

**Prototipo de descongelamiento de células eucariotas crio-preservadas mediante procesos de inducción de calor**

**Presentado por:**

Juan Pablo Ortiz Rangel

Duván Andrés Sarmiento Ortiz

Juan Pablo Tarazona Castillo

**Código**

U00109866

U00106845

U00110511

**Director:**

PH.D. Víctor Alfonso Solarte David

**Co-Directora:**

PH.D. Silvia Milena Becerra Bayona

Universidad Autónoma de Bucaramanga

Facultad de Ingeniería

Programa de Ingeniería Biomédica

Bucaramanga

2022

## **Resumen**

La criopreservación es un método que somete a las células a muy bajas temperaturas, con el propósito de conservarlas durante largos periodos de tiempo para su posterior uso. Es importante mantener una alta viabilidad y funcionalidad de las células, tanto al momento de criopreservarlas como al descongelarlas. Actualmente, el método más utilizado para descongelar las células es mediante el uso de baño serológico a 37°C, en el cual se sumerge el criovial en el agua y se somete a una agitación manual. Sin embargo, es conocido que este método posee un riesgo potencial de contaminación, ya sea por la suciedad del agua, la manipulación constante del criovial por parte del operario, el sobrecalentamiento del vial, entre otros factores. Por otra parte, el método convencional no ofrece una trazabilidad, ni automatización del proceso de descongelamiento. Es por esto, que, en este proyecto, se desarrolló una alternativa para el método convencional, proponiendo un prototipo conceptual de descongelamiento de células eucariotas mediante un sistema de inducción electromagnética, ofreciendo al operario la posibilidad llevar la trazabilidad de las muestras, un sistema automatizado, estéril, rápido y reproducible. Por medio de este sistema, se logra una descongelación de las células criopreservadas a -196°C en un tiempo de 2,5 a 2,7 minutos, siempre que la temperatura de setpoint sea establecida en 120°C. Los resultados obtenidos, garantizaron que, bajo estos parámetros de descongelación, fue posible obtener una viabilidad superior al 90%, y no se presentaron diferencias significativas a comparación del método tradicional.

***Palabras clave:*** CMSP, descongelación, inducción electromagnética, viabilidad

**Abstract**

Cryopreservation is a method that subjects cells to very low temperatures in order to preserve them for long periods of time for later use. It is important to maintain high cell viability and functionality, both at the time of cryopreservation and thawing. Currently, the most commonly used method for cryopreserving cells is by using a serological bath at 37°C, in which the cryovial is immersed in water and subjected to manual agitation. However, it is known that this method has a potential risk of contamination, either due to dirty water, constant handling of the cryovial by the operator, overheating of the vial, among other factors. On the other hand, the conventional method does not offer traceability or automation of the cryopreservation process. This is why, in this project, an alternative to the conventional method was developed, proposing a conceptual prototype of eukaryotic cell thawing by means of an electromagnetic induction system, offering the operator the possibility of keeping the traceability of the samples, an automated, sterile, fast and reproducible system. This system achieves cell thawing in 2.5 to 2.7 minutes, provided that the setpoint temperature is set to 120°C. The results obtained guarantee that under these thawing parameters, it was possible to obtain a viability higher than 90%, and there were no significant differences compared to the traditional method.

**Keywords:** CMSP, thawing, electromagnetic induction, viability

## Tabla de contenido

|  |    |
|--|----|
| Capítulo 1. Problema u oportunidad                 | 10 |
| Planteamiento del problema                         | 10 |
| Justificación                                      | 11 |
| Pregunta problema                                  | 12 |
| Objetivo General                                   | 12 |
| Objetivos Específicos                              | 12 |
| Capítulo 2. Marco Teórico                          | 12 |
| Proceso de criopreservación y descongelación       | 12 |
| Criopreservación                                   | 12 |
| Tanque de almacenamiento                           | 13 |
| Procedimiento de criopreservación                  | 13 |
| Descongelación                                     | 15 |
| Métodos de descongelación                          | 15 |
| Evaluación del proceso de descongelación           | 16 |
| Transferencia de calor                             | 17 |
| Intercambio de calor                               | 17 |
| Mecanismos de transferencia de calor               | 17 |
| Inducción electromagnética y la inducción de calor | 18 |
| Ley de Biot-Savart                                 | 19 |
| Ley de Faraday                                     | 20 |

|  |    |
|--|----|
|  | 5  |
| Ley de Lenz  | 20 |
| Efecto Joule   | 21 |
| Corrientes de Foucault   | 21 |
| Control  | 22 |
| Arduino  | 22 |
| Arduino MEGA 2560  | 23 |
| Sensor de temperatura infrarrojo   | 24 |
| Control PID  | 24 |
| Capítulo 3. Estado del arte  | 26 |
| Capítulo 4. Metodología  | 30 |
| Diseño e implementación del sistema de inducción   | 30 |
| Diseño e implementación de la carcasa  | 32 |
| Proceso de aislamiento y criopreservación de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) | 33 |
| Preparación de viales de prueba  | 36 |
| Pruebas con células hematopoyéticas eucariotas a -196°C  | 37 |
| Evaluación de la viabilidad celular  | 38 |
| Análisis estadístico   | 38 |
| Capítulo 5. Resultados y análisis de resultados  | 39 |
| Resultados   | 39 |
| Diseño e implementación del sistema de inducción   | 39 |

|  |    |
|--|----|
|  | 6  |
| Diseño en CAD de carcasa del sistema de descongelamiento | 42 |
| Pruebas con viales de 1 mL de FBS + DMSO                 | 47 |
| Vial congelado a -196°C                                  | 47 |
| Descongelación de CMSP a -196°C                          | 56 |
| Viabilidad celular                                       | 59 |
| Ensayo de exclusión por azul de tripano                  | 59 |
| Citometría de flujo                                      | 62 |
| Análisis de Resultados                                   | 67 |
| Capítulo 6. Conclusiones y recomendaciones               | 69 |
| Referencias  | 71 |
| Anexos   | 80 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> Protocolo general de criopreservación de células.   | 14 |
| <b>Figura 2</b> Representación gráfica de los mecanismos de transferencia de calor  | 17 |
| <b>Figura 3</b> Representación de la ley de Biot-Savart   | 19 |
| <b>Figura 4</b> Representación gráfica de corrientes de Foucault fluyendo contra la resistividad eléctrica del material   | 22 |
| <b>Figura 5</b> Placa de Arduino MEGA 2560  | 23 |
| <b>Figura 6</b> Diagrama de bloques del control PID.  | 25 |
| <b>Figura 7</b> Área seleccionada como temperatura ambiente del sistema de inducción                                      | 32 |
| <b>Figura 8</b> Crioviales marcados con densidad celular y código del paciente de las células a criopreservar             | 35 |
| <b>Figura 9</b> Viales con volumen de 1 mL de solución de FBS + DMSO  | 36 |
| <b>Figura 10</b> Esquema electrónico prototipo de descongelamiento  | 39 |
| <br>  |    |
| <b>Figura 11</b> Diseño preliminar del sistema de descongelamiento  | 40 |
| <b>Figura 12</b> Estabilización del sistema de control para un setpoint de 37 °C  | 41 |
| <b>Figura 13</b> Vista isométrica del diseño CAD del prototipo  | 42 |
| <b>Figura 14</b> Vista superior del diseño CAD 3D de la carcasa   | 43 |
| <b>Figura 15</b> Vistas 3D del diseño CAD con sus respectivos elementos   | 44 |
| <b>Figura 16</b> Vista isométrica del sistema adiabático  | 44 |
| <b>Figura 17</b> Ubicación de los elementos que componen el sistema adiabático  | 45 |
| <b>Figura 18</b> Planos 2D con sus respectivas cotas de las diferentes vistas del diseño CAD                              | 46 |
| <b>Figura 19</b> Vistas superior y lateral del sistema de inducción en físico con sus respectivos elementos               | 46 |
| <b>Figura 20</b> Estado del vial post-descongelación durante 4 minutos.   | 47 |
| <b>Figura 21</b> Estado de descongelación de los viales con setpoint de 37°C a diferentes tiempos                         | 48 |
| <b>Figura 22</b> Gráficas de los resultados de temperatura ambiente con los 4 tiempos de descongelamiento                 | 49 |
| <b>Figura 23</b> Gráfica de la media $\pm$ desviación estándar de las tres pruebas realizadas a 37°C durante seis minutos | 50 |
| <b>Figura 24</b> Estado de descongelación de los viales empleando diferentes temperaturas de setpoint                     |    |

|  |    |
|--|----|
| inicial.   | 52 |
| <b>Figura 25</b> Gráfica del comportamiento de la temperatura ambiente durante las pruebas de descongelación a diferentes setpoint iniciales     | 53 |
| <b>Figura 26</b> Estabilización del sistema a 120°C  | 54 |
| <b>Figura 27</b> Ubicación de la termocupla en el interior del vial y registro de la temperatura final   | 55 |
| <b>Figura 28</b> Estado de descongelación de los viales a diferentes temperaturas iniciales  | 55 |
| <b>Figura 29</b> Media $\pm$ desviación estándar de las tres pruebas realizadas de descongelamiento a 120°C                                      | 56 |
| <b>Figura 30</b> Descongelación por baño serológico.   | 57 |
| <b>Figura 31</b> Viales de las muestras experimentales post-descongelación.  | 58 |
| <b>Figura 32</b> Comportamiento promedio de temperatura ambiente durante la descongelación de las 6 muestras experimentales.                     | 59 |
| <b>Figura 33</b> Porcentaje viabilidad celular post-descongelamiento por hemocitómetro   | 60 |
| <b>Figura 34</b> Porcentaje viabilidad celular post-descongelamiento por Hemocitómetro   | 60 |
| <b>Figura 35</b> Viabilidad celular de las pruebas de control y experimentales por hemocitómetro   | 61 |
| <b>Figura 36</b> Selección de la región de interés tomada para el análisis de las muestras   | 62 |
| <b>Figura 37</b> Gráficas de la frecuencia de los marcadores de ADN de las muestras de control   | 63 |
| <b>Figura 38</b> Gráficas de la frecuencia de los marcadores de ADN de las muestras experimentales   | 64 |
| <b>Figura 39</b> Porcentaje viabilidad celular post-descongelamiento por citometría de flujo   | 65 |
| <b>Figura 40</b> Porcentaje viabilidad celular post-descongelamiento usando el sistema de inducción y analizado por medio de citometría de flujo | 65 |
| <b>Figura 41</b> Viabilidad celular de las pruebas de control y experimentales por citometría de flujo   | 66 |



**LISTA DE TABLAS**

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1</b> Viabilidad celular por hemocitómetro de M1 y M2 previo a la criopreservación | 34 |
| <b>Tabla 2</b> Distribución de las pruebas con crioviales de CMSP a -196°C                  | 37 |
| <b>Tabla 3</b> Tiempos de descongelación y estado del vial con setpoint de 37°C             | 48 |
| <b>Tabla 4</b> Tiempos de descongelación y estado del vial con distintos setpoint           | 51 |

## Capítulo 1. Problema u oportunidad

### Planteamiento del problema

La criopreservación es un método que permite conservar células por largos periodos de tiempo, mediante procesos de congelamiento a bajas temperaturas que pueden llegar hasta los  $-196^{\circ}\text{C}$ , con el propósito de mantener la viabilidad y funcionalidad de las células al descongelarse. Para lograr el éxito de la criopreservación de células humanas, se requiere que estas sean recolectadas a través de procesos estandarizados, utilizando los criopreservantes adecuados para el proceso (Ávila-Portillo et al., 2006). Actualmente, en el mercado existen una gran variedad de equipos y sistemas para la criopreservación, como lo son agentes criopreservantes, congeladores, criocámaras, termos y tanques, brindando la posibilidad de una automatización y control del proceso de congelamiento. No obstante, para garantizar una alta viabilidad celular, se deben tener en cuenta tanto los procesos de criopreservación como los de descongelamiento (Fernández et al., 2009). El proceso de descongelamiento a la fecha no es un proceso reproducible, dado que en la mayoría de laboratorios, se realiza en un baño serológico dispuesto a  $37^{\circ}\text{C}$ , en donde se agita manualmente el criovial buscando una transferencia de calor uniforme; sin embargo, este no es un método fiable en todos los casos, dado que al hacerse de manera manual, no es posible garantizar una transferencia de calor homogénea que asegure su descongelamiento de manera rápida y precisa, además, se incrementa el riesgo de contaminación de las células. El principal problema de la descongelación radica en que, si no se efectúa bajo un proceso correcto, la supervivencia de las células estaría comprometida, ya sea por lisis osmótica, recristalización intracelular o por efectos tóxicos del crioprotector (Canales et al., 1999). Por otra parte, si no se mantiene una temperatura uniforme y homogénea en todas las partes del sistema de descongelación, las células pueden sufrir daños físicos (Rivero, 2012). La velocidad de descongelamiento es otro factor a tener en cuenta, se

ha demostrado mediante estudios, que el método de descongelamiento lento no es recomendable, debido a diversos factores que conllevan a la pérdida de la viabilidad celular como: la formación de cristales de hielo intracelulares y la citotoxicidad que puede tener el agente preservante al descongelarse (Celeste et al., 2017). A pesar de que se conoce que el proceso de descongelación es elemental en los procesos de criopreservación, actualmente son escasos los dispositivos que logren de manera efectiva un proceso de descongelación automatizado, reproducible y confiable.

### **Justificación**

El proceso de descongelamiento posterior a la criopreservación es muy importante, en esta etapa las células se rehidratan a medida que el hielo se funde, compensando la diferencia de concentraciones entre el exterior y el interior. Estudios han demostrado, que este procedimiento se debe hacer de una forma rápida, ya que cuanto más rápida sean calentadas las células al descongelarse, se evita que los cristales acuosos perforen las estructuras celulares, y, por tanto, la tasa de supervivencia será mayor (Celeste et al., 2017). Los parámetros que se deben controlar para garantizar una alta viabilidad celular son: la temperatura de calentamiento, la cual debe ser homogénea en torno al criovial; el tiempo de descongelamiento, el cual debe ser de forma rápida; y la esterilidad del vial, con el fin de no contaminar las muestras. Una forma de garantizar la transferencia de calor homogénea es mediante el mecanismo de inducción electromagnética, ya que este método ofrece una combinación de velocidad, consistencia y control (GH Induction Atmospheres, 2020). El tiempo de descongelamiento va ligado al protocolo, se busca una descongelación en el menor tiempo posible, evitando el daño celular. Finalmente, una forma de garantizar la no contaminación de la muestra durante la descongelación es asegurando un ambiente aséptico en el interior del equipo. Con este propósito, se propuso elaborar el diseño de un prototipo que permita realizar el descongelamiento rápido a células previamente criopreservadas por medio

de la inducción electromagnética.

### **Pregunta problema**

¿Un sistema de transferencia de calor por inducción electromagnética, permite el descongelamiento de viales criopreservados de células eucarióticas manteniendo su viabilidad celular?

### **Objetivo General**

Elaborar un prototipo para el descongelamiento de células eucarióticas criopreservadas, mediante transferencia de calor por inducción electromagnética.

### **Objetivos Específicos**

1. Diseñar la estructura mecánica y el sistema de inducción electromagnética para el prototipo de descongelamiento de las células criopreservadas.
2. Implementar el diseño en la construcción del prototipo de descongelamiento.
3. Evaluar la efectividad del prototipo mediante la determinación de la viabilidad de células

## **Capítulo 2. Marco Teórico**

### **Proceso de criopreservación y descongelación**

#### **Criopreservación**

La criopreservación es un proceso en el cual células y tejidos vivos son llevados a muy bajas temperaturas, para preservarse de forma intacta. Las células se transfieren a un tanque de almacenamiento a una temperatura entre  $-80^{\circ}\text{C}$  a  $-196^{\circ}\text{C}$ , en un medio criopreservante, con el fin de preservar su funcionalidad. El medio criopreservante más utilizado es el dimetil sulfóxido (DMSO), su acción crioprotectora se le atribuye a su habilidad de prevenir la formación de

cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, así como la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, dado que su punto de congelación es mayor al del agua. Además, su bajo peso molecular permite la entrada rápida a través de la membrana celular (Ávila-Portillo et al., 2006).

### **Tanque de almacenamiento**

El tanque de almacenamiento es un sistema el cual permite retener bajas temperaturas por largos periodos de tiempo, este debe contener una solución criogénica, para reducir el riesgo de pérdida celular. La transferencia de calor en este proceso juega un papel fundamental, ya que se puede presentar el efecto Leidenfrost, que consiste en la formación de una capa de vapor alrededor de un líquido, cuando este se encuentra en una superficie con una temperatura mayor al punto de ebullición del líquido, esto sucede durante la inmersión de la muestra en el líquido criogénico desde temperatura ambiente (Bengochea & Torre, 2000). Por tanto, si se disminuye el efecto Leidenfrost, se reduce la capa de vapor y se obtiene un incremento en la tasa de enfriamiento.

