con la velocidad de enfriamiento como con la velocidad de recalentamiento, si queremos evitar la aparición de cristales de hielo.
20

En la aparición de cristales de hielo participan dos fenómenos: su nucleación, o sea, el nacimiento de un embrión inicial, y su posterior crecimiento. Comencemos hablando de la nucleación. En una solución acuosa las moléculas de agua están constantemente, agrupándose y desagrupándose de forma aleatoria, formado clusters
25 (mediante los llamados enlaces de puente de hidrógeno, muy débiles) que se destruyen inmediatamente debido a la agitación térmica. Sin embargo, si el azar consigue agrupar un cluster por encima de un determinado tamaño, la agitación térmica no es capaz de hacerlo desaparecer; en este caso la unión de una nueva molécula de agua al cluster está energéticamente favorecida, generando el
30 crecimiento indefinido del cristal de hielo. El nacimiento de este embrión, de este cluster de dimensiones mínimas, recibe en nombre de nucleación y es el inicio de la congelación. Cuanto más frío está el sistema, menor es la dimensión de este cluster mínimo capaz de disparar la nucleación, pues la agitación térmica, causante de su eventual destrucción, es menos intensa. Tras la nucleación, el segundo y último
35 fenómeno implicado en la formación de hielo es su crecimiento. Este está dominado

por la viscosidad de solución. Si la solución es muy viscosa, el hielo, aunque haya aparecido, es incapaz de crecer. En zonas de baja viscosidad las dendritas encuentran la vía para avanzar dentro de la solución. A mayor temperatura menor viscosidad, por lo que el requisito para crecimiento del hielo es, en este sentido, justo el contrario que para la nucleación, mencionado anteriormente; esto se ve reflejado en la Fig. 1. En ella se representa en el eje horizontal la temperatura y en el eje vertical tanto la probabilidad de nucleación como la probabilidad de crecimiento del hielo para una concentración dada de un crioprotector genérico. A medida que aumenta la concentración de crioprotector, estas dos curvas son más estrechas y están menos solapadas. Para concentraciones por encima de cierto umbral no existe solapamiento alguno. En este caso, al enfriar el sistema, si se llega a producir una nucleación, el hielo no tiene posibilidad de crecer, dado que su formación ocurre en una zona de temperaturas inferior a la zona, ya rebasada, de crecimiento. Tras el almacenamiento, sin embargo, cuando el sistema se recalienta, el núcleo de hielo formado eventualmente durante el enfriamiento, tendrá que atravesar todo el rango de temperaturas, y en particular, la zona de crecimiento, o sea, de temperaturas más altas, donde la viscosidad es más baja y puede crecer. Así, aunque no hayan aparecido grandes cristales de hielo durante el enfriamiento, estos si pueden aparecer durante el calentamiento: es la recrystalización. Por otra parte, al ser la nucleación un fenómeno estocástico, incluso si esta pudo no darse durante el enfriamiento, si puede ocurrir durante el calentamiento (con el subsiguiente crecimiento del cristal); en este caso se habla de devitrificación. La forma de evitar tanto la recrystalización como la devitrificación es atravesar la zona de crecimiento muy rápidamente, de manera que se llegue a temperaturas suficientemente altas mucho antes de que las dimensiones alcanzadas por el cristal comprometan la viabilidad biológica del sistema. El objetivo que persigue la presente invención consiste precisamente en recalentar todo el sistema a altas velocidades. Este calentamiento, evidentemente, tiene que ser uniforme; de lo contrario, las zonas aun sólidas y frías inducirían la formación de hielo en las zonas que ya hayan sido fundidas por un calentamiento más rápido.

30 Históricamente han aparecido otras estrategias para evitar el problema de la recrystalización/devitrificación encaminadas hacia el mismo fin, que se describen a continuación:

- 1) Formulación de cocktails de crioprotectores con baja toxicidad (Fahy GM, 2010). Como decimos, a mayor concentración menor es la velocidad a la que muestra necesita ser enfriada o recalentada. Para concentraciones muy altas, por encima de 8

molar, el sistema puede ser enfriado y recalentado a cualquier velocidad sin que se forme hielo. Por tanto, la solución inmediata sería usar una concentración tal alta como haga falta. El problema es que a estas concentraciones, los crioprotectores usuales son altamente tóxicos. Por ello, una estrategia explorada extensamente ha sido tratar de reducir su toxicidad. Para una concentración total dada, la combinación de varios de ellos en una misma solución ha demostrado ser menos tóxica que la presencia de uno solo en esa misma concentración total. Sin embargo, aunque esta vía alivia el problema y es posible enfriar el sistema sin formar hielo, aún siguen siendo necesarias velocidades de recalentamiento superiores a las alcanzables con la tecnología actual, para órganos grandes (Fahy G.M., 2016).

2) Liquidus Tracking (Pegg D.E., 2006). Trata de sacar partido del hecho de que la toxicidad es tanto menor cuanto más baja es la temperatura. De esta forma Farrant, Elford, Walter y Pegg (Farrant J., 1965, Pegg D.E., 2006) han desarrollado la idea de ir aumentando la concentración de crioprotector a medida que la temperatura del sistema va disminuyendo. Dicho con otras palabras, en cada instante la concentración de crioprotector es justo la necesaria para evitar la formación de hielo a la temperatura a la que se encuentra el sistema en ese momento. Este seguimiento de la curva de equilibrio sólido-líquido da el nombre a la técnica: liquidus tracking. Sin embargo, dicho seguimiento, en la práctica, conlleva grandes dificultades. De una parte, al bajar la temperatura aumenta la viscosidad de la solución y desciende la permeabilidad de las membranas, dificultando -e incluso imposibilitando- el seguimiento de la curva de líquido en muchos casos. De otra, es necesario monitorizar permanentemente la concentración de crioprotector que realmente está entrado dentro del tejido, asegurando que todas sus partes están correctamente protegidas; esta monitorización, empero, no es trivial (Risco R., 2017, Gallardo M., 2016, Corral A., 2014).

3) Uso de altas presiones (Kaech A., 2014). La relación entre la concentración de crioprotector y la velocidad mínima de enfriamiento o recalentamiento para no formar hielo varía con la presión. Generalmente se supone que se está trabajando a presión atmosférica, y es en estas condiciones donde se han realizado la inmensa mayoría de los experimentos. Sin embargo es posible plantear escenarios donde se trabaje en condiciones hiperbáricas. En este caso, la relación entre la velocidad de enfriamiento (y de recalentamiento), y la concentración mínima de crioprotector, se ve afectada favorablemente; para una misma concentración se requieren menores velocidades de enfriamiento y recalentamiento para no formar hielo. La principal limitación de esta

estrategia reside en el hecho de que los sistemas biológicos no soportan las altas presiones requeridas.

5 4) Preservación isocórica (Rubinsky B., 2005). Es una técnica similar a la anterior, pero la alta presión se consigue llenando un recipiente de paredes rígidas con la solución hasta enrasarlo y después cerrándolo herméticamente. Así, cuando el sistema empieza a enfriarse y aparece hielo (fuera del sistema biológico), este, al ocupar un volumen superior al que ocuparía la misma cantidad de agua en estado líquido, hace que la presión aumente de forma natural en el interior del recipiente (dado que está cerrado de forma estanca y sin aire, como decimos, y sus paredes son rígidas). Dicho aumento de presión conlleva los mismos beneficios y perjuicios que los establecidos en la criopreservación hiperbárica, descrita en el apartado anterior.

15 5) Recalentamiento por microondas (Evans, 1993). El uso de microondas para el recalentamiento ha sido profusamente investigado. Es cierto que consiguen una alta velocidad de recalentamiento, y durante mucho tiempo han sido, y siguen siendo, un candidato ideal para evitar el problema de la recristalización/devitrificación. Hay, sin embargo, una limitación importante en su uso: es el fenómeno llamado “thermal runaway”, que describiremos a continuación y que impide un calentamiento uniforme de la muestra. Se sabe que la radiación de microondas consigue calentar de forma eficiente cualquier molécula polar, como el agua, las proteínas o las grasas. Sin embargo, si las microondas son producidas de la forma habitual, dentro de una cavidad (horno microondas), aparecen indefectiblemente ondas estacionarias, con vientres y nodos, donde el campo electromagnético tiene una intensidad muy alta o es despreciable, respectivamente. Ello hace que existan puntos que se calienten rápidamente y otros que no. Pero el problema incluso se agrava, debido a que los puntos más calientes modifican su constante dieléctrica y absorben más fácilmente la radiación, de manera que estos puntos más calientes acaban calentándose todavía más, distanciándose en temperatura, irreversiblemente, de las zonas más frías. Por último, la absorción de las microondas en las regiones más grasas es superior a la del resto del tejido. Esta diferente absorción se traduce también en un calentamiento poco uniforme, siendo de nuevo aplicable el problema del thermal runaway descrito anteriormente.

35 6) Proteínas anticongelantes y “ice blockers” (DeVries A.L., 1969, Wowk B., 2013). Son moléculas capaces de reducir la formación de hielo sin atender a motivos coligativos, como ocurre con los crioprotectores convencionales. Sus mecanismos de acción son aún motivo de investigación. En el caso de las proteínas anticongelantes,

parece establecido que es su adhesión al hielo, limitando el crecimiento del cristal, la que juega un papel fundamental. En el caso de los “ice blockers”, por contra, no existe un claro consenso aún. Ambos, proteínas anticongelantes y “ice blockers” se suelen utilizar en concentraciones muy bajas. Sin embargo, aunque aportan un beneficio evidente, no consiguen eliminar todo el hielo que se puede generar incluso en las mejores condiciones presentes.