Dicho esto, el nitrógeno líquido es la opción más utilizada actualmente, ya que reduce considerablemente este efecto, debido a su bajo punto de ebullición, y de igual manera, no se ha evidenciado ninguna afectación en el uso de este elemento como medio de almacenamiento criogénico. Por otra parte, se debe tener en cuenta que cualquier modificación que se realice en la solución criogénica, afecta directamente la tasa de enfriamiento del vial. (Rivero, 2012).

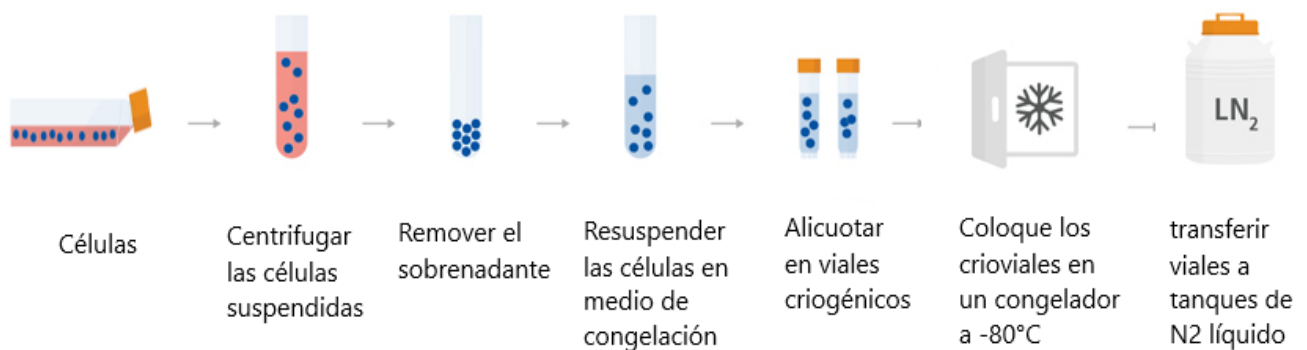
### **Procedimiento de criopreservación**

Todo el proceso se realiza bajo un protocolo estandarizado, y de una manipulación cuidadosa desde la extracción de las células derivadas del paciente hasta el aislamiento de las células. Sin embargo, obtener un protocolo ideal depende de las propiedades fisicoquímicas de las

células y/o el tejido que se desea criopreservar, ya que este es un proceso que es afectado por variables como la especie, tipo y estado de las células a congelar (Ávila-Portillo et al., 2006) Un ejemplo de esto, observado en la figura 1, es el protocolo para la criopreservación de células madre, para este, se deben hacer procesos de centrifugación, retiro de sobrenadante y resuspensión de células, con el fin de obtener las células que se desean criopreservar, posteriormente se ubican en un refrigerador a baja temperatura, y finalmente, se disponen en el tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Los métodos de criopreservación se pueden clasificar según la velocidad de congelación-descongelación de las muestras. Actualmente, se han desarrollado protocolos de congelación ultrarrápida rápida, con tasas de enfriamiento entre  $10^4$ - $10^6$  °C/min (Irdani et al., 2019), y se han utilizado altas concentraciones de agentes crioprotectores, que previenen la formación de cristales de hielo y la inducción de un medio amorfo y vítreo. Adicionalmente, se ha requerido de equipos apropiados para el aislamiento de la célula (tanque de almacenamiento) que garanticen consistencia, reproducibilidad y esterilidad. (Ramos et al., 2014).

### Figura 1

*Protocolo general de criopreservación de células.*



Fuente: Adaptado de (Stemcell Technologies, 2018).

## **Descongelación**

La descongelación es el proceso inverso a la criopreservación, en donde se busca un aumento de la temperatura, en el área clínica o de investigación. El obtener un proceso de descongelación celular estandarizado, permite optimizar las reservas celulares generando resultados confiables y reproducibles. Existe una serie de variables que tienen un impacto crítico en la calidad general de la muestra, como lo son la relación temperatura/velocidad de descongelación, la temperatura final de la muestra, el tiempo de descongelación, esterilidad, capacidad de control y limpieza. En general, el proceso de descongelación se debe realizar en el menor tiempo posible, ya que si se lleva a cabo lentamente puede causar daño celular y pérdida de la viabilidad. (Miyazaki et al., 2016; Yong et al., 2016). Hoy en día, existen diferentes estrategias de descongelación, en donde el protocolo estandarizado más común, es el uso de un baño serológico dispuesto a 37°C. Sin embargo, existe una serie de tecnologías que se pueden utilizar, las cuales se describen a continuación (Baust et al., 2017).

## **Métodos de descongelación**

Hay una serie de dispositivos o métodos que pueden utilizarse dependiendo del tipo, tamaño y uso final de la muestra. En entornos clínicos, el método más utilizado es el uso de baños serológicos a 37°C. Este protocolo consiste en sacar un vial del congelador, luego ubicarlo en un baño serológico, asegurando que la para esté bien cerrada para impedir la entrada de agua al vial, y agitarlo suavemente (mezclarlo) durante 3-5 minutos, hasta que se descongele. No obstante, el baño serológico puede contaminarse fácilmente, a pesar de tener cuidados como rociar los viales con alcohol isopropílico al 70% para minimizar la contaminación, por lo que el agua debe cambiarse periódicamente. Adicionalmente, este proceso requiere una manipulación constante de la muestra para obtener un resultado óptimo, lo cual puede ser perjudicial, ya sea por una posible

contaminación de la muestra, la mala manipulación (caída o inmersión), el sobrecalentamiento o la descongelación no uniforme. (Baust et al., 2017, Ramos et al., 2014).

En el ámbito de los bancos de sangre, para el descongelamiento de componentes sanguíneos, el método más utilizado es el descongelamiento en seco, estos dispositivos proporcionan un proceso de descongelación más limpio/estéril, para las muestras congeladas, y uniforme, gracias al sistema de agitación o movimiento durante la descongelación que permite una transferencia homogénea de calor. El uso de los sistemas de descongelación en seco está creciendo a un ritmo exponencial a medida que se producen mejoras en la esterilidad, la uniformidad, la trazabilidad, la eliminación de los errores del usuario final (operador) durante el proceso y de la calidad de las muestras (Baust et al., 2017), debido a que es un método al cual se le puede llevar una trazabilidad y estandarización del proceso.

### **Evaluación del proceso de descongelación**

Es importante realizar una evaluación de viabilidad posterior a la descongelación, con el fin de determinar la efectividad del método de descongelamiento empleado. Se recomienda que las células se descongelen sólo cuando sea necesario, ya que estas no deberían mantenerse durante un periodo prolongado de tiempo antes de su uso, dado que la viabilidad puede disminuir debido a la toxicidad inherente de los crioprotectores. Esta toxicidad puede disminuir si el protocolo de descongelamiento incluye un lavado posterior a la descongelación para diluir los crioprotectores. (Meneghel et al., 2020)

Existen varios métodos para determinar la viabilidad y se basan en diversas funciones celulares; como lo son la evaluación de la integridad de la membrana celular, a través de métodos de sustancias colorantes o fluorescentes y métodos de tinciones catiónicas, ensayos funcionales de la actividad metabólica como el método mediante la cuantificación de ATP, o el método de



detección de síntesis de nuevo ADN y métodos biosensores de fluorescencia (marcadores de proteínas) los cuales permiten cuantificar la dinámica molecular de macromoléculas, metabolitos e iones, en células individuales destinadas a identificar compuestos que se dirigen selectivamente en la función enzimática o la conformación de la célula, con el fin de explorar muestras de vida funcionales (López Álvarez, 2019).

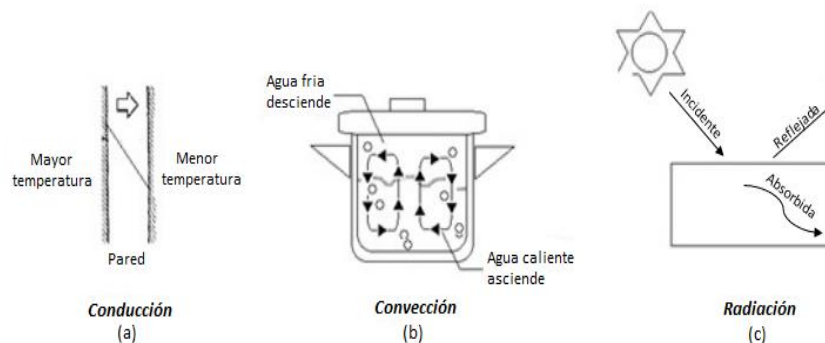
## Transferencia de calor

### Intercambio de calor

La diferencia de temperatura entre dos cuerpos al ponerse en contacto entre sí, produce una transferencia de calor desde el cuerpo o material de mayor temperatura al otro de menor temperatura, esta transferencia se puede realizar por diferentes mecanismos físicos: conducción, convección y radiación (ver figura 2).

### Figura 2

*Representación gráfica de los mecanismos de transferencia de calor*



Fuente: (Reyes Pérez & Sosa Morales, 2013)

### Mecanismos de transferencia de calor

La conducción es el mecanismo de transferencia de calor en escala atómica a través de la materia por actividad molecular, debido al choque de unas moléculas con otras, donde

las partículas más energéticas le transfieren energía a las menos energéticas, generando un flujo de calor desde las temperaturas más altas a las más bajas (Conesa, 2013). El mecanismo de convección es la transferencia de calor que se produce por movimiento de masa o circulación dentro de una sustancia, es una combinación de transferencia de energía por movimiento molecular aleatorio y movimiento volumétrico del fluido, entre partes relativamente frías y calientes de un fluido. (Reyes Pérez & Sosa Morales, 2013). Finalmente, el proceso de radiación puede entenderse como energía emitida por la materia que se encuentra a una temperatura dada, se produce directamente desde la fuente hacia afuera en todas las direcciones, físicamente la radiación es la transferencia de energía en forma de fotones. La radiación no necesita un medio material para propagarse, esta es independiente de la materia y la transferencia de energía es más efectiva en el vacío (Corace, 2009).

### **Inducción electromagnética y la inducción de calor**

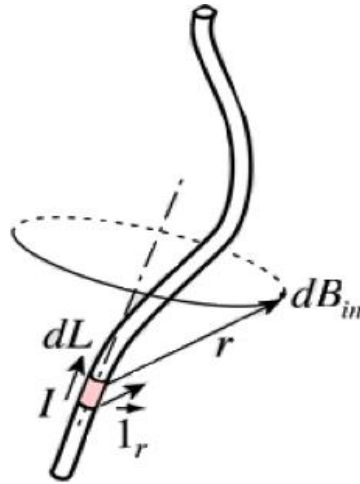
La inducción electromagnética es el fenómeno que se genera a partir de una fuerza electromotriz en un medio o cuerpo expuesto a un campo magnético, en este fenómeno, la energía del campo electromagnético originado en una bobina es transferida a un cuerpo conductor expuesto dentro de su radio, dicho cuerpo, al ser un conductor hace parte de un circuito cerrado, produciendo una corriente inducida, como consecuencia, el cuerpo conductor incrementa la temperatura. Este proceso se puede modelar mediante la utilización de las leyes de Biot-Savart, Faraday, Lenz, y la aplicación del efecto Joule (Acevedo Picon et al., 2007).

### Ley de Biot-Savart

La ley de Biot-Savart proporciona el valor del campo magnético en un punto dado para un pequeño elemento del conductor.

#### Figura 3

*Representación de la ley de Biot-Savart*



Fuente: (González Muñoz, 2012)

Se establece que si un alambre conduce una corriente constante ( $I$ ), el campo magnético ( $dB$ ) en un punto ( $P$ ) debido a un elemento ( $ds$ ), tienen las siguientes propiedades: El vector ( $dB$ ) es perpendicular tanto a ( $ds$ ), el cual tiene la dirección de la corriente como al vector unitario dirigido desde el elemento hasta el punto ( $P$ ). La magnitud de ( $dB$ ) es inversamente proporcional a  $r^2$  donde  $r$  es la distancia desde el elemento hasta el punto ( $P$ ). La magnitud de ( $dB$ ) es proporcional a la corriente y a la longitud ( $ds$ ) del elemento (Ver figura 3). Esta ley se puede ver resumida a continuación:

$$dB = \frac{(\mu_0)}{4\pi} * \frac{I dL \times \hat{r}}{r^2} \quad (1)$$

Para encontrar el campo magnético total en algún punto debido a un conductor de tamaño

finito, se deben sumar las contribuciones de todos los elementos de corriente que constituyen el conductor (González Muñoz, 2012).

### **Ley de Faraday**

La ley de Faraday-Henry, describe el fenómeno conocido como inducción electromagnética. Esta ley relaciona la fuerza electromotriz inducida debido a la variación de flujo magnético en una bobina. Este fenómeno dice que la variación en el tiempo de un campo magnético produce un campo eléctrico (Villalba et al., 2015). La ley de Faraday establece que la fuerza electromotriz inducida conocida como  $fem$ , en una espira cerrada, viene dada por la derivada negativa, del flujo magnético a través de la espira con respecto al tiempo. El signo negativo en la ecuación (2) tiene en cuenta el sentido de la  $fem$ , el cual se hace referencia en la ley de Lenz.

$$(fem) \varepsilon = - (d\Phi_B / dt) \quad (2)$$

Por otra parte, si se tiene una bobina con N espiras, la ecuación anterior cambiaría de tal manera que se tendrán en cuenta el número de espiras, siendo  $\phi_B$  el flujo magnético que atraviesa cada una de las espiras (Villalba et al., 2015).

$$(fem) \varepsilon = -N * (d\Phi_B / dt) \quad (3)$$

### **Ley de Lenz**

Establece la relación entre la dirección de la corriente inducida en un contorno y el campo magnético inductor. Esta ley enuncia que “la corriente eléctrica y la  $fem$  inducidas actúan en tal dirección que tienden a oponerse a cualquier cambio en el número de líneas de flujo que pasan a través de la sección transversal del circuito considerado”. El signo negativo de la ley de Faraday está íntimamente relacionado con esta noción de oposición. La ley de Lenz se refiere a corrientes

inducidas, y no a fuerzas electromotrices inducidas, por tanto, sólo puede aplicarse directamente a circuitos cerrados (Verdezoto, 2016).

### **Efecto Joule**

Es el desprendimiento de calor provocado por el movimiento de electrones (conocido como corriente eléctrica), (Rivera, 2015). Al circular corriente eléctrica por un material conductor, parte de la energía cinética de los electrones se transforma en calor, producto del choque que sufren los electrones con las moléculas del material por el que circulan, provocando a su vez que la temperatura de éste se eleve (Patterson, G & Sobral, M, 2007). Este efecto se expresa por la siguiente ecuación:

$$Q = I^2 R t \quad (4)$$

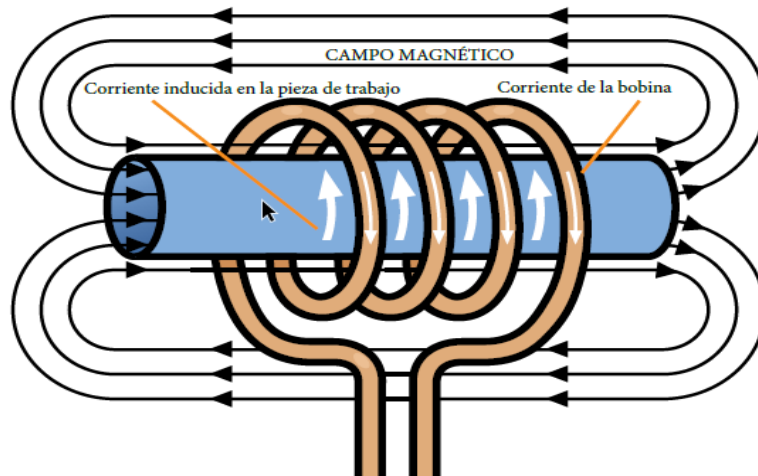
Siendo Q la energía calorífica producida por la corriente (Joules), I la intensidad de la corriente que circula, R la resistencia eléctrica del conductor y t el tiempo.

### **Corrientes de Foucault**

Se conoce como corrientes de Foucault a aquellas que se generan cuando un material conductor atraviesa un campo magnético variable, provocando una corriente inducida dentro del conductor, estas corrientes producen campos magnéticos que se oponen al campo magnético aplicado (Reyes & Pinto, 2014).

#### Figura 4

*Representación gráfica de corrientes de Foucault fluyendo contra la resistividad eléctrica del material*



Fuente: (Ambrell Induction Heating Solutions, 2018)

Como se observa en la figura 4, cuando una pieza metálica se coloca dentro del inductor y atraviesa un campo magnético, se producen corrientes inducidas (corrientes de Foucault) circulantes dentro de la pieza. Estas corrientes de Foucault, fluyen contra la resistividad eléctrica del metal, generando calor localizado sin tener contacto directo entre la pieza y la bobina (Fabián et al., 2017).

Mientras más fuerte sea el campo magnético aplicado o mayor la conductividad del material conductor, mayores serán las corrientes de Foucault y los campos opuestos. Generalmente estas corrientes son usadas en la fundición de metales y en cocinas de inducción.

#### Control

#### Arduino

Arduino es una placa o plataforma de hardware libre basada principalmente en un

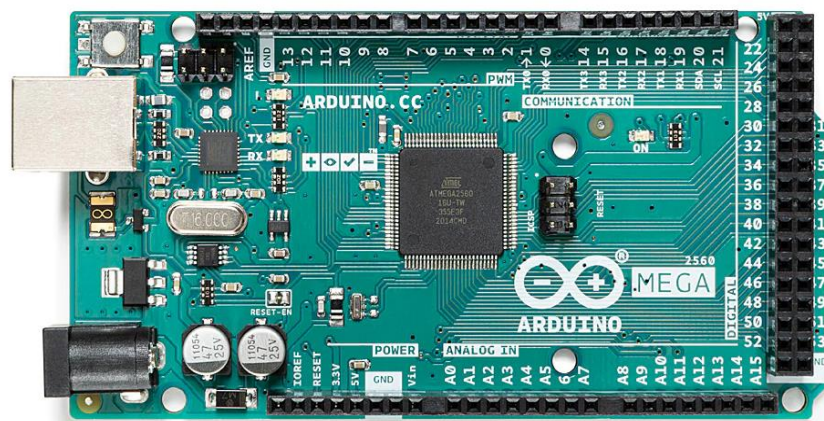
microcontrolador y un entorno de desarrollo (software), diseñado para facilitar el uso de la electrónica en los diversos proyectos multidisciplinarios. Arduino es una tecnología con el uso directo de hardware y software. En cuanto a hardware, se compone por varias partes e interfaces, las cuales están reunidas en una placa de circuito. Arduino ha cambiado a lo largo de los años y han surgido diferentes tipos de placas (Carrillo, 2021).

### **Arduino MEGA 2560**

El Arduino Mega 2560 es una placa de microcontrolador basada en el ATmega2560. Tiene 54 pines de entrada/salida digital (de los cuales 15 se pueden usar como salidas PWM), 16 entradas analógicas, 4 UART (puertos seriales de hardware), un oscilador de cristal de 16MHz, una conexión USB, un conector de alimentación, un cabezal ICSP, y un botón de reinicio. Arduino Mega ofrece la posibilidad de conectarse a una computadora con un cable USB o con un adaptador de CA a CC o una batería. (Arduino, 2015).

### **Figura 5**

*Placa de Arduino MEGA 2560*



Fuente: (Arduino, 2015)

## **Sensor de temperatura infrarrojo**

Los sensores infrarrojos son dispositivos optoelectrónicos que permiten la medición de la radiación electromagnética infrarroja de los objetos dentro de su campo de visión. En el caso de la temperatura, todo cuerpo por encima del cero absoluto ( $0^\circ \text{ K}$  o  $-273,15^\circ \text{ C}$ ), emite una radiación electromagnética de superficie, proporcional a su temperatura intrínseca. Esta radiación es la detectada por el lente óptico del sensor infrarrojo, y a su vez, genera una señal eléctrica, la cual es amplificada y procesada digitalmente, siendo proporcional a la temperatura del objeto. Un factor importante, es la emisividad ( $\epsilon$ ), la cual se define, como la relación entre la radiación emitida por un cuerpo real y la emitida por un cuerpo negro a la misma temperatura, en otras palabras, es la propiedad que indica la eficacia con la cual la superficie de un objeto emite radiación térmica. Este factor siempre será menor que uno (1) (Industrias GSL, 2021).

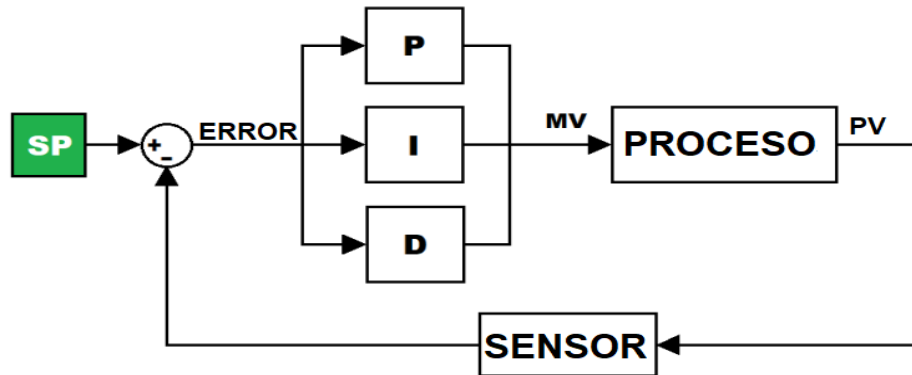
## **Control PID**

El control PID es un mecanismo de control que combina acciones proporcionales (P), integrales (I) y derivadas (D) para generar una única señal de control, donde cada acción tiene una característica fuerte que ayuda a controlar la salida. El sistema de control PID calcula la diferencia entre la variable real y la variable que se desea. La acción proporcional hace que el sistema reaccione al presente error, permitiendo una acción inmediata ante variaciones o perturbaciones; La acción integral elimina los errores de estado estacionario a largo plazo, y la acción derivativa anticipa el comportamiento del proceso (Bazanella, 2005).



**Figura 6**

*Diagrama de bloques del control PID.*



Fuente: (Alpi, 2019)

En la figura 6, se observa el diagrama de bloques del control PID. Se le conoce como “proceso” al sistema a controlar, “MV” es la variable manipulada, la cual, es la señal aplicada a la entrada del proceso, mientras que “PV, es la variable de proceso, es decir, la señal de salida del proceso. Para lograr la máxima eficiencia de la planta, se utiliza un controlador de entrada de proceso que recibe la referencia de entrada o el punto de ajuste/setpoint (SP) y asegura la estabilidad de la señal de salida.

En sistemas con retroalimentación de salida, se forma un bucle en el proceso. Esta disposición se llama sistema de lazo cerrado. En el sistema de lazo cerrado, el controlador recibe constantemente la diferencia entre SP y el valor real de PV. Esta diferencia se llama “Error” y, con base a ello, el equipo genera una señal de control para reducir el error a un valor muy pequeño o nulo, independientemente de existir una señal de perturbación en el proceso o no. El control de lazo cerrado tiene ventajas tales como más precisión del sistema de control, rechazo de los efectos de perturbación en PV y una disminución de la variación debido a la inestabilidad. (Alpi, 2019).

### Capítulo 3. Estado del arte

La criopreservación ha permitido conservar células e incluso tejidos por largos periodos de tiempo, lo que ha permitido disponer de material biológico en momentos oportunos. Esto ha tenido un impacto positivo en la investigación, en áreas como fertilización *in vitro*, con el congelamiento de embriones, terapias celulares con células adultas o madres, aplicaciones clínicas, desarrollo de vacunas, ensayo de fármacos, terapia génica y todo tipo de ejercicios experimentales que usan modelos celulares *in vitro* (Turchin et al., 2010), (Nazarat et al., 2010). En la actualidad este proceso de preservación celular es ampliamente utilizado en los bancos de sangre y tejidos, en donde las células hematopoyéticas son las que se criopreservan con mayor frecuencia. A pesar de la larga experiencia con el procesamiento de estas células, no existe un método universalmente aceptado para estos procesos, en consecuencia, cada instalación o laboratorio ha desarrollado su propio protocolo e implementa procesos validados, bajo un sistema de calidad, que cumpla con los estándares, normas y reglamentos pertinentes desarrollados por organizaciones, profesionales y autoridades competentes, en cada país, tal como lo describe Lecchi et al (2016). De manera general, existen opciones automatizadas, como las criocámaras, termos de congelación, que son eficaces en relación a la viabilidad y la recuperación celular, lo que permite estandarizar los procesos mediante la implementación de esta instrumentación (Lecchi et al 2016).

Según algunos autores, se debe tener en cuenta la tasa de enfriamiento y la descongelación óptima de las muestras congeladas, los cuales son fundamentales para el éxito de la criopreservación (Pan et al. 2017). Estudios recientes muestran que no solo el proceso de criopreservación es importante, también lo es, el proceso de descongelamiento, en este sentido, Hunt et al. (2019), describen que la velocidad de calentamiento durante el proceso de descongelamiento, tiene un impacto significativo en la recuperación celular, ya que permite

reducir el tiempo de exposición a concentraciones dañinas de solutos, y también, se evita el daño ocasionado por la recristalización intracelular del hielo durante el recalentamiento de las muestras.

Otros estudios como el de Triana et al. (2013), describen que las técnicas actuales de descongelación de células hematopoyéticas pluripotentes (CPH) de sangre periférica criopreservadas, se basan en el uso de un baño serológico a temperaturas entre 37 y 41°C. Normalmente, se utiliza una bolsa de suspensión celular, la cual se sumerge en agua y se somete a una agitación mecánica manual para alcanzar la fase líquida, en donde el agua es el vector de transferencia térmica hacia la bolsa criopreservada, por tanto, se tiene el potencial riesgo de contaminación microbiológica, ya que es un medio propenso a la aparición de microorganismos infecciosos, en el caso de no realizar procesos de asepsia, adecuados, afectando así, el ambiente al que están expuestas los contenedores que almacenan las muestras. Además, el producto celular está sujeto a variabilidad del operador durante la agitación mecánica y en consecuencia el tiempo de descongelación es variable, por lo cual la reproducibilidad de los procesos no se puede garantizar. Por otro lado, durante la descongelación con el sistema estándar de baño serológico, la cinética de la temperatura en el producto celular no se suele controlar.

Como alternativa al uso de baño serológico se han desarrollado métodos que permiten una descongelación en seco de forma automatizada y controlada de la temperatura, lo que permite, además, limitar los problemas de contaminación en que se pueden dar por los baños serológicos. Adicionalmente, estos sistemas permiten incorporar un sistema de inclinación, que agita periódicamente las muestras en bolsas sanguíneas y crioviales, lo que permite una descongelación homogénea del producto. Este sistema en seco no requiere una manipulación adicional durante el proceso de descongelación. Estudios concretos que han evaluado el método de descongelamiento

en seco, evidencia que en CPH, la viabilidad y la función de las células se preservan.

Un estudio realizado por Rölling et al. en el 2002, analiza y compara la viabilidad de las células madre hematopoyéticas empleando el baño serológico y el calentamiento en seco como métodos de descongelación. Para este estudio, se utilizó un dispositivo con dos cámaras de calentamiento, en una se calentaban almohadillas adheridas a las bolsas de células madre hematopoyéticas, mientras que la otra, contenía un plato de metal que calentaba la bolsa y poseía un sensor de temperatura para la monitorización del descongelamiento, luego de esto, para determinar la viabilidad del proceso se utilizó un método de exclusión de colorante (azul tripán) con el fin de evaluar la viabilidad de las células descongeladas. Al final, se compararon los resultados obtenidos, encontrando que ambos procedimientos tomaron aproximadamente la misma cantidad de tiempo y no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad celular. Sin embargo, se concluyó que debido a la posible contaminación del baño serológico con microorganismos y el riesgo de transmisión posterior a los pacientes, podría ser más seguro descongelar en ambientes secos, favoreciendo así, el uso de estos equipos electrónicos (Rölling et al. (2002)). Otros investigadores como Kilbride et al (2020). también llegaron a conclusiones similares, este equipo de investigación realizó un estudio con el fin de analizar la alternativa de descongelación en seco, cuyo objetivo era minimizar la variabilidad en la descongelación de células hematopoyéticas, y comparar este método con la descongelación en baño serológico. Se tomaron muestras de leucocitaféresis criopreservadas de 41 donantes, congeladas mediante el mismo protocolo y almacenadas durante el mismo tiempo; para el método de descongelamiento en seco, se utilizó un equipo automatizado sin agua y para el método convencional de descongelación húmeda, se utilizó un baño serológico. Se evaluó la viabilidad posterior a la descongelación, tanto por azul de tripano como por citometría de flujo, y se obtuvo que no existen diferencias significativas entre las dos técnicas. También se determinó que no hubo ningún efecto

negativo. En este estudio se resalta que la descongelación en seco ofrece beneficios potenciales para situaciones clínicas, al eliminar posibles problemas de contaminación. (Kilbride et al. 2020).

Otros estudios, se han centrado en el comportamiento de las células cuando son sometidas a diferentes tipos de efectos electromagnéticos como descongelamiento por microondas, por radiofrecuencia de alta frecuencia (MHz o GHz) o por ondas de radio (Radiowave Thawing Device 'RTD'). Ketterer et al (1971) descongelaron riñones caninos criopreservados utilizando un horno microondas, como resultado, observaron que la profundidad de penetración de las microondas es limitada y, por tanto, no se consiguió un calentamiento uniforme (Ketterer et al. 1971). Por otra parte, Boström et al, utilizaron una tecnología empleando RTD y determinaron que la diferencia más significativa respecto al método tradicional está en una reducción al tiempo de descongelamiento (Boström et al. 2009). Por último, Jin et al (2014). utilizaron pulsos de láser infrarrojo para lograr tasas de calentamiento ultrarrápidas (10.000.000 °C/min) para recalentar ovocitos congelados o vitrificados. Sin embargo, estos estudios concluían que se necesitan instrumentos complejos, para los cuales, en la mayoría, es indispensable el uso de tecnologías específicas, con metodologías y diseños robustos, en los que se necesita de una gran cantidad de tiempo para la elaboración de estos métodos (Jin et al. 2014).

A. M. Vorotilin et al, (1991), establecieron que el calentamiento rápido por métodos de transferencia de calor, como la convección o conducción, necesitan grandes gradientes de temperatura, lo que provocaría tensiones mecánicas que podrían dañar las células. Además, podría sobrecalentar las capas externas antes de que el interior se hubiera descongelado (A. M. Vorotilin et al. 1991). Por otra parte, es importante resaltar que el calentamiento electromagnético (EM), produce una mayor tasa de calentamiento y un calentamiento más uniforme que el método convencional por baño serológico, por lo que se considera un método eficaz para recalentar

muestras criopreservadas (Robinson & Pegg, 1999, Ruggera & Fahy, 1990). Por esto, Wang et al, propusieron otro método alternativo de descongelación empleando efectos electromagnéticos, el cual consistió, en un sistema de calentamiento por inducción electromagnética junto a nanopartículas magnéticas, demostrando que, bajo este método, se produjo una mayor velocidad de calentamiento y una transferencia de calor uniforme, a diferencia del método convencional de descongelación en baño serológico, asimismo, se considera un método eficaz para calentar las muestras criopreservadas, ya que se pudo suprimir la recristalización durante el recalentamiento y mejoró significativamente la supervivencia de las células criopreservadas. Los investigadores concluyeron que, tanto el núcleo, las mitocondrias y el retículo endoplasmático de las células descongeladas permanecen intactos, lo que indica que no se afecta la actividad de las células, como su proliferación, asimismo, se concluyó que la aplicación de inducción electromagnética es una estrategia prometedora que logra un calentamiento rápido y homogéneo en la muestra, mejorando los métodos de descongelamiento (Wang et al. 2016).

## **Capítulo 4. Metodología**

### **Diseño e implementación del sistema de inducción**

Para el circuito electrónico de calentamiento por inducción, se utilizó una topología de Conmutación de Cero Voltaje o en inglés Zero Voltage Switching (ZVS), ya que esta opera mediante la modulación de ancho de pulso o PWM. Por medio de PWM, se logró la regulación térmica deseada, en el interior de la bobina. Los componentes más destacados de esta topología son los transistores, en este caso, de tipo MOSFET; encargados de realizar la oscilación de la corriente en el circuito y permitir la carga del inductor. Las características que se tuvieron en cuenta al momento de escoger el MOSFET a utilizar, fueron: la tensión drenaje-fuente ( $V_{ds}$ ), la corriente de

drenaje ( $I_d$ ) y la potencia de disipación ( $P_d$ ). El esquemático del circuito fue realizado en el software de simulación Proteus Professional.