7) Flowlock (Fahy G.M, 2016). Cuando un órgano es perfundido a través de su sistema vascular, al bajar la temperatura, como decíamos anteriormente, la viscosidad aumenta, dificultado la carga de crioprotector. Flowlock es una técnica consistente en aumentar la presión de perfusión cuando esto ocurre, de manera que el flujo se mantenga siempre alto. Con esta técnica se ha conseguido cargar un órgano, un riñón de conejo, tanto como para evitar la formación de hielo durante el enfriamiento, aunque que no suficientemente como para evitar la aparición del mismo durante el recalentamiento.

8) Nanowarming (Etheridge, M. L, 2014, Bischof J.C., 2013). Es una técnica prometedora capaz de calentar de forma rápida y homogénea todo el órgano. Se basa en la adición de partículas ferromagnéticas a la solución crioprotectora. Estas partículas, en presencia de un campo magnético alterno, generan corrientes inducidas y ciclos de histéresis magnética que conllevan su calentamiento. Así, cada partícula actúa como un foco de calor desde el interior del órgano. La toxicidad de estas partículas y la poca uniformidad de los campos generados con los dispositivos actuales son los mayores retos que están siendo abordados actualmente.

9) Uso de partículas magnéticas unidas a proteínas anticongelantes (Risco R., 2017), magnetic ice binding particles. Las proteínas anticongelantes, como dijimos, basan su acción en la afinidad que tienen por los núcleos de hielo. En principio es posible imaginar un complejo formado por la unión de partículas magnéticas y proteínas anticongelantes. Cuando eventualmente aparezca un núcleo de hielo, este complejo se unirá preferente al mismo. La posterior aplicación de un pulso de radiofrecuencia, ya sea durante el proceso de enfriamiento, almacenamiento o recalentamiento, conseguirá fundir el núcleo de hielo, impidiendo, de manera radical, su indeseable crecimiento.

En definitiva, a pesar de los esfuerzos realizados para alcanzar el óptimo recalentamiento de muestras criopreservadas, ninguna de las técnicas y enfoques desarrollados hasta el momento han reportado resultados de forma rutinaria y

reproducibles hasta el punto de ser aplicables. Esto intensifica el estudio y desarrollo de nuevos enfoques con el fin de superar estos obstáculos y conseguir un proceso de recalentamiento más seguro y eficaz.

Ultrasonido focalizado de alta intensidad

5 Los Ultrasonidos de Alta Potencia (HPU, High Power Ultrasound) han adquirido especial relevancia durante los últimos años, llegando además a desarrollarse aplicaciones comerciales a gran escala. Entre las variantes de los HPU, los ultrasonidos focalizados de alta potencia (HIFU, High Intensity Focused Ultrasound), técnica no invasiva, han ganado popularidad recientemente en Medicina. Esta técnica
10 consiste en la aplicación de un haz de ultrasonidos de alta frecuencia y alta energía para producir el calentamiento del tejido hasta que se alcanzan temperaturas en el campo comprendido entre 55 y 100 °C, con la particularidad de que los tejidos colindantes no quedan afectados.

La técnica HIFU se ha utilizado recientemente en trastornos musculoesqueléticos
15 (Aydin, 2016), cardiovasculares (patente US 20050209588 A1 (Ghanouni, 2017)), endocrinos (Kovatcheva, 2014), neurológicos (patente US 8206299 B2 (Mead, 2017)), u oncológicos (Zhou,2011; Knuttel, 2017). De hecho, en el campo de la Oncología es donde más aplicaciones se han desarrollado durante las últimas décadas (patente WO 2014174395A1 (Zhou,2011)), siempre con el objetivo de eliminar células diana
20 mediante las altas temperaturas conseguidas (ablación térmica). Entre las patentes registradas, se destaca US8845559B2 (Darlington, 2014), la cual protege un método y dispositivo para tratar tejidos con HIFU. Específicamente, en esta patente, el dispositivo descrito se usa para minimizar el tiempo de exposición y optimizar la delimitación de la zona de tejido donde se aplica la energía de los ultrasonidos; dos de
25 los problemas definidos como los más importantes en la aplicación práctica de esta tecnología

A pesar de la probada efectividad de los HIFU en este tipo de aplicaciones médicas, hasta la fecha no se tiene constancia de la aplicación de esta técnica en el campo de la criopreservación. De hecho, a día de hoy, con transductores comerciales se alcanza
30 un aumento de temperatura de unos 20 °C en un segundo, con un foco aproximado de unos 2x2x15mm. Estas características son suficientes para la mayoría de las aplicaciones hasta la fecha; en concreto, generalmente, cuanto más focalizados sean los ultrasonidos, mejores resultados de recalentamiento se obtienen. Del mismo modo, en el campo de la criopreservación de órganos, sería necesario conseguir una

velocidad de recalentamiento similar a los reportados (Aydin, 2016; Ghanouni, 2017; Zhou, 2011; Knuttel, 2017) en las aplicaciones desarrolladas hasta la fecha, pero con la importante salvedad de que ahora la muestra (órgano) tiene un volumen de varios órdenes de magnitud superior, por lo que, para obtener un recalentamiento homogéneo, se debería de aumentar el área focal. Con esto se podría impedir el crecimiento de los pequeños cristales de hielo (eventualmente formados previamente formado en el proceso de vitrificación) durante el recalentamiento (Pegg, 2010). Una velocidad en torno a 55 – 100 °C/min sería suficiente para evitar la recristalización, aunque esta velocidad dependerá también en función de la concentración de crioprotector utilizado. A menor concentración de crioprotector, mayor velocidad de recalentamiento sería necesaria, motivo por el cual se trata de minimizar su concentración.

Igualmente, es necesario conseguir un recalentamiento homogéneo del material biológico, lo que implica aumentar la zona focal conseguida en la mayoría de los trabajos reportados (Aydin, 2016; Ghanouni, 2017; Zhou, 2011; Knuttel, 2017) hasta un área similar a la de un órgano o zona de tejido.

Tecnologías complementarias para la monitorización y el control de la temperatura

Para conseguir la recuperación efectiva del material biológico criopreservado, es preciso contar con una técnica de termografía que monitorice el calentamiento mediante HIFU. El objetivo es controlar el proceso de calentamiento, evitar el crecimiento de pequeños cristales de hielo (eventualmente formados en el proceso de vitrificación) y no dañar el material biológico usando temperaturas excesivamente elevadas.

En algunos de los trabajos publicados sobre aplicaciones de HIFU se utiliza la técnica de imágenes por resonancia magnética (MRI, Magnetic Resonance Imaging) como medio de monitorización de la temperatura y, por tanto, como control de la energía de ultrasonidos aplicada (Jolesz, 2009, Ghai, 2015).

MRI es una técnica que utiliza campos magnéticos y pulsos de radiofrecuencia para obtener información sobre la estructura y composición del cuerpo a analizar. Mediante campos magnéticos de alta intensidad se consigue la alineación de protones del material (habitualmente agua) con este campo. Seguidamente, se introduce un pulso de radiofrecuencia que perturba al protón y lo re-orienta en un ángulo de 90 ó 180 grados con el campo magnético estático. Cuando el pulso de radiofrecuencia es apagado, el protón se vuelve a alinear con el campo magnético, liberando energía

electromagnética con una velocidad característica para cada tejido u órgano, que es detectada por el escáner. El tejido puede ser caracterizado mediante diferentes tiempos de relajación, como T1 (tiempo de relajación longitudinal), que determina el tiempo en el que los protones excitados vuelven a su estado de equilibrio, o T2 (tiempo de relajación transversal), que determina el tiempo en el que los protones excitados vuelven a su estado de equilibrio o pierden la coherencia de fase entre ellos.

La intensidad de la señal MRI depende, igualmente, de la temperatura. Es posible obtener imágenes termográficas en 3 dimensiones para obtener información de la temperatura del material biológico. La utilización de MRI también ha sido propuesta para monitorizar temperaturas bajo cero, en el caso de la crioblación o criocirugía, tratamiento que utiliza el frío para congelar y destruir un tejido enfermo (Pease, 1995; Matsumoto, 1992; Gilbert, 1996; Hong, 1994). La US 5433717 (Boris, 1995) describe medidas MRI (T1) para controlar el proceso de crioblación, determinando la distribución de temperatura en regiones de tejido no congelados. La US 6032068A (Daniel, 2000) utiliza la intensidad de la señal MRI y el tiempo de relajación T2 para monitorizar la temperatura de tejido congelado, de utilidad en aplicaciones de criocirugía. En (Lu, 2011) se demuestra la dependencia de la fase medida en MRI con la temperatura.

Desde hace algunos años, los métodos para utilizar MRI en sólidos, en donde la resolución espectral (la relación señal – ruido) es menor que en los líquidos, han evolucionado enormemente, utilizándose en diferentes aplicaciones médicas, como en el análisis óseo (Wu, 1999). Técnicas como MagicAngle Spinning (MAS) combinadas con gradientes de campos pulsados rotatorios se han propuesto para mejorar la resolución espacial y la relación señal – ruido. (Yon, 2017).