Para el circuito resonante, a partir de la ecuación 5, se obtuvo la frecuencia de oscilación.

$$F = \frac{1}{2 * \pi * \sqrt{C * L}} \quad (5)$$

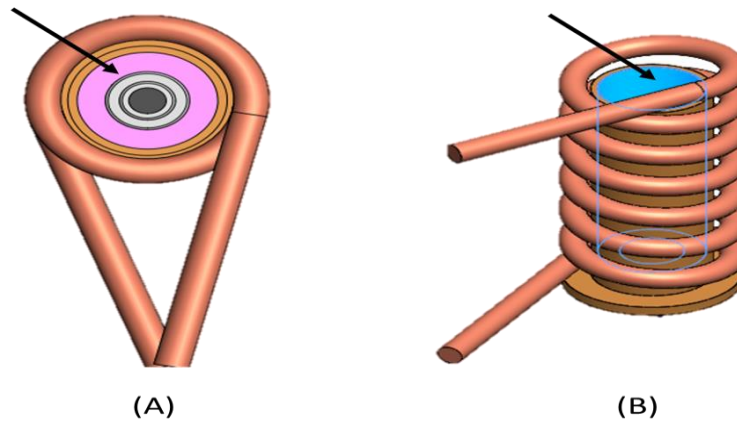
Donde  $F$  es la frecuencia de resonancia,  $L$  es la inductancia de la bobina y  $C$  la capacitancia de los condensadores.

Se diseñó un sistema adiabático cerrado, con paredes de poliestireno expandido (EPS), en su interior se ubicó la bobina de carga y dentro de esta, se posicionó una pieza metálica; en la parte inferior de la pieza metálica, se ubicó un sensor infrarrojo.

Como sistema de control, se usó el microcontrolador Arduino Mega, conectado a otro transistor tipo MOSFET, y empleando control PID, mediante un sistema de lazo cerrado, se controló la temperatura en el interior de la pieza metálica (figura 7). En la sección A, la parte sombreada con lila, se le denominó el setpoint del sistema, y hace referencia también, a la temperatura ambiente al interior de la pieza, y fue este setpoint el utilizado como retroalimentación del sistema. Esta temperatura fue detectada, por medio de un sensor infrarrojo, gracias a las características y ubicación del sensor.

**Figura 7**

*Área seleccionada como temperatura ambiente del sistema de inducción*



*Nota.* A) Vista superior. B) vista isométrica. El área señalada con color celeste, representa la temperatura ambiente detectada por el sistema de control.

Una vez realizado el esquemático del circuito, se procedió a realizar el montaje físico del mismo, luego, se realizaron pruebas de funcionamiento, tanto del componente electrónico como del sistema de control. Primeramente, empleando control PID, se estableció el setpoint del sistema, es decir, la temperatura ambiente en el interior de la pieza metálica, a la cual se deseó estabilizar. En este caso, fue de  $37^{\circ}\text{C}$ , con el fin de simular condiciones similares al método convencional con baño serológico, y también, analizar los porcentajes de PWM empleados para lograr esta estabilización.

### **Diseño e implementación de la carcasa**

Para el diseño 3D de la carcasa, se utilizó el software CAD SolidWorks. Se diseñó una estructura de forma rectangular, un interruptor para el encendido del equipo y otro para el inicio del proceso de descongelación, un conector plug USB de Arduino, un led indicador de encendido y apagado del sistema, una pantalla LCD para la visualización del tiempo y temperatura; además, se situó un cooler en la parte posterior de la carcasa para la refrigeración de los componentes electrónicos. En la parte interna de la estructura, se ubicó un soporte para la ubicación del



microcontrolador Arduino y el circuito electrónico. Conjunto a la carcasa, se dispuso un sistema adiabático, donde en su interior se ubicó la bobina de inducción, junto a la pieza metálica y el sensor infrarrojo. Luego de obtener el modelo 3D, se realizó el montaje en físico de todas las partes mencionadas anteriormente.

### **Proceso de aislamiento y criopreservación de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP)**

Para el proceso de aislamiento y criopreservación de CMSP por medio del método de separación por gradiente de densidad, se obtuvo dos muestras de sangre (M1 y M2) de dos pacientes sanos, se agitaron brevemente durante 10 min a temperatura ambiente. Se mezclaron los tubos de heparina (por inversión) y se transfirió el contenido de los tubos a un tubo falcón de 50 mL por cada muestra, obteniendo en total 23 mL y 12 mL de sangre de M1 y M2, respectivamente. Se diluyó la sangre usando un volumen igual de PBS para cada muestra y se pipeteo arriba y abajo para mezclar las células. Luego, se agregó lentamente el Histopaque-1077 en seis (6) tubos falcón para M1 y cuatro (4) tubos para M2 en un volumen de 3 mL por cada tubo, se agregó la sangre diluida a los tubos con Histopaque asegurándose que la sangre y el Histopaque no se mezclaran. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 400 xg durante 30 minutos a temperatura ambiente y sin freno, se retiró cuidadosamente los tubos de la centrifuga y se sustrajo toda la banda de células mononucleares utilizando pipetas Pasteur de plástico donde se transfirieron en un tubo de centrifugación nuevo de 15 mL para cada muestra.

Luego, se agregó PBS a cada muestra hasta completar 15 mL, se mezcló la suspensión de células y se centrifugó a 400 xg por 10 minutos a temperatura ambiente con freno por duplicado. Se decantó el sobrenadante, y se resuspendieron las células en 15 mL de PBS para cada muestra. Por último, se centrifugaron de nuevo las muestras a 200 xg por 10 minutos a temperatura ambiente con

freno, decantando el sobrenadante y resuspendiendo las células nuevamente en 2 mL de PBS. Esta última centrifugación a velocidad baja se realizó para retirar la mayor cantidad de plaquetas que todavía se encontraban en la suspensión celular.

Una vez obtenida la suspensión de células de cada muestra, se tomó un volumen de células de 2 mL por muestra y se diluyeron en una relación de 1:4 (5  $\mu$ L de células + 15  $\mu$ L de PBS), se realizó el conteo de células usando un hemocitómetro y la solución de azul de tripano en una proporción de 1:1 (10  $\mu$ L de las células diluidas anteriormente y 10  $\mu$ L de azul de tripano).

**Tabla 1**

*Viabilidad celular por hemocitómetro de M1 y M2 previo a la criopreservación.*

| <b>Muestra 1</b>     |              |                | <b>Muestra 2</b>     |              |                |
|----------------------|--------------|----------------|----------------------|--------------|----------------|
| <b>Cuadrante</b>     | <b>Vivas</b> | <b>Muertas</b> | <b>Cuadrante</b>     | <b>Vivas</b> | <b>Muertas</b> |
| 1                    | 103          | 2              | 1                    | 47           | 1              |
| 2                    | 97           | 3              | 2                    | 57           | 0              |
| 3                    | 110          | 2              | 3                    | 63           | 1              |
| 4                    | 97           | 2              | 4                    | 64           | 2              |
| <b>Total</b>         | <b>407</b>   | <b>9</b>       | <b>Total</b>         | <b>231</b>   | <b>4</b>       |
| <b>Total células</b> | <b>416</b>   |                | <b>Total células</b> | <b>235</b>   |                |

|  |  |
|--|--|
| <b>Viabilidad =</b> $\frac{407}{416} \times 100 = 97,84\%$ | <b>Viabilidad =</b> $\frac{231}{235} \times 100 = 98,30\%$ |
|--|--|

Teniendo en cuenta el conteo celular, se marcaron los crioviales indicando la densidad celular y el código del paciente. A partir de la siguiente ecuación (6), se calculó la concentración celular presente en la suspensión de cada muestra.

$$\text{Concentración} = \frac{\# \text{ células vivas}}{4} * \text{factor de dilución} * 10.000 \quad (6)$$

Para la muestra M1,

$$\text{Concentración} = \frac{405}{4} * 8 * 10.000 = 8'140.000 \text{ células/mL}$$

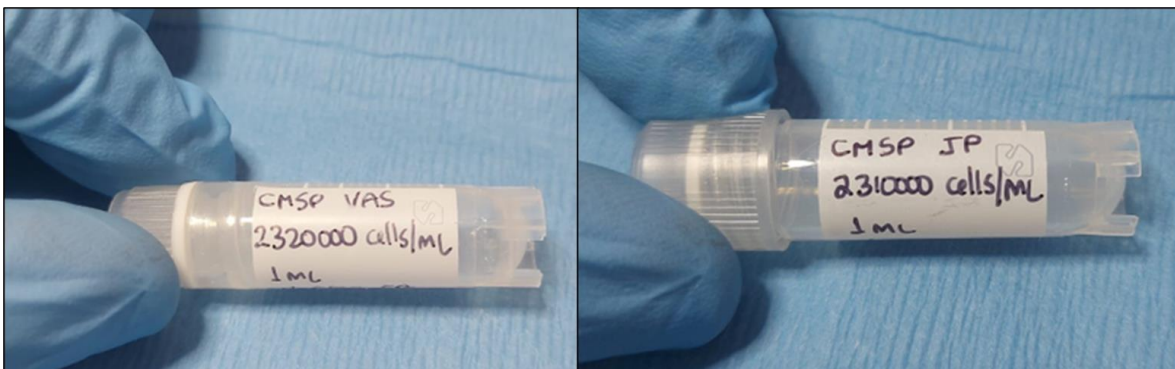
Para la muestra M2,

$$\text{Concentración} = \frac{231}{4} * 8 * 10.000 = 4'620.000 \text{ células/mL}$$

Posteriormente, se calculó el total de células presentes en la suspensión celular, de la cual, se tomó la alícuota de cada muestra, donde se multiplicó la concentración celular por el volumen total de células de la muestra (2 mL), obteniendo 16'280.000 células de M1 y 9'240.000 células de M2. Para la criopreservación se tomó el total de células de la suspensión celular sobre la suma del volumen total de crioviales, para M1 se usaron siete (7) crioviales con un volumen de 1 mL cada uno, consiguiendo una densidad celular final de 2'325.714 células/mL y para M2 se usaron cuatro (4) crioviales con un volumen igual a M1 logrando una densidad celular final de 2'310.000 células/mL.

### Figura 8

*Crioviales marcados con densidad celular y código del paciente de las células a criopreservar*



Finalmente, se resuspendieron las células en el medio de criopreservación (FBS inactivo + 10% DMSO) en una proporción de 9:1, se transfirieron inmediatamente los crioviales a un Mr.

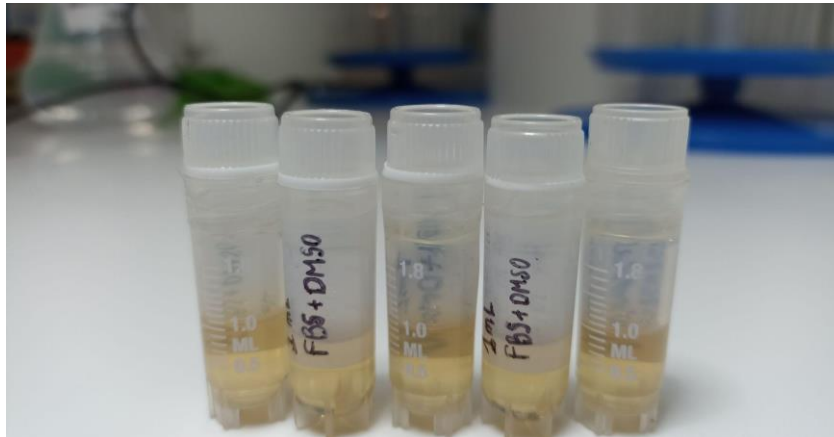
Frosty, y este al congelador de  $-80^{\circ}\text{C}$  por un lapso de 12-24 horas, para luego, depositar los crioviales en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### **Preparación de viales de prueba**

Para las primeras pruebas de descongelación, se utilizó un medio criopreservante sin células. Este medio se preparó con suero fetal bovino (FBS) y DMSO, en una relación 9:1. Como se muestra en la figura 9, se prepararon 5 viales de prueba. Posterior a esto, se congelaron a  $-196^{\circ}\text{C}$  para las pruebas preliminares de funcionamiento.

### **Figura 9**

*Viales con volumen de 1 mL de solución de FBS + DMSO*



En esta prueba preliminar, los viales con FBS + DMSO, se congelaron a  $-196^{\circ}\text{C}$  en un tanque de nitrógeno líquido, posteriormente, se realizaron pruebas de descongelamiento, iniciando con setpoint de  $37^{\circ}\text{C}$  y empleando un tiempo de descongelamiento igual al utilizado en el baño serológico. Kilbride et al (2020) consideran que el tiempo de descongelamiento finaliza una vez se observa que el último punto de hielo se dispersa o se derrite, sin embargo, para este proyecto, se consideró que el vial tenía que ser retirado, una vez se observaba un pequeño bloque de hielo, es decir, se estimó que el vial estuviera aproximadamente en un 90% de descongelación, ya que el

hielo restante se derretía mientras se sacaba el vial de la pieza metálica y se llevaba a cabo el lavado con PBS. En las pruebas a 37°C se evidenció un aumento en el tiempo de descongelamiento, por lo que se incrementó la temperatura del setpoint con el fin de encontrar el mejor tiempo de descongelación de las muestras. Se tomó evidencia del estado de descongelación del vial, así como la variación de temperatura ambiente, una vez se ubicó el vial dentro de la pieza metálica y durante el proceso de descongelación.

### **Pruebas con células hematopoyéticas eucariotas a -196°C**

Una vez se encontró el mejor tiempo de descongelación empleando el sistema de inducción, se llevaron a cabo las pruebas con CSMP a -196°C. Primero, se descongelaron 3 viales de M1 y 1 vial de M2 por baño serológico, y se clasificaron estas como pruebas de control. Luego, se utilizaron 3 viales tanto de M1 como de M2, y se descongelaron por medio del sistema de inducción. Posteriormente, independientemente del método de descongelación, se preparó una solución con 9 mL de PBS y 1 mL de las células, luego, se centrifugó a 400 xg por 10 minutos, se retiró el sobrenadante, se agregó 1 mL de PBS y finalmente se resuspendió la solución.

### **Tabla 2**

*Distribución de las pruebas con crioviales de CMSP a -196°C*

| <b>Muestra</b> | <b>Baño serológico</b> | <b>Sistema de inducción</b> |
|----------------|------------------------|-----------------------------|
| M1             | Control 1              | Experimental 1              |
|                | Control 2              | Experimental 2              |
|                | Control 3              | Experimental 3              |
| M2             | Control 4              | Experimental 4              |
|                |                        | Experimental 5              |
|                |                        | Experimental 6              |

### **Evaluación de la viabilidad celular**

Una vez resuspendidas las células, se utilizó dos métodos para la evaluación de viabilidad celular: por ensayo de exclusión de azul de tripano (hemocitómetro) y por medio de citometría de flujo. En el primer método, se tomó 10  $\mu\text{L}$  de células y 10  $\mu\text{L}$  de azul de tripano, se mezclaron en un tubo Eppendorf, y finalmente se ubicaron en el hemocitómetro, donde se realizó el conteo de células con ayuda del microscopio. Por medio de citometría, se tomaron 3 registros distintos para obtener un análisis más detallado: en cada registro se utilizó 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de células; en el primero se analizaron las células sin ningún tipo de marcador y se les denominó control negativo; para el segundo, se añadió 20  $\mu\text{L}$  de tritón X-100 al 1% a las células, con el fin de generar un daño en la membrana de las células y así, simular un posible daño en caso de que la descongelación fallara, y poder obtener un control positivo. Posteriormente, a este mismo tubo se le añadió 1  $\mu\text{L}$  de yoduro de propidio (IP) para realizar la marcación de ADN; el tercer registro, fue de las células junto con 1  $\mu\text{L}$  de IP. Se analizó el tercer registro en comparación con el control positivo y negativo y de esta forma se determinó la viabilidad.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se presentan como la media aritmética de los valores  $\pm$  desviación estándar. Las comparaciones entre los grupos en estudio, se realizaron utilizando análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Bonferroni. Para todos los análisis estadísticos realizados, los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos. Se realizaron mínimo tres réplicas por experimento ( $n=3$ ), con al menos una repetición independiente para comprobar la reproducibilidad de los resultados.

## Capítulo 5. Resultados y análisis de resultados

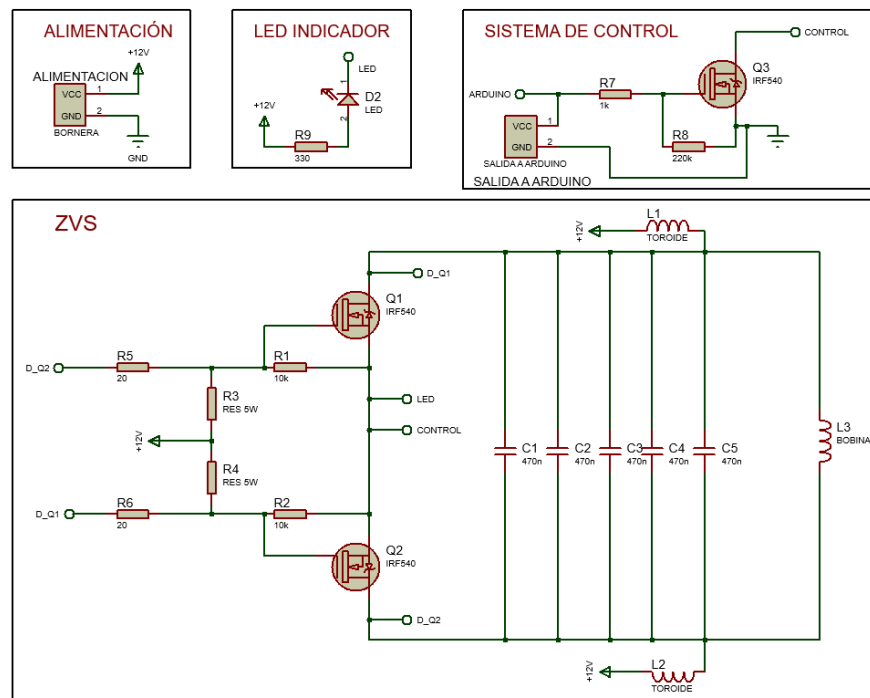
### Resultados

#### Diseño e implementación del sistema de inducción

Mediante Proteus Professional, se realizó el esquemático del circuito de inducción, en la figura 10, se observan las 4 partes que conformaron el circuito eléctrico, como lo son: la fuente de alimentación, el led indicador de encendido del circuito, los componentes del sistema de control, y finalmente, el circuito ZVS con la bobina de carga.

**Figura 10**

*Esquema electrónico prototipo de descongelamiento*



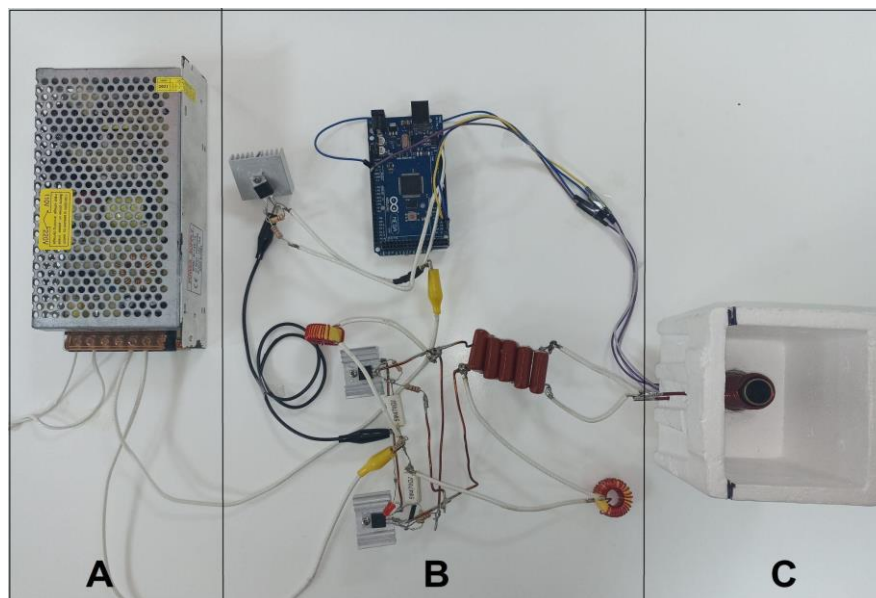
Primeramente, para el circuito ZVS, se escogieron los MOSFET de referencia IRFZ44N, con un  $V_{ds}$  de 55V, un  $I_d$  de 49A y un  $P_d$  de 94W. Para el circuito resonante, se utilizó una capacitancia de 2,35  $\mu\text{F}$ , divididos en 5 condensadores de 470 nF cada uno. La bobina utilizada, fue elaborada de

una sola capa, con una longitud de 5 cm, un diámetro de 2 cm, con núcleo de aire y con un total de 10 espiras, teniendo así una inductancia de  $0,4515 \mu\text{H}$ . De esta forma, aplicando la ecuación 5, se determinó la frecuencia de resonancia del circuito, siendo de  $0,1545 \text{ MHz}$ .

En la figura 11, se observa la implementación del circuito electrónico, el sistema de control, y el sistema adiabático. Dentro del sistema adiabático se encuentra la bobina de carga, la cual posee en su interior una pieza de bronce, con dimensiones de 45 mm de longitud, 13,5 mm de diámetro y 2 mm de grosor, en esta pieza se ubicaron los viales a descongelar. El sensor infrarrojo utilizado como sistema de retroalimentación fue el MLX90614, gracias a sus características internas, se permitió obtener la medición de temperatura del objeto que se apuntaba en el sensor, y la temperatura del ambiente en que se encontraba.

### Figura 11

*Diseño preliminar del sistema de descongelación*



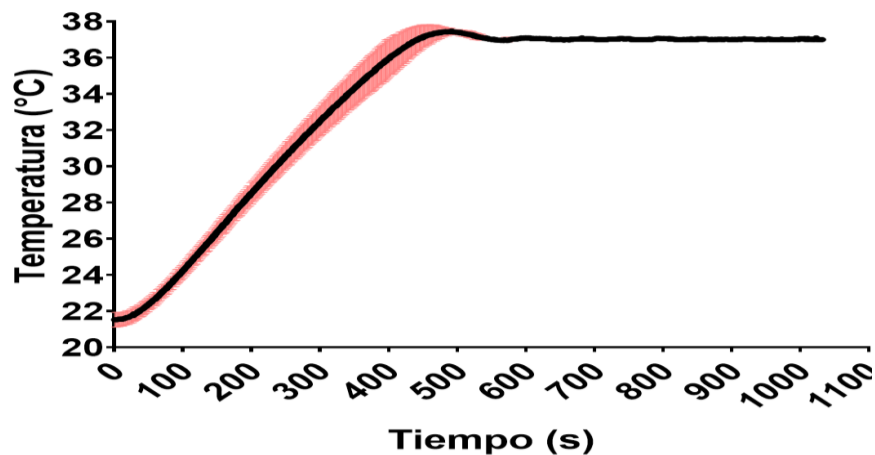
*Nota.* Fuente de alimentación 12V 10A del sistema (A), sistema electrónico y de control (B), sistema adiabático (C).



Una vez se tuvo todas las partes del sistema de inducción conectadas, se realizó la calibración por medio de control PID para obtener las temperaturas deseadas, para esto se realizó una sintonía manual de las variables del sistema, dejando como resultado, valores de 320 en el control proporcional, 0.505 en el integral y 5 en el derivativo (ver código anexo 1). Posteriormente, se realizaron tres pruebas de calibración, observando el tiempo que tardó el equipo en llegar a 37°C y comprobando que se estabilizó en el valor deseado, los resultados de las pruebas individuales se encuentran en anexos (anexos 4-6). En la figura 12, se graficó el promedio  $\pm$  desviación estándar de las tres pruebas realizadas, se apreció qué, el sistema tardó alrededor de 500 segundos, en llegar desde la temperatura de inicio, 21.4°C, hasta el pico máximo de temperatura, que fue de 37.6 °C. Posteriormente, se produjo un leve descenso de la temperatura para llegar al equilibrio a 37°C con un margen de error de  $\pm 0.1^\circ\text{C}$ , finalmente, el sistema se dejó encendido durante 16 minutos, donde no se presentaron fluctuaciones significativas en la temperatura.

### Figura 12

*Estabilización del sistema de control para un setpoint de 37 °C*



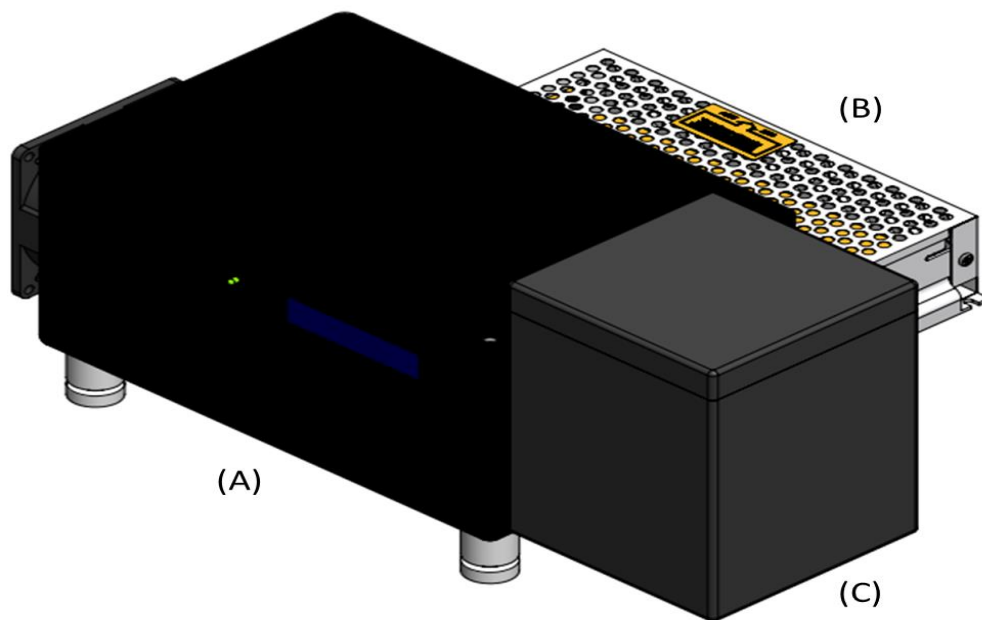
*Nota:* El color rojo representa la desviación estándar de cada segundo registrado, debido a la gran cantidad de datos de la muestra y al tamaño limitado de la imagen, no se logra apreciar con claridad las barras de desviación estándar.

### Diseño en CAD de carcasa del sistema de descongelamiento

Como resultado del diseño CAD del prototipo, teniendo como referencia el tamaño de la fuente de alimentación, el circuito electrónico, el microcontrolador Arduino, y demás componentes, se obtiene un modelo 3D, como se observa en la figura 13.

#### Figura 13

*Vista isométrica del diseño CAD del prototipo*

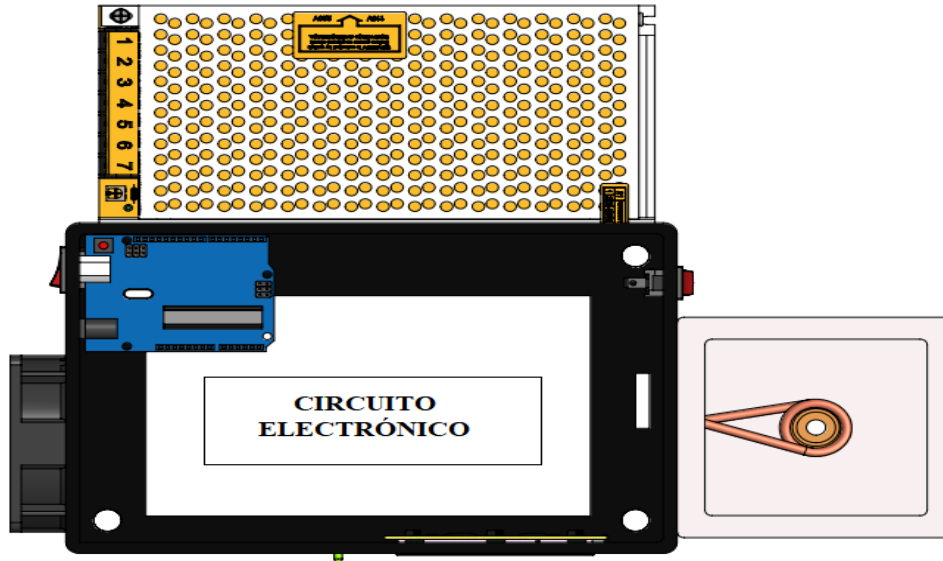


*Nota.* Sistema electrónico y de control (A), fuente de alimentación 12V 10A (B), Sistema adiabático (C).

En la figura 14, se observa el interior de la carcasa donde se encuentra ubicado el microcontrolador Arduino, el sistema electrónico, los cables de conexión, como también la ubicación de la bobina de inducción y pieza metálica dentro del sistema adiabático.

**Figura 14**

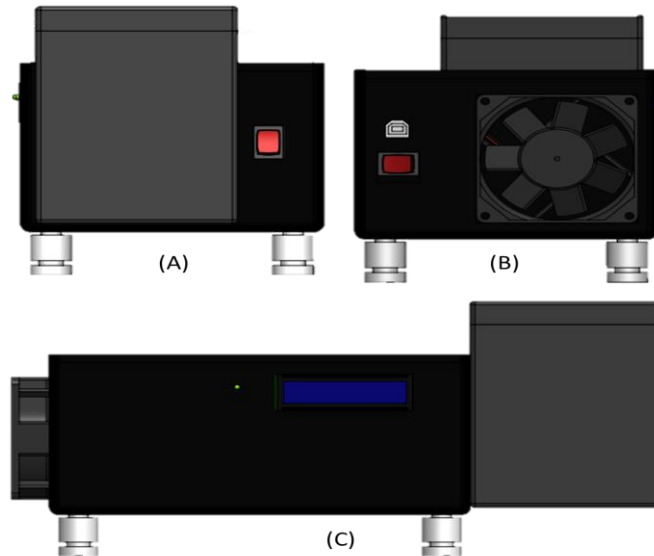
*Vista superior del diseño CAD 3D de la carcasa*



Por otra parte, en la figura 15, en la sección A se presenta la vista frontal permitiendo observar la ubicación del sistema adiabático y el interruptor que permite el inicio del descongelamiento, en el apartado B se expone la vista posterior de la carcasa pudiendo observar el interruptor on-off del sistema, la ubicación del cooler y la conexión plug USB del microcontrolador Arduino, por último, la sección C corresponde a la vista lateral de la carcasa donde se visualiza la pantalla LCD y una alarma visual que indica el encendido y apagado del sistema.

## Figura 15

*Vistas 3D del diseño CAD con sus respectivos elementos*

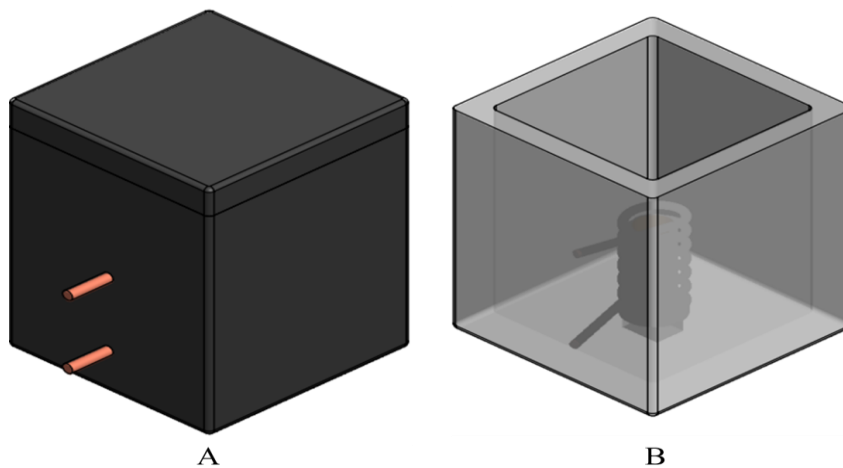


*Nota.* Vista frontal (A), vista posterior (B) y vista lateral (C).

En la figura 16 se observa a mayor detalle el sistema adiabático que contiene la bobina de inducción y la pieza metálica donde se introduce el criovial para su descongelación como también, la ubicación del sensor infrarrojo.