El uso conjunto de ultrasonido focalizado de alta intensidad y MRI (para su monitorización y control) se ha propuesto para diversas aplicaciones médicas, sobre todo en el área oncológica, como en el caso del tratamiento del cáncer de próstata (Ghai S., 2015) o en neurología (Fishman, 2017). En (Ghai, 2015) las imágenes térmicas obtenidas con MRI, superpuestas a las imágenes de trayectorias del ultrasonido focalizado, mostraron un buen contraste entre la zona de ablación y el resto del tejido. En (Fishman, 2017), se utiliza el guiado MRI para localizar la zona de calentamiento por ultrasonido focalizado en una región concreta del cerebro, con resultados igualmente satisfactorios. En la patente US 20100106005 se protege el uso de imágenes MRI para guiar el campo de ultrasonidos focalizados de alta intensidad en aplicaciones de ablación de células cancerígenas. En este trabajo, las marcas de

ablación se generan estratégicamente en la región tisular diana y se administra un agente de contraste por vía intravenosa de manera que el ultrasonido focalizado se usa para coagular vasos sanguíneos en una región determinada, en un punto donde la concentración de los agentes de contraste es máxima. La ablación de los vasos sanguíneos en un área pequeña y bien definida permite la localización del agente de contraste, lo que hace que el marcado sea muy claro. Este sistema se protege conjuntamente con un sistema de radioterapia e imagen mediante CT (ComputedTomography) para optimizar el tratamiento de radioterapia. La patente WO2015148938A2 protege un método y sistema basados en MRI para la orientación, monitorización y cuantificación de los efectos biológicos, térmicos y mecánicos en tejido inducidos por HIFU, utilizando distintas imágenes MRI, entre las que incluye imágenes T1 y T2.

De igual forma, también se han utilizado imágenes de ultrasonidos para el guiado de HIFU en diferentes aplicaciones (Kovatcheva, 2015, Zhou, 2011). Este sistema diagnóstico tiene un bajo coste y una gran facilidad de integración en el sistema completo de HIFU. Sin embargo, la precisión obtenida con esta técnica es menor que con la imagen MRI.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El procedimiento y dispositivo de la presente invención resuelve los problemas explicados en el apartado anterior. Con la presente invención se consigue un calentamiento rápido y homogéneo del tejido u órgano criopreservado, evitando de esta forma el crecimiento de cristales de hielo durante su recalentamiento desde temperaturas criogénicas. Ello se realiza mediante la utilización de ultrasonidos focalizados de alta intensidad (HIFU, por sus siglas en inglés).

El sistema descrito permite el recalentamiento ultrarrápido y homogéneo de tejidos y órganos mediante unos transductores ultrasónicos de unas dimensiones adecuadas, capaces de conseguir una zona de calentamiento focal adaptada al tamaño del sistema biológico diana. Este aumento comparativo en el tamaño de la zona focal con respecto a los sistemas HIFU utilizados actualmente se puede conseguir igualmente mediante un conjunto (array) de transductores rodeando al material biológico en cuestión.

Se hace necesario conseguir un recalentamiento homogéneo del material biológico, lo que implica aumentar la zona focal hasta un área similar a la de un órgano o zona de tejido. Esto se consigue aumentando el área de los transductores de ultrasonidos unas pocas decenas de cm modificando la geometría de estos, o utilizando un conjunto de transductores lo cual sería suficiente para muchas de las aplicaciones de criopreservación de tejidos y órganos.

Mediante HIFU (ya sea con un transductor de gran tamaño o bien con un conjunto de transductores) se garantiza que el recalentamiento del material biológico criopreservado sea lo suficientemente rápido como para evitar el fenómeno de la recristalización/devitrificación, y lo suficientemente homogéneo como para asegurar la viabilidad del material biológico. Para alcanzar la velocidad de calentamiento necesaria, así como la homogeneidad de proceso, es necesario optimizar una serie de parámetros tales como la 1) potencia, 2) la intensidad, 3) la frecuencia y 4) el material y tamaño de los transductores, entre otros.

La potencia de los HIFU debe ser suficientemente elevada, para conseguir llegar a temperaturas seguras antes de que el cristal de hielo haya tenido de crecer. Generalmente, una velocidad de recalentamiento próxima a 100 °C/minuto es suficiente, aunque este valor depende de la concentración de crioprotector utilizado, tal y como se ha explicado anteriormente. Sin embargo, potencias muy elevadas pueden generar un aumento de los gradientes de temperaturas dentro del órgano. Por ello, se debe conseguir un compromiso entre la geometría del sistema, la frecuencia utilizada, la potencia aplicada y las dimensiones del órgano. De todo ello se da buena cuenta en los ejemplos descritos en la siguiente sección.

La intensidad de los ultrasonidos (relacionada con la potencia a través de la superficie del transductor, $P=I \cdot m^2$) debe ser adaptable, para controlar la velocidad de recalentamiento (evitando la recristalización/devitrificación).

La frecuencia de los ultrasonidos debe ser también adaptable, para optimizar la penetración de las ondas ultrasónicas en el material biológico; a menor frecuencia, mayor penetración de las ondas ultrasónicas en el material biológico.

Los transductores de ultrasonido podrán ser en principio de cualquier tipo de material piezoeléctrico, capaz de transformar energía eléctrica en mecánica, con una frecuencia superior a los 16.000Hz (para ser considerados ultrasonidos). Sin embargo, los transductores cerámicos son especialmente indicados por sus características de potencia y frecuencia. Así mismo, el tamaño de la superficie de los transductores

empleados debe ser suficientemente grande (en torno a varias decenas de centímetros) como para permitir el calentamiento homogéneo de la región focal donde se encuentra el material tejido u órgano diana.

5 Para mejorar la penetración de las ondas ultrasónicas en el material biológico y evitar reflexiones indeseadas en la interfase líquido – sólido (el material biológico a recalentar está en estado vítreo, con propiedades acústicas propias de los sistemas sólidos) se seguirá un procedimiento en el que consiga un gradiente progresivo del grado de solidificación de la muestra. La inmersión de la muestra en un baño de agua a 37 °C durante un corto espacio de tiempo (en torno a los 20 segundos) conseguirá
10 este gradiente la interfase líquido – sólido, minimizando las reflexiones producidas en la interfase.

Por último, se propone la utilización de técnicas de termografía para la monitorización del recalentamiento de material biológico criopreservado con HIFU. En concreto, se propone la utilización de la imagen por ultrasonidos, siendo de bajo coste y gran
15 facilidad de integración en el sistema HIFU, o la termografía MRI, de más precisión aunque de mayor coste, dependiendo de la aplicación concreta de criopreservación que se trate.

Dentro de la aplicación de termografía MRI, se aplicará la técnica de MRI en estado sólido para el tejido u órgano vitrificado, en un sistema MRI que sea capaz de realizar
20 espectrometría junto con la imagen.

Para mejorar la imagen MRI se podrá utilizar algún agente de contraste (como óxidos de hierro, agentes de rayos X con gadolinio, agentes de rayos X yodados convencionales, agentes de contraste detectables visualmente o agentes de contraste de ultrasonido), y en general, cualquier agente de contraste mediante el cual se pueda
25 obtener una señal de MRI que sea dependiente de la temperatura, como puede ser el caso de agentes crioprotectores (como glicerol, etilenglicol, etc.).

Asimismo en la presente invención se propone un nuevo uso para las diferentes técnicas de termografía (MRI o ultrasonidos) para el guiado de procesos de calentamiento de material biológico criopreservado mediante HIFU.

30

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

5
Figura 1.- Muestra una gráfica en la que se representa la recristalización y crecimiento del hielo en una solución de vitrificación de acuerdo con el estado de la técnica conocido.

10
Figura 2.- Muestra un primer ejemplo de configuración de transductores o primer modelo en la que se observa un órgano rodeado de un conjunto de 6 transductores con forma de casquete esférico, de manera que dos transductores están enfrentados entre sí en los tres ejes coordenados.

15
Figura 3.- Muestra una gráfica para el primer modelo en la que se ha representado la velocidad de calentamiento (K/min) en función de la frecuencia (kHz) a 100W de Potencia.

Figura 4.- Muestra una gráfica para el primer modelo en la que se ha representado la velocidad de calentamiento (K/min) en función de la Potencia (W) a una frecuencia fija de 400 kHz.

20
Figura 5. Muestra una gráfica para el primer modelo en la que se ha representado la Diferencia de temperatura (K) en función de la Potencia (W) a una frecuencia fija de 400 kHz.

25
Figura 6. Muestra un segundo ejemplo de configuración de transductores o segundo modelo en la que se representa un conjunto de 6 transductores de forma cilíndrica tres cilindros en los tres ejes coordenados que se cruzan para configurar una forma de corazón en cuyo interior (y rodeado de hielo) se encuentra el órgano de forma elipsoidal.

30
Figura 7.- Muestra una gráfica para el segundo modelo en la que se ha representado la velocidad de calentamiento (K/min) en función de la frecuencia (kHz) a 300W de Potencia.

Figura 8.- Muestra una gráfica para el segundo modelo en la que se ha representado la velocidad de calentamiento (K/min) en función de la Potencia (W) a una frecuencia fija de 300 kHz.

Figura 9.- Muestra una gráfica para el segundo modelo en la que se ha representado la Diferencia de temperatura (K) en función de la Potencia (W) a una frecuencia fija de 300 kHz.

5 Figura 10A.- Muestra un tercer ejemplo de configuración de transductores o tercer modelo formado por 18 transductores de configuración cilíndrica, en la que se observa la incorporación de hielo entre éstos y el órgano al que rodean (no representado).

Figura 10B.- Muestra la configuración de la figura anterior en la que se ha representado sin hielo, observándose el órgano que presenta forma elipsoidal.

10 Figura 11. Muestra una gráfica para el tercer modelo en la que se ha representado la velocidad de calentamiento (K/min) en función de la frecuencia (kHz) a 33.33 W de Potencia.

Figura 12.- Muestra una gráfica para el tercer modelo en la que se ha representado la velocidad de calentamiento (K/min) en función de la Potencia (W) a una frecuencia fija de 400 kHz.

15 Figura 13.- Muestra una gráfica para el segundo modelo en la que se ha representado la Diferencia de temperatura (K) en función de la Potencia (W) a una frecuencia fija de 400 kHz.

20 Figura 14A.- Muestra un cuarto ejemplo de configuración de transductores o cuarto modelo formado por 26 transductores de configuración cilíndrica, en la que se observa la incorporación de hielo entre éstos y el órgano al que rodean (no representado).

Figura 14B.- Muestra la configuración de la figura anterior en la que se ha representado sin hielo, observándose el órgano que presenta forma elipsoidal.

25 Figura 15.- Muestra una gráfica para el cuarto modelo en la que se ha representado la velocidad de calentamiento (K/min) en función de la frecuencia (kHz) a 25 W de Potencia.

Figura 16.- Muestra una gráfica para el cuarto modelo en la que se ha representado la velocidad de calentamiento (K/min) en función de la Potencia (W) a una frecuencia fija de 300 kHz.

30 Figura 17.- Muestra una gráfica para el cuarto modelo en la que se ha representado la Diferencia de temperatura (K) en función de la Potencia (W) a una frecuencia fija de 300 kHz.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

5 A continuación se describen unos ejemplos de simulación de calentamiento mediante HIFU de un órgano vitrificado, semejante a un riñón de conejo.

Para ello se ha utilizado un software de análisis y resolución por elementos finitos que emplea distintos módulos de aplicación específicos, permitiendo el acoplamiento entre ellos. Para este caso concreto se han utilizado los módulos de acústica y de transferencia de calor. El módulo de acústica permite calcular la densidad de
10 disipación de la onda plana de presión generada por los ultrasonidos focalizados en el dominio de las frecuencias. Por otro lado el módulo de transferencia de calor, a partir de los datos obtenidos previamente en el módulo de acústica, aborda el problema de transferencia de calor al sistema a lo largo del tiempo, durante todo el transitorio.

El objetivo de los ejemplos que se describen seguidamente es comprobar cómo es
15 posible conseguir calentar un órgano de forma homogénea y rápida desde temperaturas criogénicas (-140 °C) hasta temperaturas cercanas a temperatura ambiente, en este caso -20 °C; -20 °C es la temperatura a la cual el órgano ya no corre riesgo de formar hielo y, a su vez, es lo suficientemente baja como para que la toxicidad del crioprotector no sea todavía limitante.

20 Se pretende optimizar el proceso de calentamiento procurando que este se produzca a aproximadamente a 100 °C/min. Esta velocidad garantiza la ausencia de crecimiento de hielo para los crioprotectores y concentraciones que a día de hoy son tolerables por los órganos.

Por otra parte, en lo sucesivo, se ha considerado que un recalentamiento es
25 homogéneo cuando la diferencia de temperatura entre el punto más caliente (centro del órgano) y el punto más frío, no supera los 7 °C de diferencia en ningún momento.

A continuación, se muestran los distintos ejemplos (Ejemplos 1 a 4) empleados para
30 realizar la resolución por elementos finitos. Para todos los ejemplos se ha supuesto un órgano con forma de elipsoide de revolución. Al tener dos semiejes de distinta longitud, representa bien una gran cantidad de potenciales candidatos del uso de esta tecnología.

Por último, una aclaración sobre las unidades: dada la conveniencia de usar grados Kelvin (K) en estos ejemplos, se alternará su uso con el de grados Celsius (°C) usados hasta ahora.

Ejemplo 1

5 En la figura 2 se ha representado un conjunto formado por un órgano (2) rodeado de conjunto de 6 transductores con forma de casquete esférico, de manera que dos transductores (1) están enfrentados entre sí en los tres ejes coordenados y el órgano (2) es de forma elipsoidal de forma que se asemeje a la forma real (riñón).

10 El material de cada transductor es cerámico. Entre el órgano y los transductores normalmente se incorporará hielo, a la misma temperatura del órgano (133K). Entre el transductor y el hielo existe una lámina de agua a temperatura ambiente.

Tomando como referencia un valor de potencia de 100 W, se ha realizado un análisis paramétrico en frecuencias. Se ha obtenido así la frecuencia óptima, o sea, aquella para la cual la velocidad de calentamiento es la más alta, tal y como se muestra en la 15 Figura 3. En ella se observa que a 400 kHz la velocidad de calentamiento alcanza un máximo; por lo tanto, en este modelo se trabajará a esta frecuencia.

Una vez seleccionada la frecuencia que maximiza la velocidad de calentamiento (400 kHz), se ha realizado un barrido en potencias. En la Figura 4 se representa la influencia de la potencia sobre la velocidad de calentamiento y, en la Figura 5 se 20 representa la diferencia de temperaturas entre tres puntos del órgano: entre el centro y los extremos de los dos semiejes del elipsoide (órgano).

Como se puede observar, la máxima diferencia de temperatura permitida (7 °C) se alcanza para una potencia de aproximadamente 134 W. Esta diferencia se da en el extremo del semieje mayor del elipsoide (órgano), lo que era de esperar, pues este 25 punto es el que se encuentra más alejado del foco. A 134 W solo tenemos una velocidad de calentamiento de 50 °C/min, un valor inferior al deseado. Por lo tanto, este modelo, aunque no es el óptimo para esta invención, resulta un interesante punto de partida. Además, dada su simplicidad, puede ser utilizado en sistemas de menor tamaño que un gran órgano, donde las exigencias en potencia y gradientes de 30 temperatura son menores.

Ejemplo 2

A continuación se representa el segundo modelo en la Figura 6. A diferencia del modelo anterior, este cuenta con un espacio entre el conjunto de 6 transductores (1) y

el hielo (3) con el que está recubierto el órgano. En este espacio hay un fluido (agua) que permite la propagación de los ultrasonidos.

5 En este segundo modelo se muestra un órgano rodeado de un conjunto de 6 transductores (1) en forma de tres cilindros en los tres ejes coordenados que se cruzan configurando una forma de corazón en cuyo interior (y rodeado de hielo) se encuentra el órgano de forma elipsoidal.

10 En este ejemplo se tomó como referencia un valor de potencia de 300 W y se realizó un estudio paramétrico en frecuencias, tal y como se muestra en la Figura 7. Se puede observar que a una frecuencia de 300 kHz la velocidad de calentamiento alcanza su valor máximo (175 °C/min).

Seguidamente, para esta frecuencia óptima obtenida (300kHz), se realizó el cálculo de de la velocidad de calentamiento frente a la potencia y así como el cálculo de los gradientes de temperatura. Para cada potencia también se determinó la diferencia de temperatura entre el punto del órgano más frío y más caliente durante todo el proceso.

15 Se observa que a ninguna potencia se obtiene cerca de 100K/min, por lo que se desestima el modelo.

20 En la figura 9 se realiza un barrido de potencias a la potencia óptima para obtener la diferencia de temperaturas en el centro del órgano y en los extremos del elipsoide (en altura o extremo más largo y en anchura o extremo más corto). La diferencia de temperatura es muy elevada, no está en el rango de 5-7 K.

25 De las Figuras 8 y 9 se desprende que la potencia que se necesitaría para obtener una diferencia de temperatura inferior a 7 grados, supondría una velocidad de calentamiento muy inferior a la que se ha tomado como objetivo (100 °C/min). Por lo tanto, este modelo tampoco satisface plenamente los requisitos planteados. Sin embargo, de lo aprendido en estos dos ejemplo se extrae gran parte de la información útil para los dos últimos ejemplos, expuestos a continuación.

Ejemplo 3

30 Para el diseño del tercer modelo se ha tomado como referencia el segundo modelo, aumentando el número de transductores de 6 a 18. De esta forma, los transductores quedan enfrentados dos a dos y equidistantes, tal y como se muestra en la Figura 10A o 10B.

En la figura 10B se observan 18 transductores (1) de forma cilíndrica, sin hielo donde se aprecia el órgano (2) en el interior. El conjunto está formado por nueve cilindros en distintos ejes simétricos que se cruzan formando un conjunto que se asemeja a un corazón. En la figura 10A se ha representado hielo (3) que rodea al órgano (2) de forma elipsoidal mostrado en la figura 10B.

Se comienza con la selección de una potencia de referencia a la que se realiza el correspondiente estudio paramétrico en frecuencia. La potencia usada en este modelo es de 33.33 W y la frecuencia óptima obtenida es 400 kHz. A 800 kHz, la velocidad de calentamiento aumenta significativamente, pero a costa de que la diferencia de temperatura en el órgano sea ligeramente superior a la cota aceptable, de modo que quedó descartada. Como se ve, a mayor número de transductores rodeando al órgano, menor potencia por transductor y menor potencia total, por lo que resulta energéticamente más eficiente. El tamaño de cada transductor también es sensiblemente menor, con las ventajas técnicas en su fabricación que ello conlleva (Ver tabla 1).