## Figura 16

*Vista isométrica del sistema adiabático*

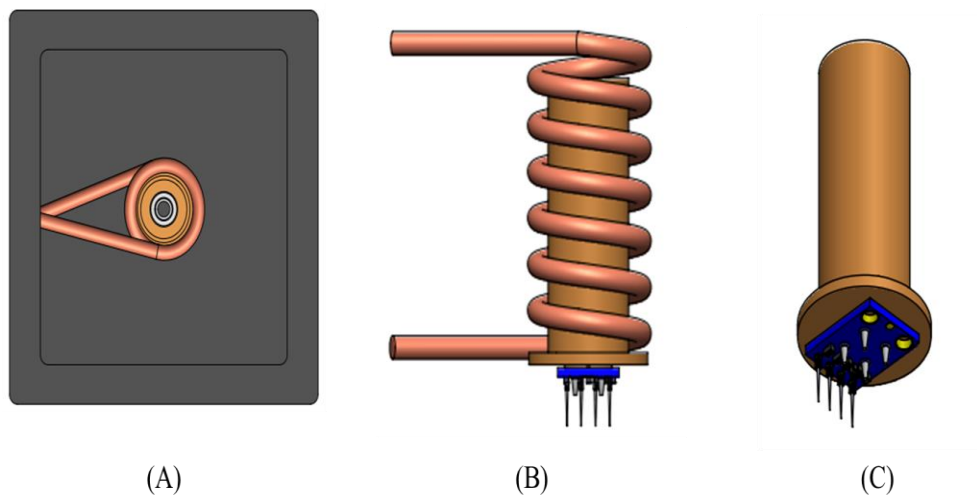


*Nota:* A) Vista exterior del sistema adiabático. B) vista interior del sistema adiabático.

Asimismo, en la figura 17, se muestra la ubicación de los elementos que contiene el sistema adiabático en su interior, en la sección A se observa una vista superior donde se visualiza la ubicación de la bobina dentro del sistema, en la sección B se muestra la ubicación de la pieza metálica dentro de la bobina y, por último, se detalla la ubicación del sensor infrarrojo dispuesto en la parte inferior de la pieza metálica

### Figura 17

*Ubicación de los elementos que componen el sistema adiabático*

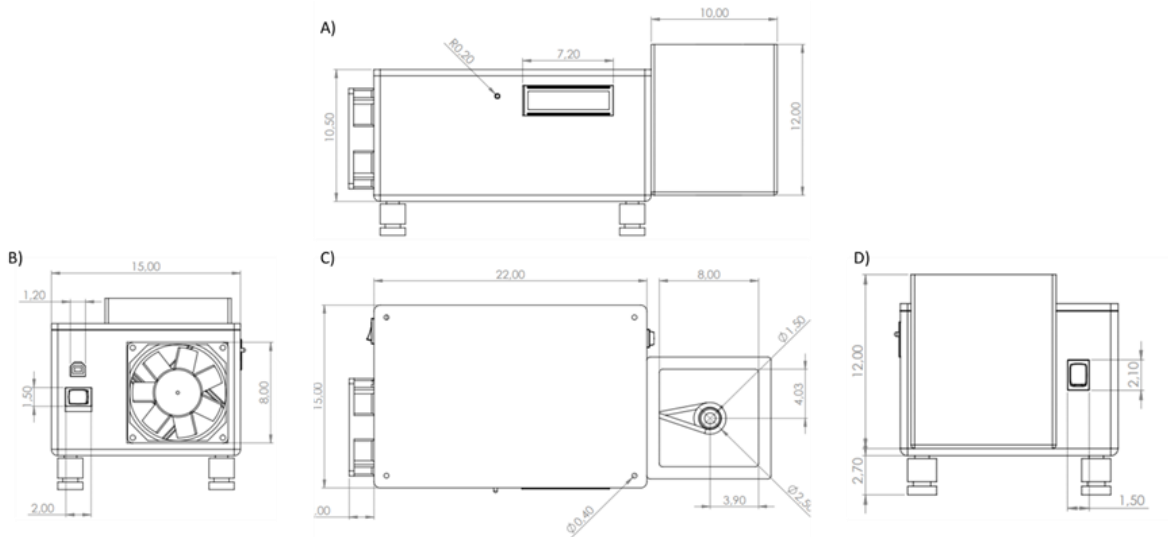


*Nota.* A) vista superior del sistema adiabático. B) vista lateral del sistema adiabático. C) ubicación de sensor infrarrojo.

En resumen, en la figura 18, se muestran los planos 2D con sus respectivas cotas dadas en milímetros de los elementos que componen el sistema electrónico y sistema adiabático

## Figura 18

*Planos 2D con sus respectivas cotas de las diferentes vistas del diseño CAD*



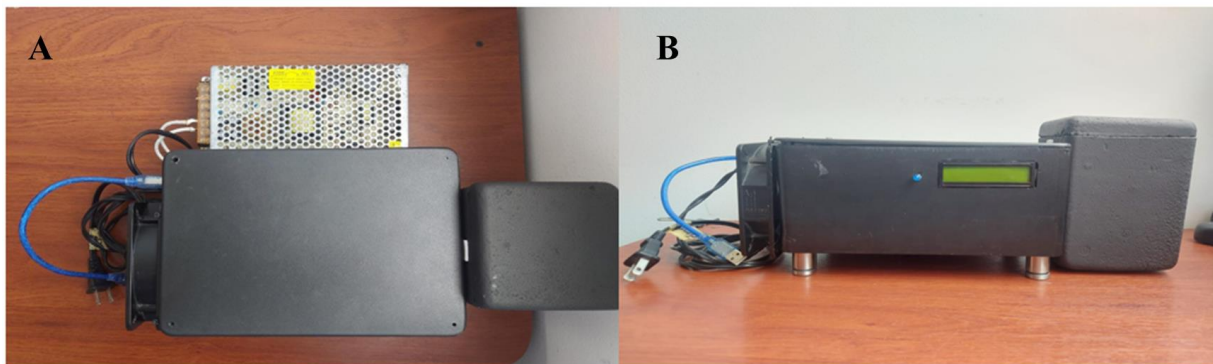
*Nota.* Vista lateral (A), vista posterior (B), vista superior (C), vista frontal (D). Medidas dadas en centímetros.

## Carcasa física

Una vez se obtuvieron los planos tanto del sistema de inducción como del sistema adiabático, se llevó a cabo la puesta en marcha de la creación de la carcasa, como resultado, se observa en la figura 19, todo el sistema de inducción con sus componentes.

## Figura 19

*Vistas superior y lateral del sistema de inducción en físico con sus respectivos elementos*



*Nota.* Vista superior (A), vista lateral (B) del sistema de inducción.

### **Pruebas con viales de 1 mL de FBS + DMSO**

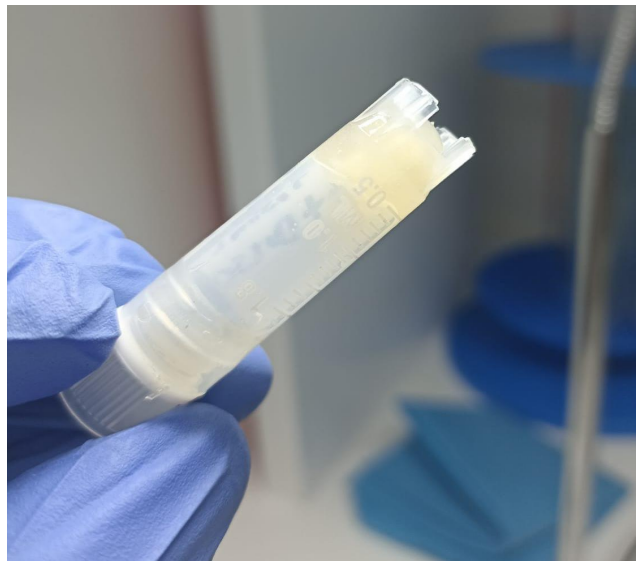
A continuación, se exponen los resultados de las pruebas preliminares de descongelación de los viales con un volumen de 1 mL a diferentes temperaturas ambiente.

#### **Vial congelado a $-196^{\circ}\text{C}$**

Para las pruebas preliminares, se inició con una setpoint de  $37^{\circ}\text{C}$ , para comparar los resultados y tiempos de descongelación utilizando el sistema de inducción, respecto al baño serológico. Inicialmente, el criovial se dejó un tiempo de 4 minutos para su descongelación, sin embargo, como se observa en la figura 20, no se evidenció descongelación del vial, debido a que, por las dimensiones de la pieza y del criovial, nunca se hizo contacto completamente entre las dos partes, por tanto, se presentaron pérdidas de calor producidas por la baja conducción térmica del aire, lo que llevó a incrementar el tiempo de descongelamiento.

#### **Figura 20**

*Estado del vial post-descongelación durante 4 minutos.*



Debido a esto, se realizaron tres ensayos incrementando los tiempos descongelación, y se evaluó el estado del interior del vial post-descongelación. Se eligió como mejor tiempo, aquel

que, luego de la descongelación, preservó un pequeño cúmulo de hielo.

**Tabla 3**

*Tiempos de descongelación y estado del vial con setpoint de 37°C*

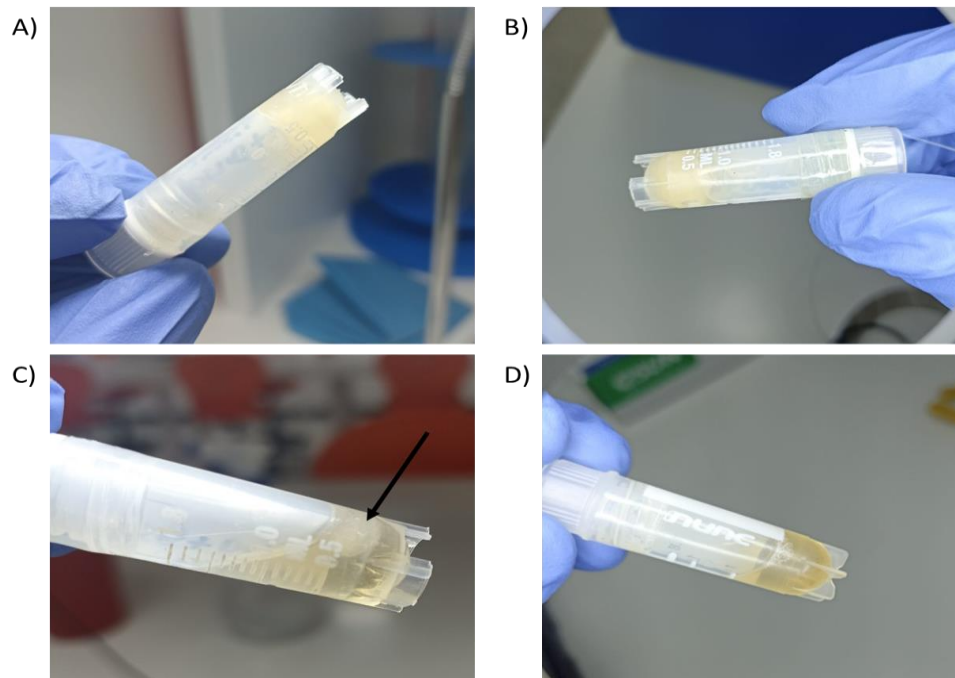
| Setpoint (°C) | Tiempo (min) | Estado de descongelación    |
|---------------|--------------|-----------------------------|
| 37            | 4            | Congelado                   |
|               | 5            | Descongelación (40%)        |
|               | <b>6</b>     | <b>Descongelación (90%)</b> |
|               | 7            | Descongelación (100%)       |

*Nota:* Los porcentajes de descongelación fueron designados de acuerdo con la cantidad de hielo post-descongelación observado por los autores.

Como se observa en la tabla 3, se registró los tiempos de descongelamiento de cada vial y su estado final. Tal como se observa en la figura 21, el vial que post-descongelamiento, mantuvo un pequeño bloque de hielo, fue el que duró 6 minutos durante la descongelación.

**Figura 21**

*Estado de descongelación de los viales con setpoint de 37°C a diferentes tiempos*



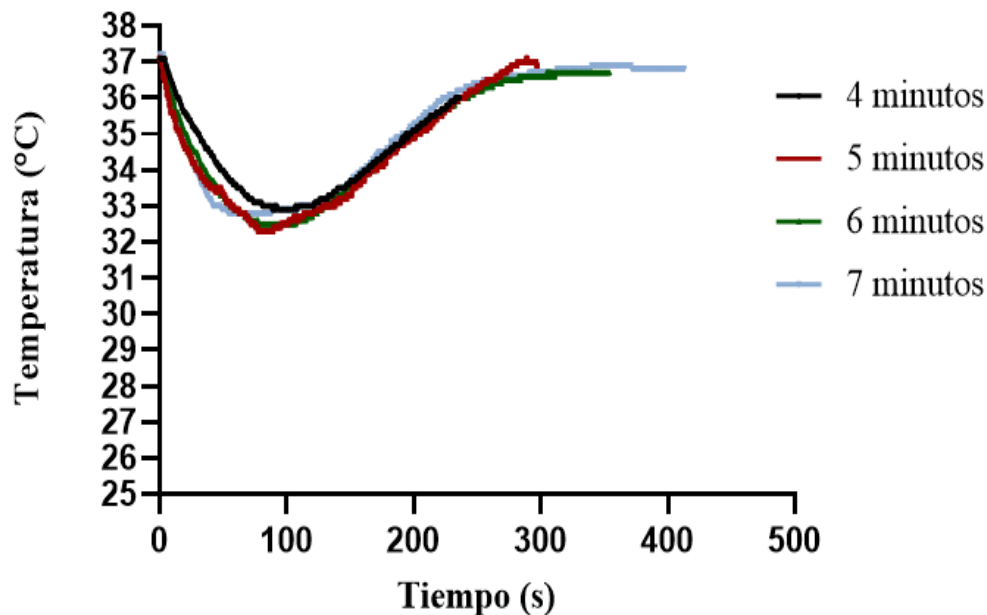


*Nota:* A) Estado final del interior del vial con 4 minutos de descongelación. B) Estado final del interior del vial con 5 minutos de descongelación. C) Estado final del interior del vial con 6 minutos de descongelación. D) Estado final del interior del vial con 7 minutos de descongelación. La flecha en la imagen C, indica el cúmulo de hielo resultante.

Asimismo, se graficó, en la figura 22, el comportamiento de la temperatura ambiente en cada una de las pruebas realizadas. Se observó un mismo patrón de comportamiento de la temperatura ambiente, sin embargo, la mayor fluctuación se produjo entre los segundos 20 y 50; esto se ocasionó, debido al tiempo que se tardó en sacar el vial del nitrógeno líquido, e introducirlo en la pieza metálica y su posterior descongelación. Los resultados individuales se encuentran en anexos (anexos 7 al 14).

### Figura 22

*Gráficas de los resultados de temperatura ambiente con los 4 tiempos de descongelamiento*

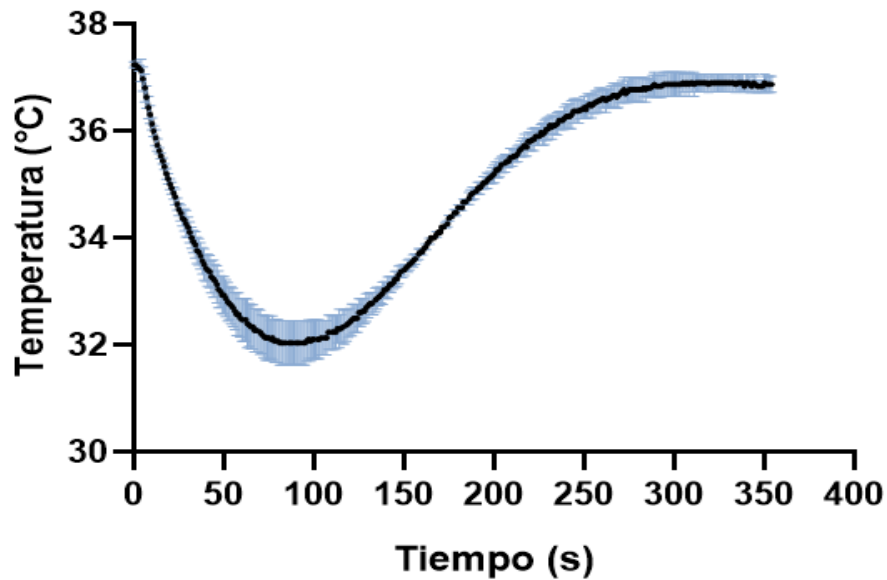


Luego de encontrar el mejor tiempo, se realizaron dos ensayos adicionales, bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura, con el fin de constatar que los resultados fueran los adecuados y observar la repetibilidad del sistema. De igual manera, se tomó registro del comportamiento de la

temperatura ambiente dentro de la pieza metálica durante el descongelamiento. En la figura 23, se muestra la media y desviación estándar, de las tres pruebas realizadas a 37°C durante 6 minutos, en el cual se encontró un mismo patrón de comportamiento de la temperatura ambiente, además, como se observa en la gráfica, debido a que el criovial está a -196°C al momento de iniciar el descongelamiento, se produjo una disminución de temperatura de aproximadamente 5.5°C durante el primer minuto, posterior a esto, la temperatura incrementó gradualmente, hasta volver a un equilibrio de 37°C en el ambiente. Los resultados individuales se encuentran en anexos (anexo 15 al 18).