Se toma una potencia estimada a partir de la cual se obtiene la frecuencia óptima para la cual la velocidad de calentamiento sea máxima. Se toma el primer máximo ya que el siguiente da gradientes de temperatura excesivos. Se toma una potencia de 33.33 W de referencia y se observa un máximo local en 400 kHz, frecuencia que se toma como óptima, ya que el máximo global es excesivo y daría diferencias de temperaturas superiores a 5-7K en el órgano.

En las Figuras 12 y 13 se representan la velocidad de calentamiento y la variación de temperatura en el órgano, respectivamente.

En la figura 12 se observa la velocidad de calentamiento (K/min) en función de la potencia (W) a una frecuencia fija de 400 kHz. Se realiza un barrido de potencias con la frecuencia óptima para obtener las distintas velocidades de calentamiento para cada una de ellas. Se observa que cerca de 30 W se obtiene la velocidad de calentamiento requerida, por lo que se escoge ésta.

En la figura 13 se observa la diferencia de temperatura (K) en función de la potencia (W) a una frecuencia fija de 400 kHz. Se realiza un barrido de potencias a la potencia óptima para obtener la diferencia de temperaturas en el centro del órgano y en los extremos del elipsoide (en altura o extremo más largo y en anchura o extremo más corto). Se observa que la diferencia de temperatura es aceptable, está dentro del rango de 5-7K.

Se observa que se cumple el requisito de diferencia de temperatura para todo el rango de potencia a la frecuencia óptima obtenida (400kHz). Se alcanza una velocidad de 95 °C/min a 30 W, por lo que esta geometría es la primera viable.

Ejemplo 4

5 A partir de los resultados del Ejemplo 3, se observa que el aumento del número de transductores supone una mejora de los resultados y, aunque el Ejemplo 3 es ya un modelo viable, se plantea un cuarto modelo en el que se aumenta el número de transductores hasta 26, tal y como se muestra en las Figuras 14A y 14B.

10 En la figura 14A se muestra un sistema completo de 26 transductores de forma cilíndrica con hielo y en la figura 14B el sistema completo de 26 transductores de forma cilíndrica sin hielo donde se aprecia el órgano en el interior. El sistema está formado por trece cilindros en ejes simétricos que se cruzan dando lugar a una forma que se asemeja a un corazón en cuyo interior (y rodeado de hielo) se encuentra el órgano de forma elipsoidal.

15 Al igual que en los modelos anteriores, se presenta la potencia elegida para realizar el estudio paramétrico en frecuencia y obtener así aquella a la que se consigue una mayor velocidad de calentamiento. Para ello, se escoge una potencia de 25 W donde se observa un máximo local en velocidad de calentamiento a 300 kHz. Como ocurría en el ejemplo 3, a partir de 500 kHz la velocidad de calentamiento aumenta notablemente. Sin embargo, aparece una diferencia de temperatura en el órgano mayor que 7 °C.

20 En la figura 15 se representa la velocidad de calentamiento (K/min) en función de la frecuencia (kHz) a 25 W de Potencia. Se toma una potencia estimada a partir de la cual se obtiene la frecuencia óptima para la cual la velocidad de calentamiento sea máxima. Se toma el primer máximo ya que el siguiente da gradientes de temperatura excesivos. Como en casos anteriores se toma una potencia estimada de referencia, partir de la cual se realiza un barrido de frecuencias para obtener la que da la máxima velocidad de calentamiento. Esta está en 300 kHz.

25 En la figura 16 se representa la velocidad de calentamiento (K/min) en función de la potencia (W) a una frecuencia fija de 300 kHz. Se realiza un barrido de potencias con la frecuencia óptima para obtener las distintas velocidades de calentamiento para cada una de ellas. A esa frecuencia vemos que a 20W se obtienen los 100K/min por lo que escogemos ésta.

En la figura 17 se representa la diferencia de temperatura (K) en función de la Potencia (W) a una frecuencia fija de 300 kHz. Se realiza un barrido de potencias a la potencia óptima para obtener la diferencia de temperaturas en el centro del órgano y en los extremos del elipsoide (en altura o extremo más largo y en anchura o extremo más corto). La diferencia de temperatura está dentro del rango aceptable de 5-7K.

Por ello, en este ejemplo, para una frecuencia a 300 kHz se optó por potencia a 20 W. Ahora sí se obtiene una diferencia de temperatura máxima aceptable. En este modelo, la potencia total que se emplea en calentar el órgano es menor, comparada con los modelos anteriores, por lo que se puede considerar el modelo más eficiente. Esto es debido al aumento del número de transductores (hasta 26 transductores), y a la reducción de su tamaño (ver tabla 3).

Tabla 1. Dimensiones de las distintas geometrías de los ejemplos 1,2,3 y 4.

6 esférica 6 cilíndrica 18 cilíndrica 26 cilíndrica

Radio transductor (cm)	3.5	2.3	1.1	0.4
Separación (cm)	5.0	10.1	7.8	4.0
Altura transductor (cm)	1.5	1.1	0.6	0.2

15

A partir de los Ejemplos 1,2, 3 y 4 se han obtenido como viables los Modelos 3 y 4. A continuación, se muestran los parámetros óptimos de estos dos modelos.

Tabla 2. Modelo 3 (18 transductores):

Frecuencia	400 kHz
Temperatura inicial	-140 °C (133 K)

ES 2 737 697 A1

Temperatura final	-20 °C (250 K)
Radio Transductor	1.1 cm
Potencia	30 W
Amplitud de desplazamiento	133.63 nm
Altura de transductor	0.55 cm
Separación entre transductores	7.7963 cm
Tamaño del órgano	2 x 1.2 x 1.2 cm

Tabla 3. Modelo 4 (26 transductores):

Frecuencia	300 kHz
Temperatura inicial	-140 °C (133 K)
Temperatura final	-20 °C (250 K)
Radio Transductor	0.8 cm
Potencia	20 W
Amplitud de desplazamiento	400 nm
Altura de transductor	0.4 cm
Separación entre transductores	4.05 cm
Tamaño del órgano	2 x 1.2 x 1.2 cm

REIVINDICACIONES

5 1.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad, caracterizado porque comprende las fases de:

- partir de un material biológico criopreservado mediante un proceso de vitrificación,
- aplicar ondas ultrasónicas mediante al menos un transductor de ultrasonido (1) de alta intensidad sobre el material biológico (2) criopreservado a una determinada frecuencia de ultrasonidos y potencia para calentamiento homogéneo y a alta velocidad del material biológico criopreservado que evite la recristalización/devitrificación en el material biológico criopreservado.

15 2.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque la etapa de aplicar ondas ultrasónicas se realiza mediante un conjunto de transductores (1) de alta intensidad dispuestos alrededor del material biológico criopreservado.

20 3.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque el material biológico (2) se cubre con hielo (3) por completo durante la aplicación de ondas ultrasónicas.

4.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque los transductores de ultrasonido son de material piezoeléctrico.

25 5.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque previamente a la aplicación de ondas ultrasónicas sobre el material biológico criopreservado se introduce el material biológico criopreservado en un baño de agua para conseguir un grado de solidificación progresivo del material biológico y para minimizar reflexiones indeseadas de ondas ultrasónicas.

30 6.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque el baño de agua se encuentra a una temperatura en torno a 37°C y el material biológico criopreservado se introduce en torno a 20 segundos.

7.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque la disposición de los transductores, su geometría, tamaño, material, y la frecuencia y potencia aplicada por los mismos sobre el material biológico se seleccionan y regulan de modo que consigan un gradiente máximo de temperatura de entre 5-7°K en distintos puntos del material biológico durante el calentamiento y una velocidad de calentamiento en el entorno de 100°C/minuto.

8.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 2 caracterizado porque los transductores del conjunto de transductores presentan configuración cilíndrica y están dispuestos enfrentados dos a dos y equidistantes alrededor del material biológico.

9.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 8 caracterizado porque el conjunto de transductores comprende 18 transductores.

10.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 8 caracterizado porque el conjunto de transductores comprende 26 transductores.

11.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque durante el proceso de recalentamiento se monitoriza y mide la temperatura del material biológico.

12.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 11 caracterizado porque el proceso de monitorización y medida de la temperatura se realiza mediante técnicas de termografía.

13.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 12 caracterizado porque porque la técnica de termografía utiliza un sistema de imagen por resonancia magnética MRI capaz de realizar espectrometría junto con la imagen.

14.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 13 caracterizado porque el sistema de imagen utiliza un agente de contraste mediante el

cual se pueda obtener una señal de MRI dependiente de la temperatura que mejora la resolución de la imagen MRI.

5 15.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 11 caracterizado porque que el proceso de monitorización y medida de la temperatura se realiza mediante la utilización de la imagen por ultrasonidos.

10 16.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 11 caracterizado porque se controla la intensidad y frecuencia de los transductores a partir de la lectura captada por las técnicas de termografía.

15 17.- Dispositivo de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad caracterizado porque comprende al menos un transductor de ultrasonido de alta intensidad que aplica ondas ultrasónicas sobre el material biológico criopreservado a una determinada frecuencia de ultrasonidos y potencia para calentamiento homogéneo y a alta velocidad del material biológico criopreservado que evite la recristalización/devitrificación en el material biológico criopreservado.

20 18.- Dispositivo de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 17 caracterizado porque comprende un conjunto de transductores de alta intensidad que presentan configuración cilíndrica y están dispuestos enfrentados dos a dos y equidistantes adaptados para disponerse alrededor del material biológico.

25 19.- Dispositivo de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 17 caracterizado porque el conjunto de transductores comprende 18 transductores.

20.- Procedimiento de recalentamiento de material biológico criopreservado basado en ultrasonidos focalizados de alta intensidad de acuerdo con la reivindicación 17 caracterizado porque el conjunto de transductores comprende 26 transductores.

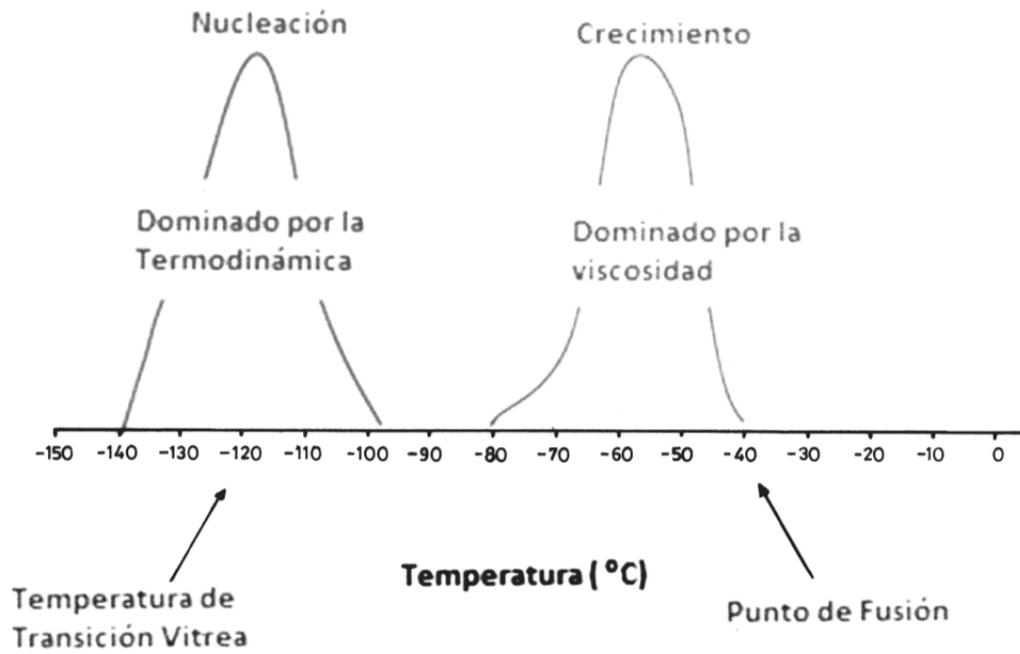


FIG.1
ESTADO DE LA TÉCNICA

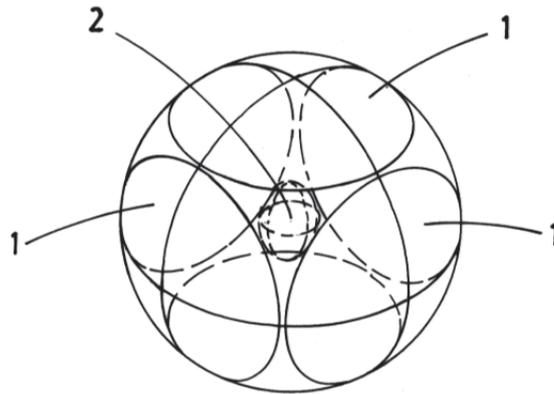


FIG.2

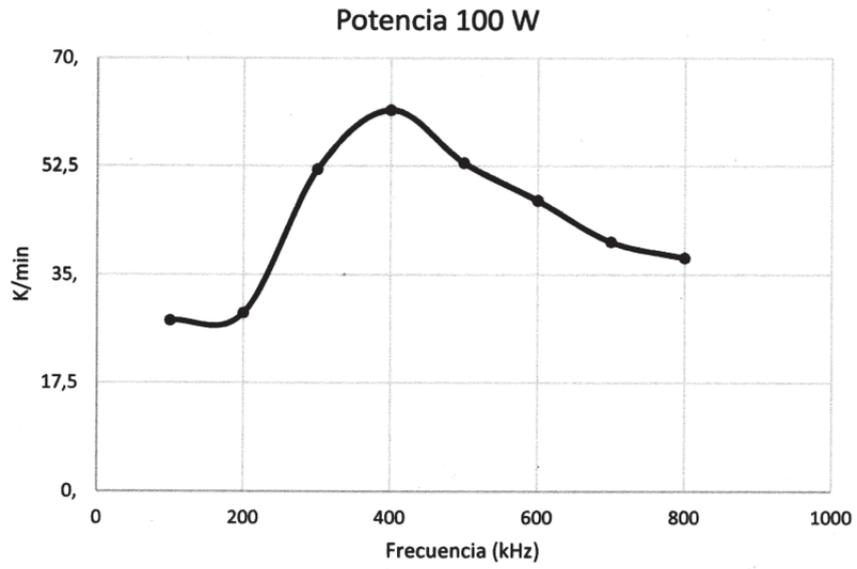


FIG.3

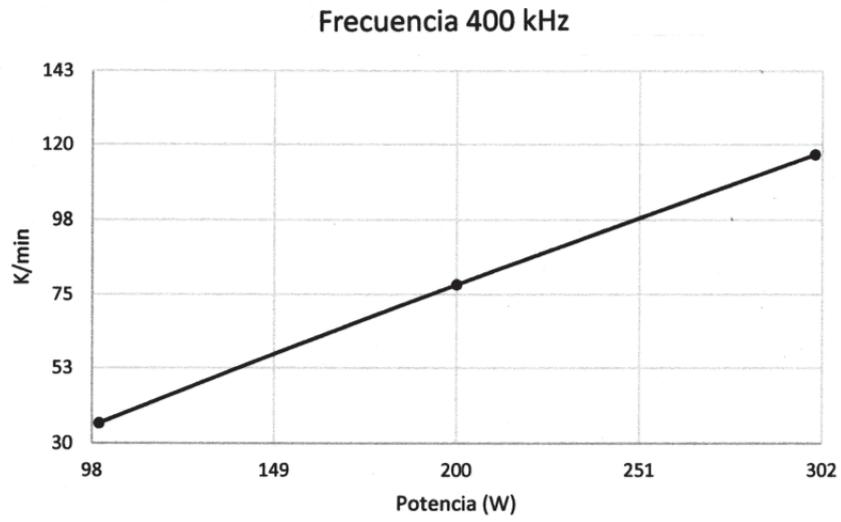