### Figura 23

*Gráfica de la media  $\pm$  desviación estándar de las tres pruebas realizadas a 37°C durante seis minutos.*



*Nota:* El color azul representa la desviación estándar de cada segundo registrado, debido a la gran cantidad de datos de la muestra y al tamaño limitado de la imagen, no se logra apreciar con claridad las barras de desviación estándar.

A pesar de que se obtuvo un resultado aceptable con un setpoint de 37°C, el tiempo de descongelación no fue favorable, ya que lo ideal era, igualar o reducir al empleado en baño serológico. Por lo tanto, se decidió incrementar el setpoint, y buscar así, el menor tiempo de descongelación posible, sin que se viera afectado el estado de las células ni el estado físico de los crioviales.

En la tabla 4, se observan las temperaturas que se tomaron como setpoint y el lapso de tiempo que tardó el proceso para obtener una descongelación ideal, sabiendo que, esto significa que post-descongelación se obtuvo un pequeño cúmulo de hielo en el interior del vial.

**Tabla 4**

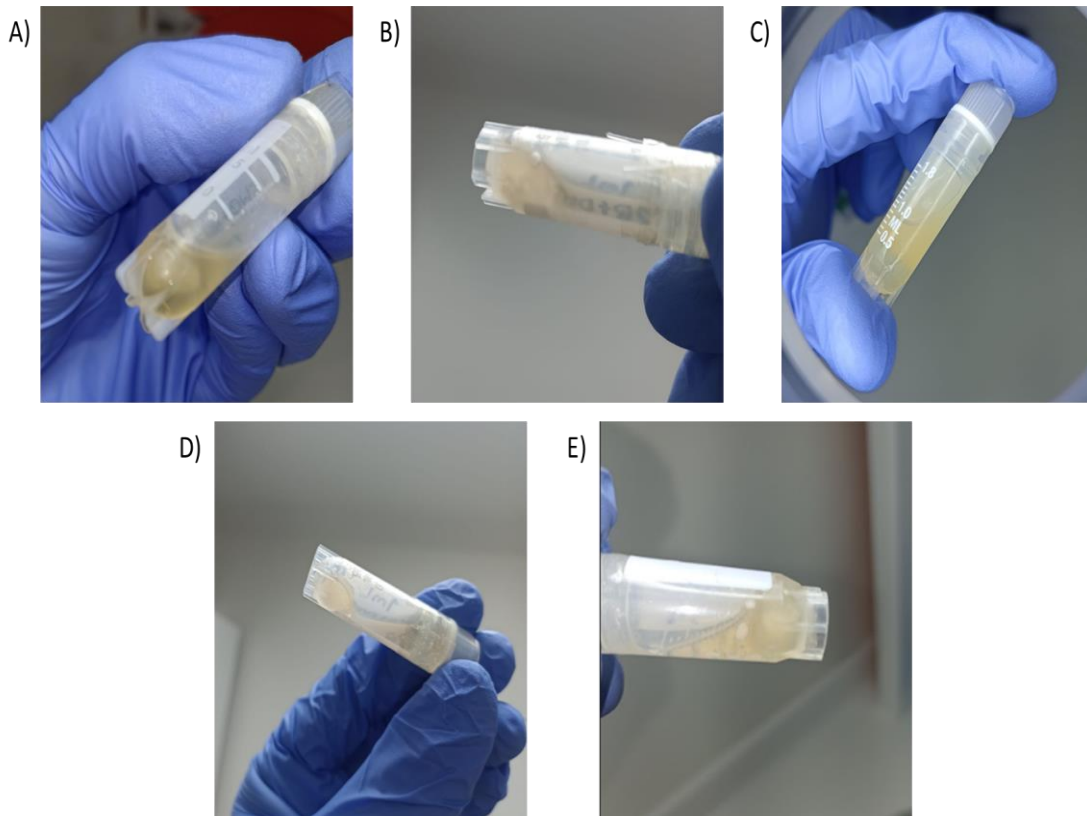
*Tiempos de descongelación y estado del vial con distintos setpoint*

| Setpoint (°C) | Tiempo (min)     |
|---------------|------------------|
| 50            | 4.6 - 4.8        |
| 80            | 4.0 - 4.2        |
| 90            | 3.6 - 3.8        |
| 100           | 3.0 - 3.2        |
| <b>120</b>    | <b>2.5 - 2.7</b> |

En la figura 24, se observa los resultados obtenidos de los viales descongelados a los diferentes setpoint. Cómo se evidencia en la gráfica, todos los viales terminan con un pequeño cubo de hielo, tal como se pretendía, posteriormente se analizaron los comportamientos de la variación de la temperatura, con el fin de escoger el mejor setpoint para realizar la descongelación de células.

**Figura 24**

*Estado de descongelación de los viales empleando diferentes temperaturas de setpoint inicial.*



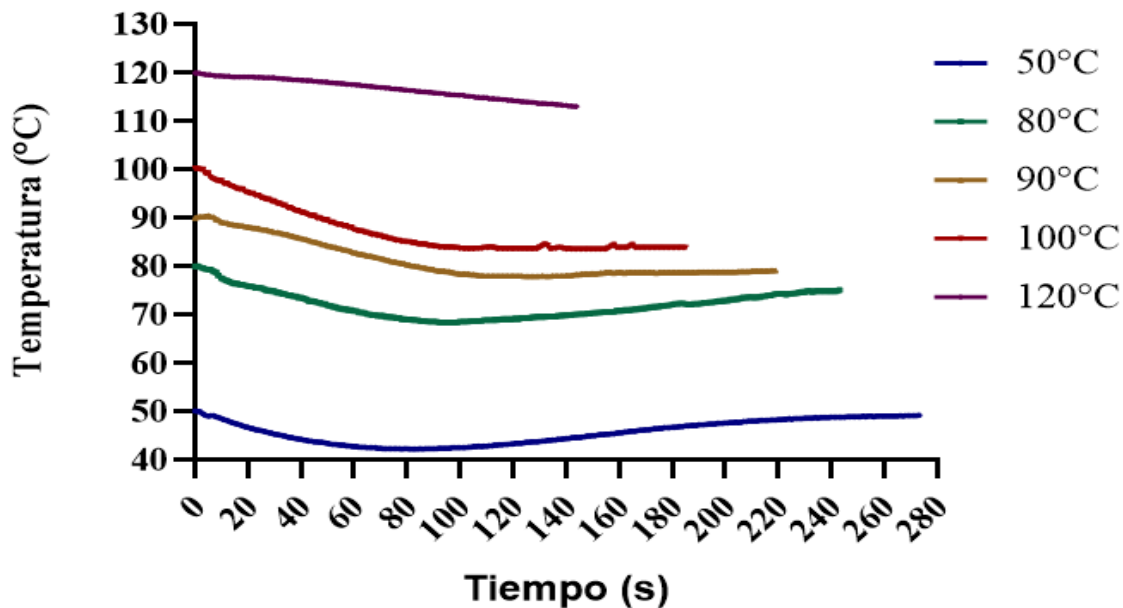
*Nota:* A) Vial descongela a setpoint de 50°C. B) Vial descongela a setpoint de 80°C. C) Vial descongela a setpoint de 90°C. D) Vial descongela a setpoint de 100°C. E) Vial descongela a setpoint de 120°C.

Mientras que en la figura 25, se registró el comportamiento de la temperatura para cada uno de los setpoint seleccionados y los tiempos en que se descongeló cada vial. Como se observa, en cada prueba realizada se mantuvo el mismo comportamiento para cada setpoint, independiente del valor utilizado. Con setpoint de 50°C, se observa una disminución de la temperatura, al igual que en 37°C, por las condiciones térmicas en que se introdujo el criovial, luego, debido a la temperatura dentro de la pieza metálica, la temperatura ambiente dejó de disminuir y empezó a regularse, esos cambios de temperatura se lograron percibir debido a la cantidad de tiempo, que tardó el sistema en

realizar el descongelamiento (4.6 min). Tanto en 90°C como en 100°C, se logró registrar la disminución de la temperatura y se observa un leve incremento, sin embargo, como en estos dos casos el tiempo fue menor, 3.7 y 3.0 minutos respectivamente, no se alcanzó a registrar. Finalmente, en 120°C solo se evidenció una disminución de la temperatura de 7°C, lo que significa que se produjo rápidamente un equilibrio térmico entre la temperatura del ambiente y la temperatura del criovial. Es por esto, que se decidió realizar más pruebas, utilizando como setpoint inicial 120°C, ya que fue la que necesitó menos tiempo para realizar el descongelamiento del vial de prueba. Los resultados de las pruebas individuales se encuentran en anexos (anexos 19 al 28).

### Figura 25

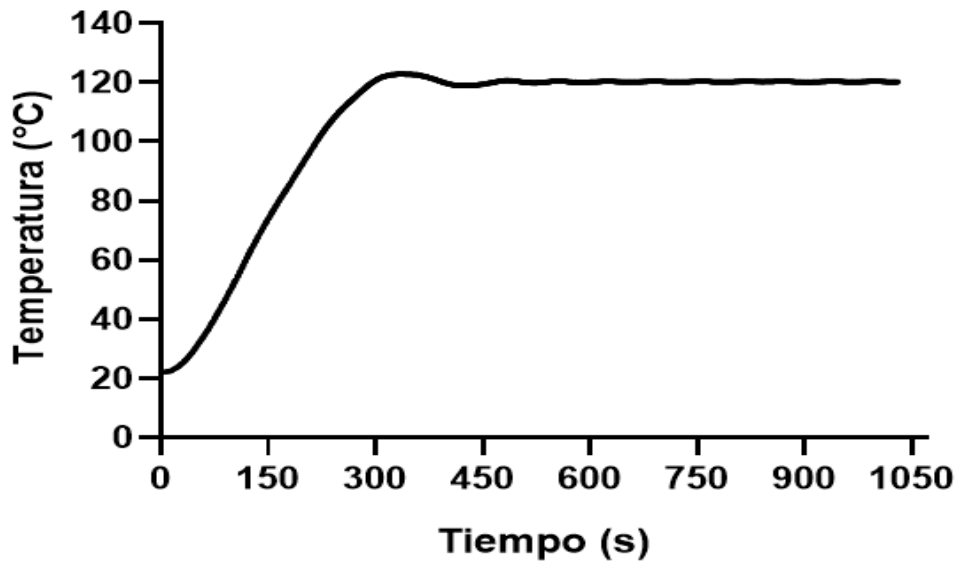
*Gráfica del comportamiento de la temperatura ambiente durante las pruebas de descongelación a diferentes setpoint iniciales*



Primero, se realizó una prueba de calibración y de puesta en marcha del sistema, con setpoint de 120°C, con el fin de verificar el correcto funcionamiento del sistema. Como se observa en la figura 26, luego de 400 segundos, se logró una estabilización en 120°C y se dejó el equipo encendido durante 17 minutos.

**Figura 26**

*Estabilización del sistema a 120°C*

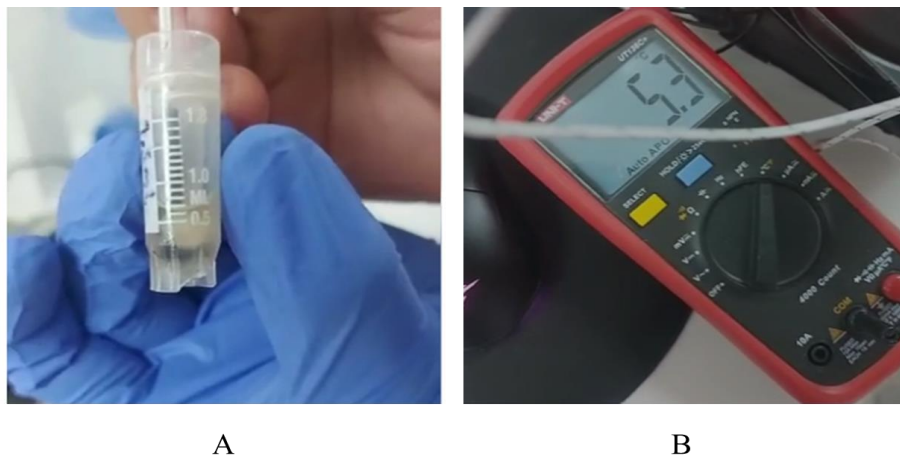


Como segunda prueba, y sabiendo que, 120°C fue una temperatura ambiente considerablemente alta para el descongelamiento, se realizó una prueba, para conocer la temperatura máxima alcanzada durante la descongelación de la solución de FBS + DMSO, es decir, se realizó la descongelación de un vial, y se ubicó una termocupla en el interior del mismo, durante toda la descongelación. Una vez culminó el proceso, se registró la temperatura de la muestra, y se esperaba que esta no superara los 6°C.

Como resultado, tal como se evidenció en la figura 27, la temperatura máxima durante la descongelación fue de 5.3°C. Por tanto, se eligió esta temperatura como setpoint para la descongelación de células hematopoyéticas, ya que, a esta condición, se obtuvo el menor tiempo posible de descongelación y la temperatura interior no superó los 6°C.

**Figura 27**

*Ubicación de la termocupla en el interior del vial y registro de la temperatura final.*

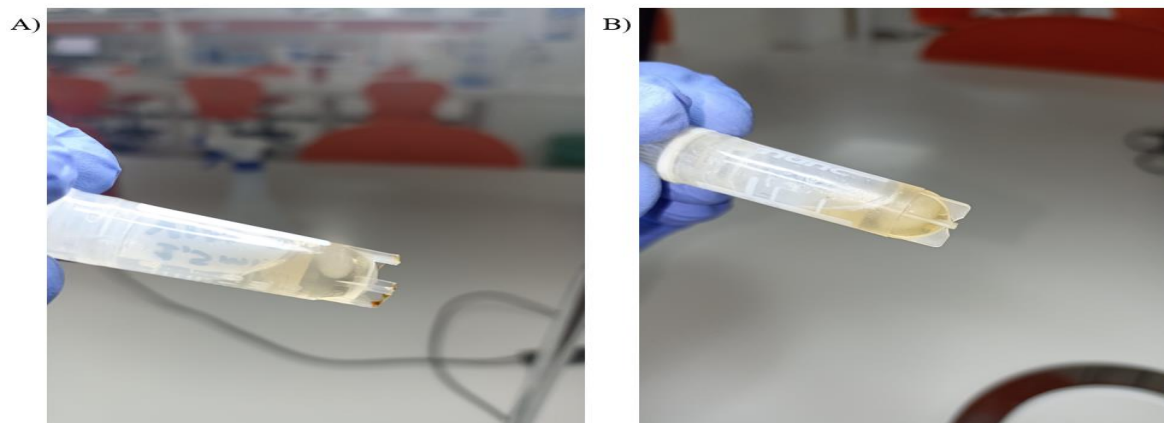


*Nota:* A) Posicionamiento de la termocupla durante la descongelación. B) Temperatura máxima de la muestra durante la descongelación.

Luego de verificar que la temperatura interna máxima del vial fue de  $5.3^{\circ}\text{C}$ , se realizaron dos pruebas más de descongelamiento de viales con FBS + DMSO a  $120^{\circ}\text{C}$ , dando como resultado un descongelamiento ideal, tal como se observa en la figura 28. Cada vial posee un pequeño bloque de hielo post-descongelamiento y fue descongelado dentro de los rangos de tiempos establecidos.