FIG.4

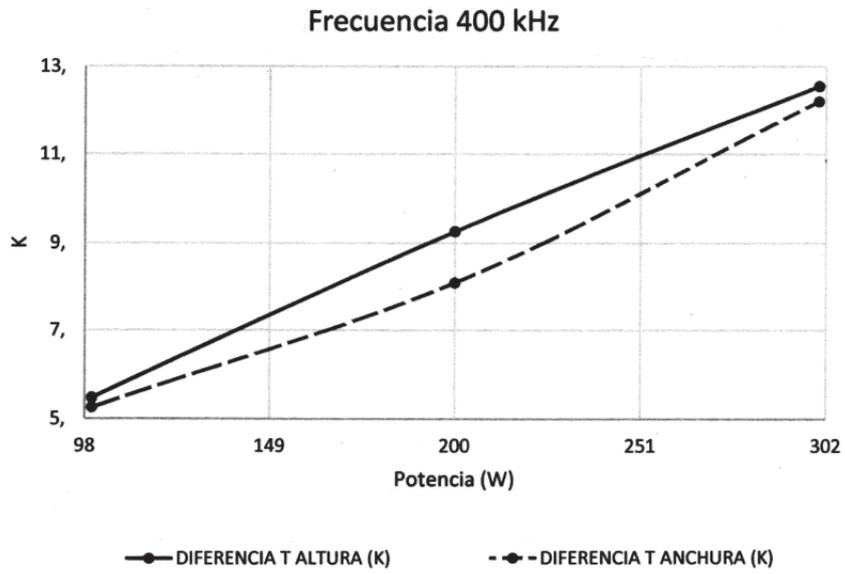


FIG.5

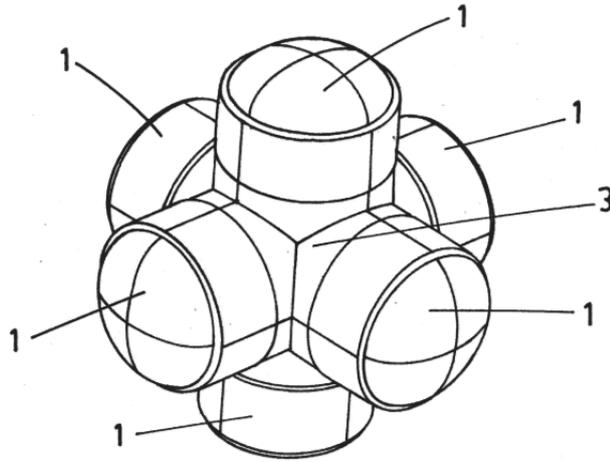


FIG.6

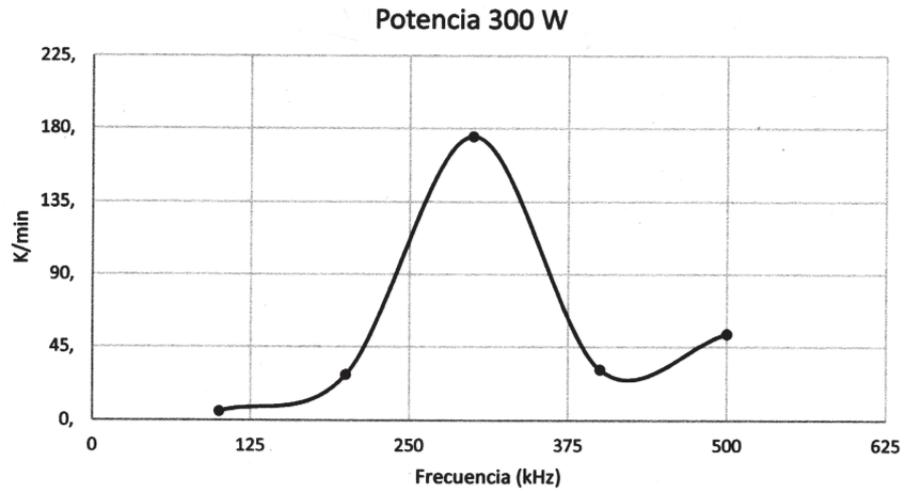


FIG.7

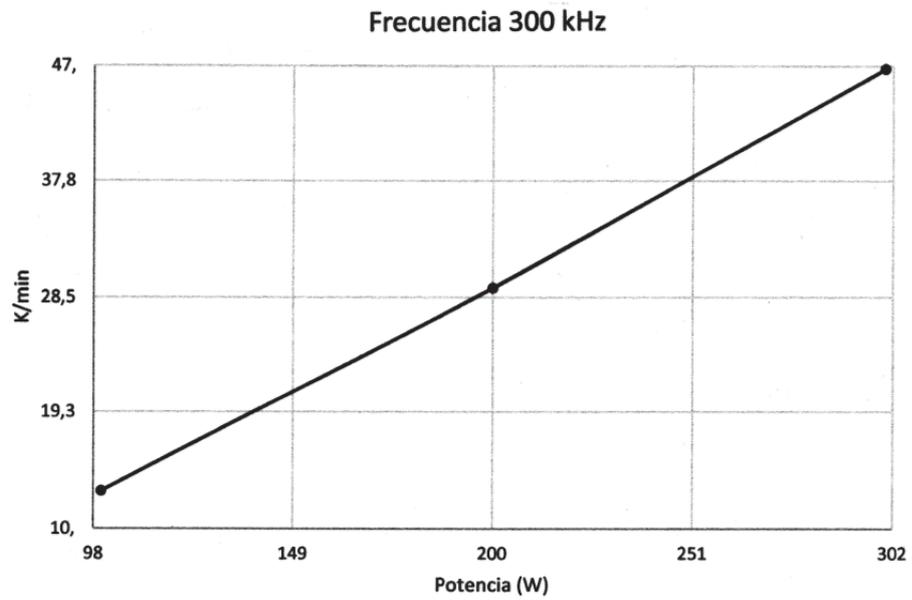


FIG.8

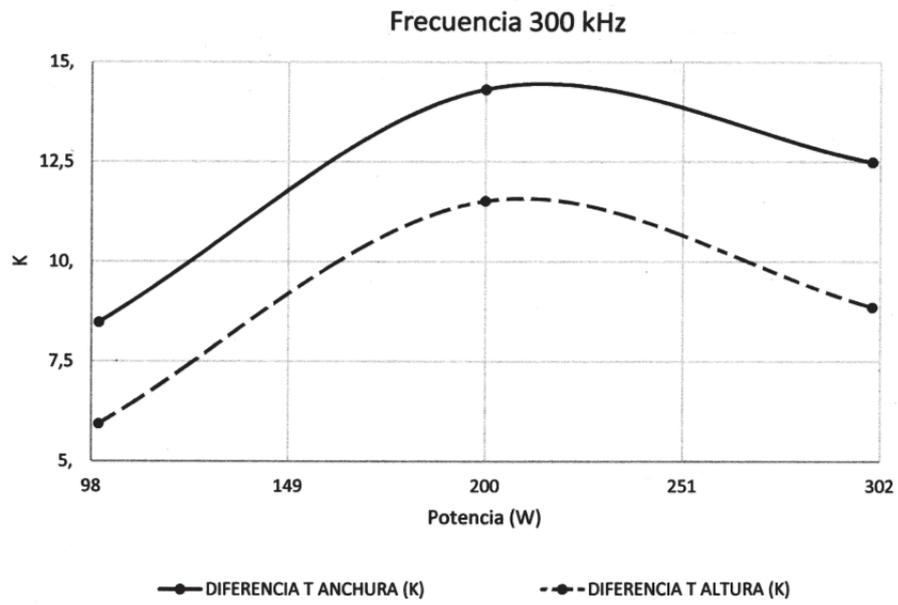


FIG.9

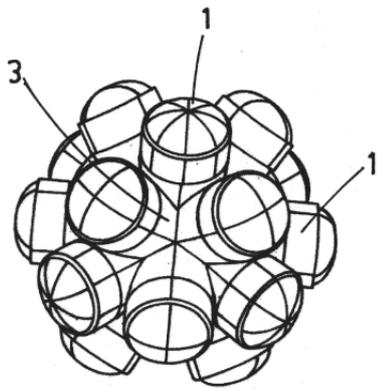


FIG.10A

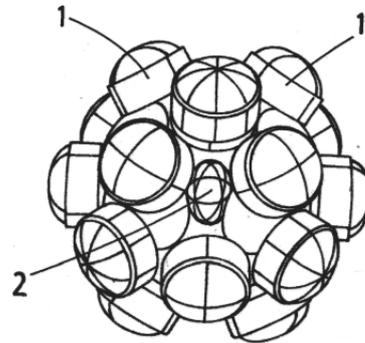


FIG.10B

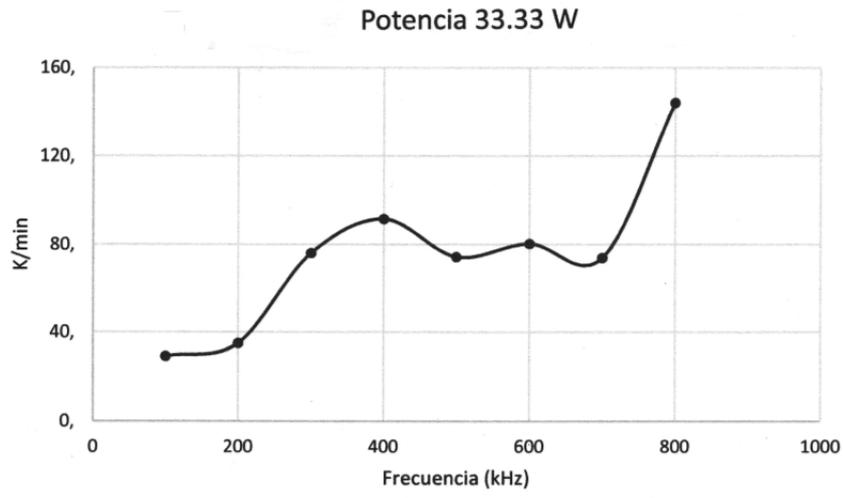


FIG.11

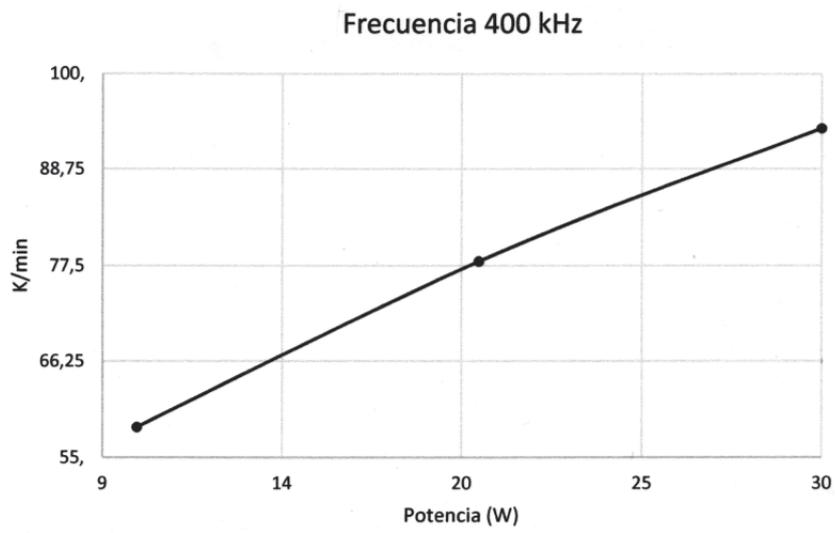


FIG.12

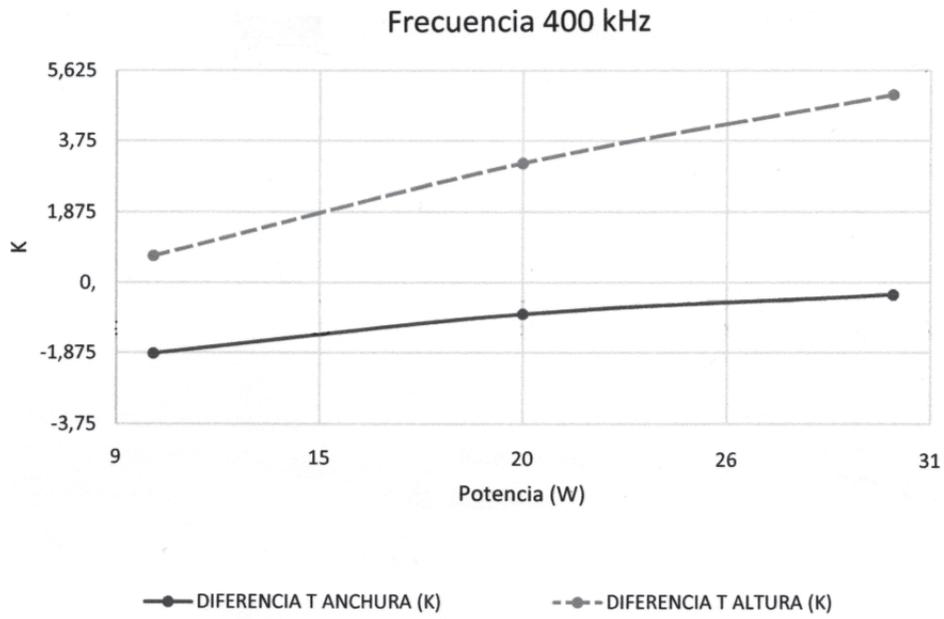


FIG.13

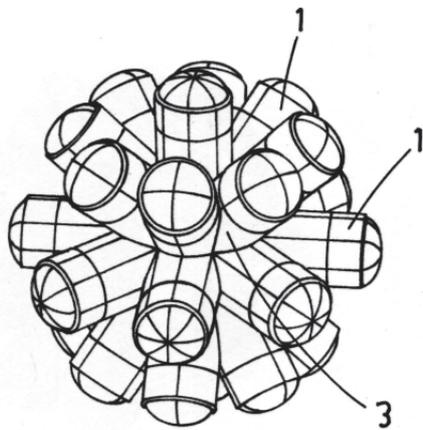


FIG.14A

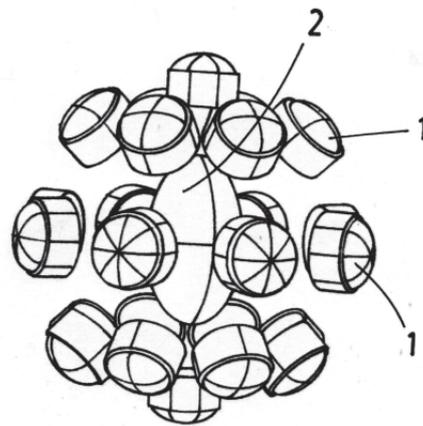


FIG.14B

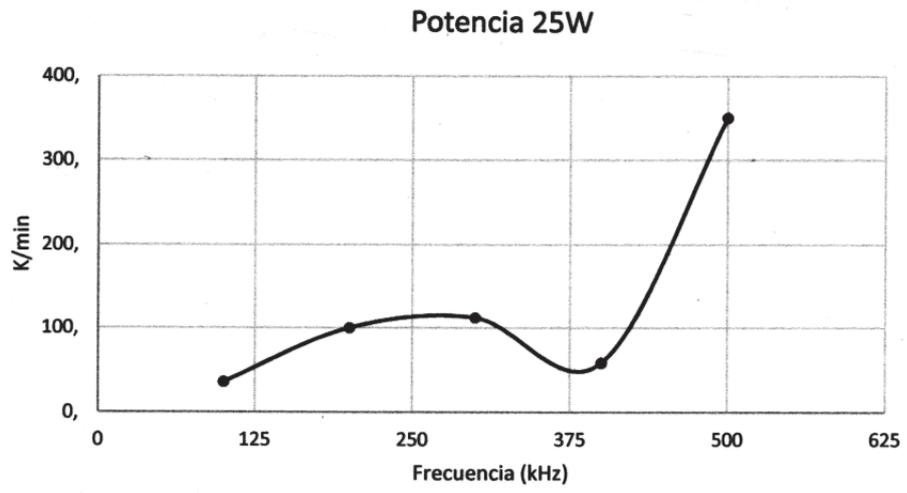


FIG.15

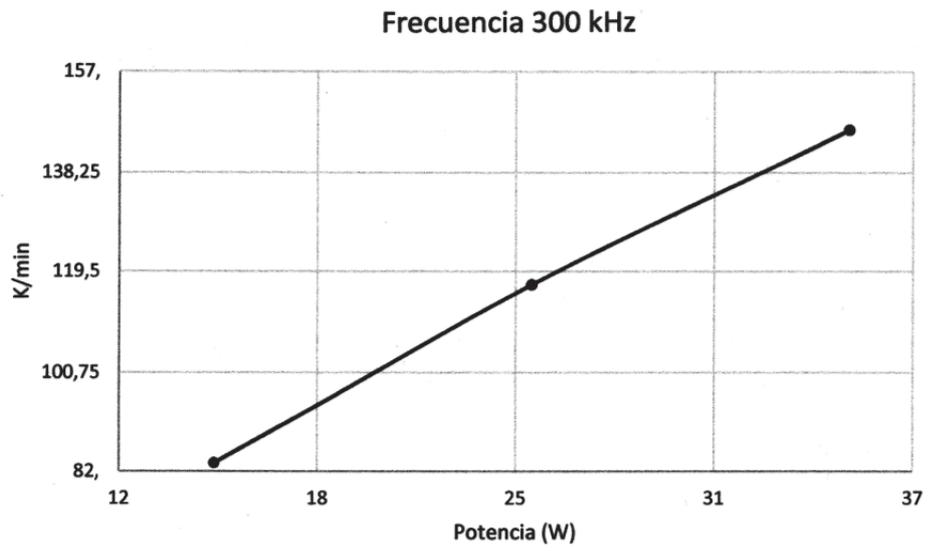


FIG.16

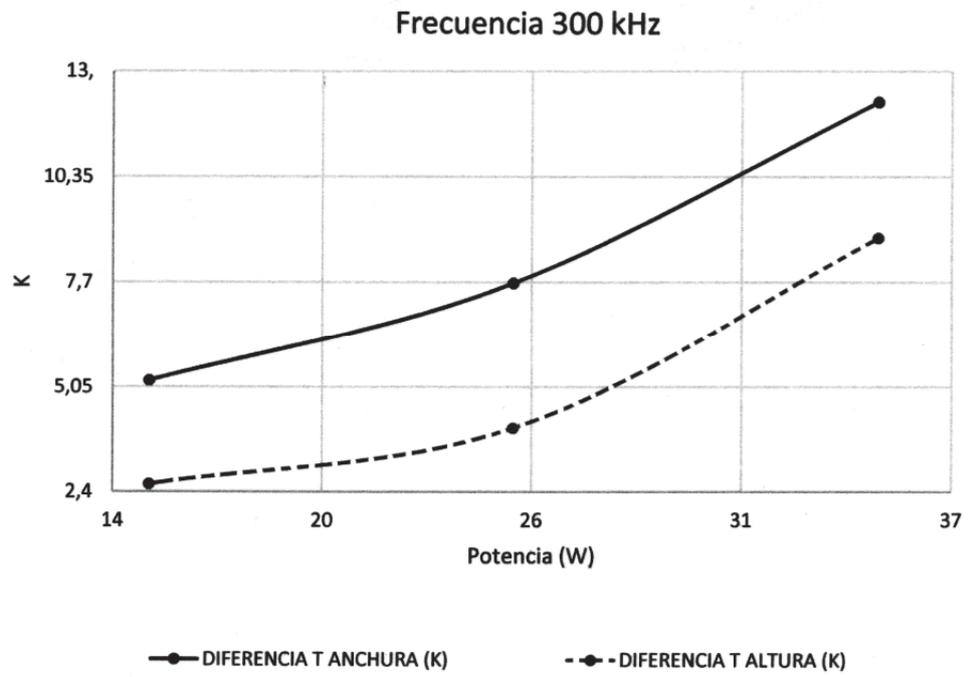


FIG.17



- ②① N.º solicitud: 201830707
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.07.2018
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61B18/04** (2006.01)
A61F7/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MANUCHEHRABADI N. et al. Improved Tissue Cryopreservation using Inductive Heating of Magnetic Nanoparticles. Sci Transl Med, 1/03/2017, Vol. 9, Nº 379	1-20
A	HOCHI, S. et al. Theriogenology, 15/04/1996, Vol. 46, Páginas 837-847	1-20
A	WO 2009049448 A1 (HAITONG FOOD GROUP CO LTD et al.) 23/04/2009, (resumen) Recuperado de: WPI/DERWENT [en línea] [recuperado el 26/09/2018]	1-20
A	DAMIANOU, C. et al. Journal of Biomedical Science and Engineering, 01/01/2010, Vol. 3, Páginas 763- 775	1-20
A	WO 2013153506 A1 (KONINKL PHILIPS NV et al.) 17/10/2013, (resumen)	1-20
A	US 2012232388 A1 (CURRA FRANCESCO P et al.) 13/09/2012 (resumen)	1-20

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
27.09.2018

Examinador
B. Aragón Urueña

Página
1/2

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

A61F

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, XPESP