**Figura 28**

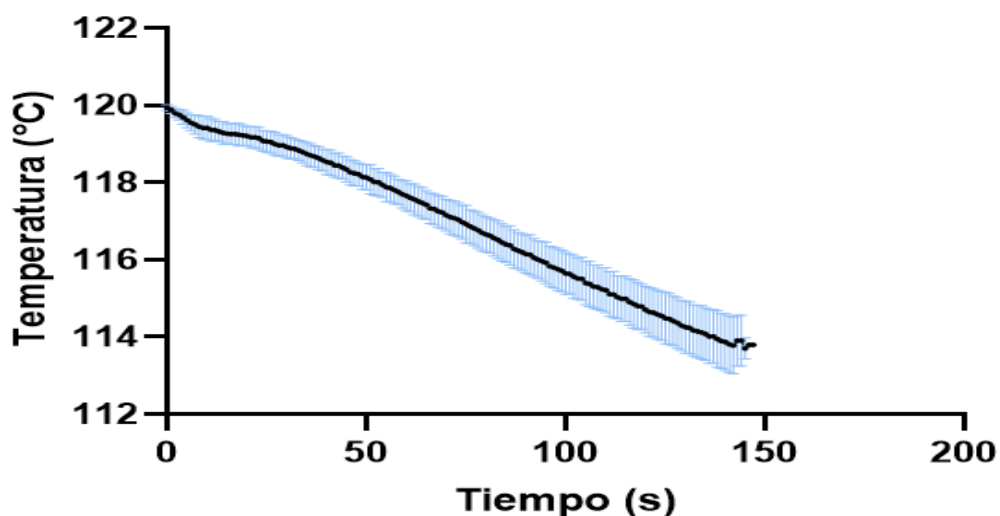
*Estado de descongelación de los viales a diferentes temperaturas iniciales*



En la figura 29, se graficó la media  $\pm$  desviación estándar, de las tres pruebas realizadas con un setpoint de 120°C, la diferencia máxima que hubo entre las medidas fue de  $\pm 2^\circ\text{C}$ . Además, se evidenció que, en todos los registros, el comportamiento de la temperatura tuvo un mismo patrón, de igual forma, se obtuvo un rendimiento favorable, en cuanto al estado de descongelación, por tanto, se procedió a realizar las pruebas de descongelamiento de células mononucleares bajo estas condiciones de descongelamiento. Los resultados de las pruebas individuales se encuentran en anexos (anexos 29 al 32).

### Figura 29

*Media  $\pm$  desviación estándar de las tres pruebas realizadas de descongelación a 120°C.*



*Nota:* El color celeste representa la desviación estándar de cada segundo registrado, debido a la gran cantidad de datos de la muestra y al tamaño limitado de la imagen, no se logra apreciar con claridad las barras de desviación estándar.

### Descongelación de CMSP a -196°C

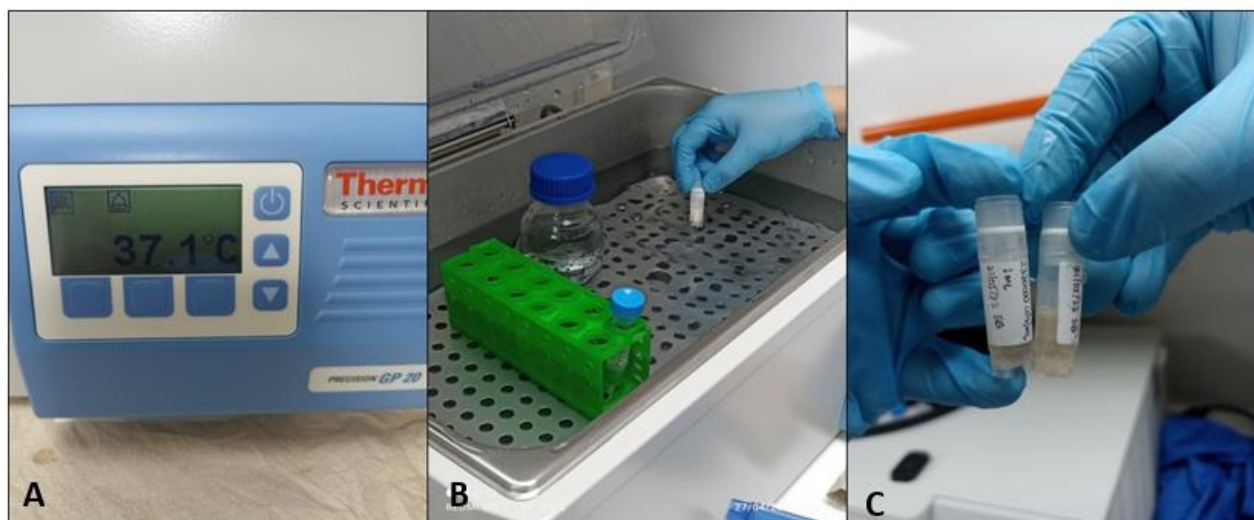
Inicialmente, como se observa en la figura 30, se llevó a cabo la descongelación por baño serológico para obtener las muestras de control, los viales se agitaron constantemente hasta obtener



una descongelación del 90% luego de 2.5 a 2.7 minutos. Este procedimiento se replicó tres (3) veces para la muestra M1 y una (1) vez para la muestra M2 y se clasificó tal como se describió en la metodología.

### Figura 30

*Descongelación por baño serológico.*

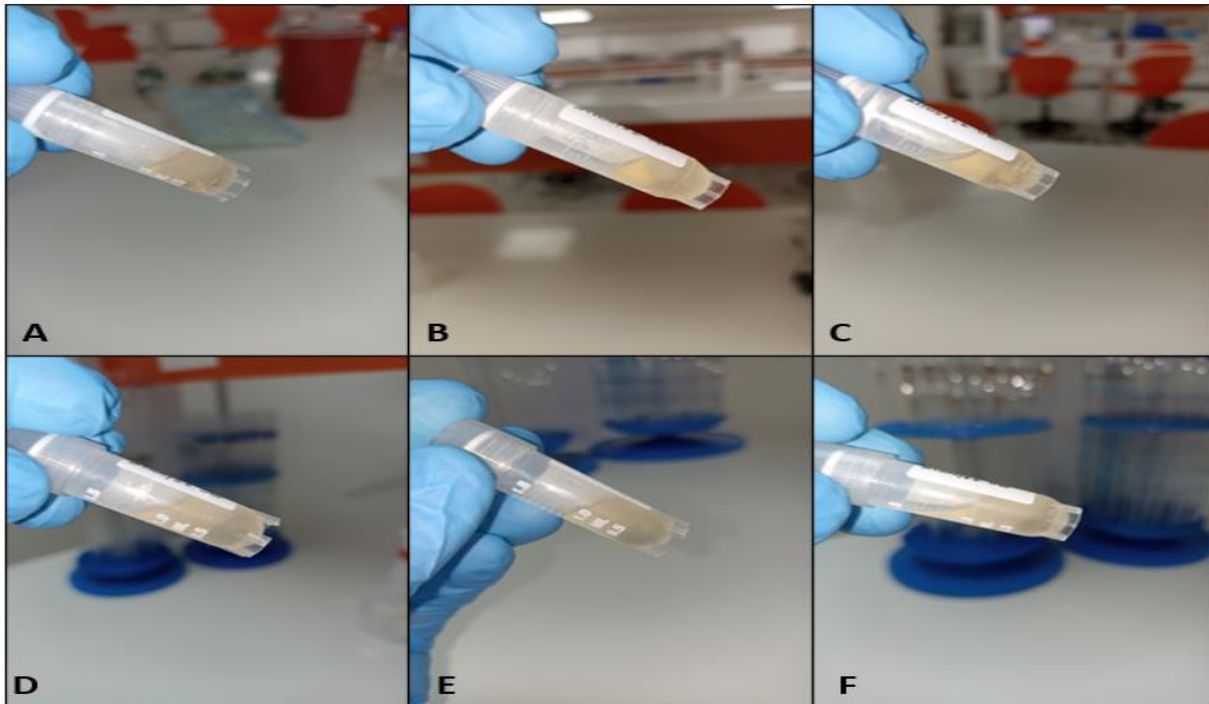


*Nota.* A) Temperatura del baño serológico, B) Inmersión del vial, C) Resultado final post-descongelación.

Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de descongelación de las muestras experimentales utilizando el sistema de inducción con setpoint a 120°C. En la figura 31, se observa el estado de descongelación de las seis (6) pruebas experimentales que se realizaron bajo el sistema de inducción.

**Figura 31**

*Viales de las muestras experimentales post-descongelación.*

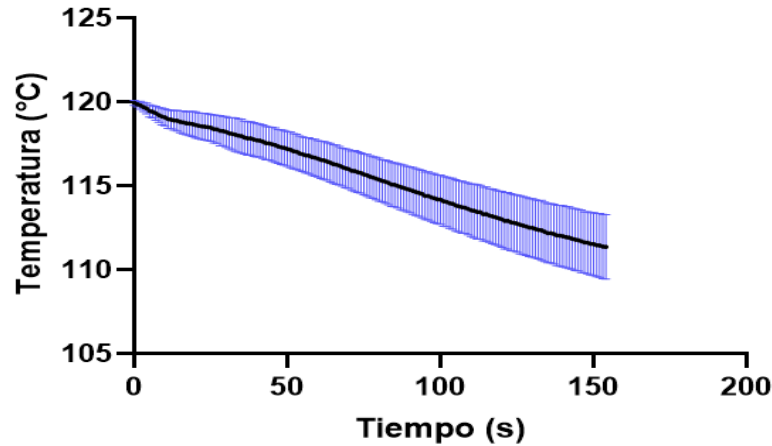


*Nota.* A) Experimental 1, B) Experimental 2, C) Experimental 3, D) Experimental, E) Experimental 5, F) Experimental 6.

Por otra parte, se graficó el comportamiento de la temperatura ambiente durante la descongelación de las seis (6) muestras, se obtuvo la media  $\pm$  desviación estándar, tal como se muestra en la figura 32, donde se observó un mismo patrón durante todo el descongelamiento de cada muestra, a pesar de que iniciaron desde un mismo punto, se presentaron variaciones durante la disminución de la temperatura tal como sucedió con las pruebas preliminares. Los resultados individuales, se encuentran en los anexos (anexo 33 al 44).

### Figura 32

*Comportamiento promedio de temperatura ambiente durante la descongelación de las 6 muestras experimentales*



*Nota:* El color azul representa la desviación estándar de cada segundo registrado, debido a la gran cantidad de datos de la muestra y al tamaño limitado de la imagen, no se logra apreciar con claridad las barras de desviación estándar.

Una vez finalizó el proceso de descongelación, se realizó un lavado con PBS y se pasó a un tubo Falcon de 15 mL, para realizar el conteo y evaluación de la viabilidad celular.

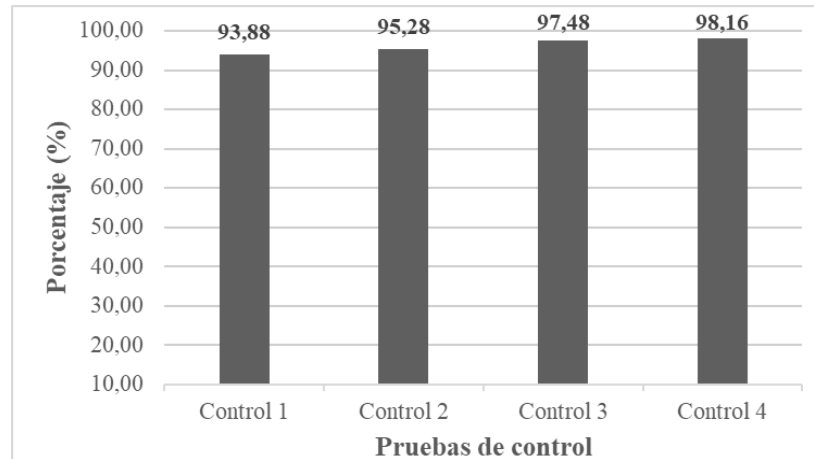
### Viabilidad celular

#### Ensayo de exclusión por azul de tripano

A continuación, en la figura 33 se exponen los resultados de viabilidad celular obtenidos del conteo celular post-descongelación de las células de control, utilizando el hemocitómetro (ver anexo 45).

**Figura 33**

*Porcentaje viabilidad celular post-descongelamiento por hemocitómetro*

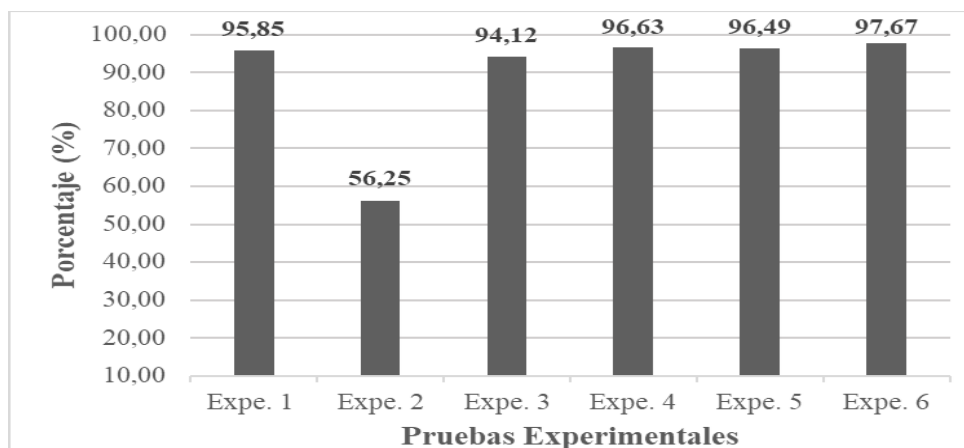


*Nota.* Los controles 1, 2, y 3 pertenecen a las pruebas de control realizadas de la muestra M1 y el control 4 pertenece a la prueba de control realizada de la muestra M2.

Como se observa en la anterior figura, mediante baño serológico, se obtuvo una viabilidad >90% en las cuatro muestras de control, lo que significa, que se realizó de manera correcta, tanto el proceso de criopreservación como el de descongelación. Así mismo, en la figura 34, se muestra la viabilidad celular obtenida de las pruebas experimentales descongeladas con el prototipo de inducción (ver anexo 46).

**Figura 34**

*Porcentaje viabilidad celular post-descongelamiento por hemocitómetro*

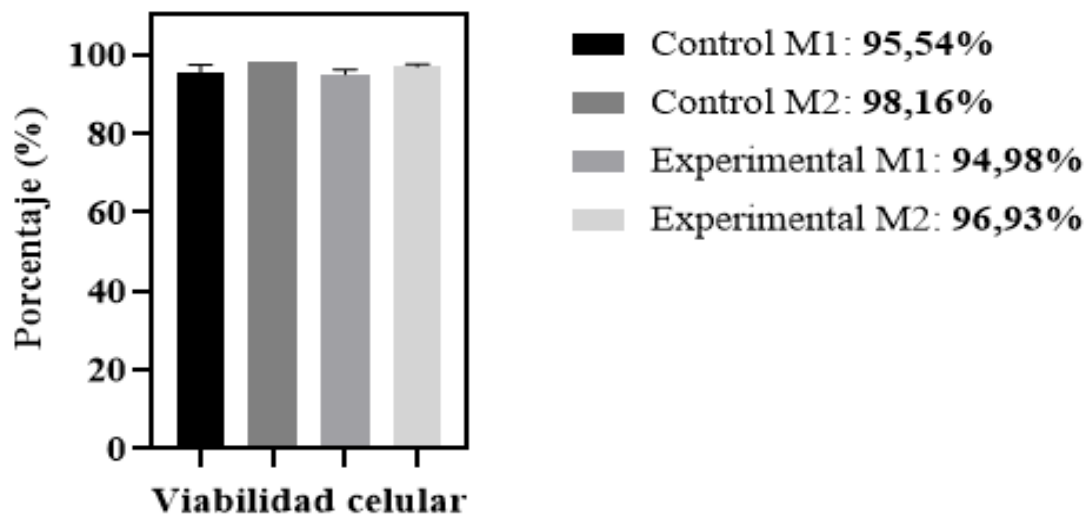


*Nota.* Expe. 1, 2, y 3 pertenecen a las pruebas experimentales realizadas de la muestra M1 y Expe. 4, 5 y 6 pertenecen a las pruebas experimentales realizadas de la muestra M2.

Se evidenció de igual manera, una alta viabilidad en cinco de las seis pruebas experimentales realizadas. En la segunda prueba (Expe. 2), se obtuvo un porcentaje muy bajo de viabilidad, producto de un imperfecto lavado de las células con PBS post-descongelación, impidiendo su evaluación, por tanto, para el análisis estadístico de las pruebas experimentales de la muestra M1 se tomaron  $n=2$  muestras independientes. A partir de estos datos, se determinó la media  $\pm$  desviación estándar de las pruebas de control y experimentales de cada muestra (M1 y M2), con el fin de comparar la viabilidad de los dos métodos usados para la descongelación, obteniendo así los porcentajes que se observan en la figura 35.

### Figura 35

*Viabilidad celular de las pruebas de control y experimentales por hemocitómetro*



En la figura anterior, se puede observar que la viabilidad celular obtenida de las dos muestras de células (M1 y M2) por los dos métodos de descongelamiento planteados, no representan diferencias significativas ( $p=0,5445$ ), sin embargo, debido a que el recuento de células por un

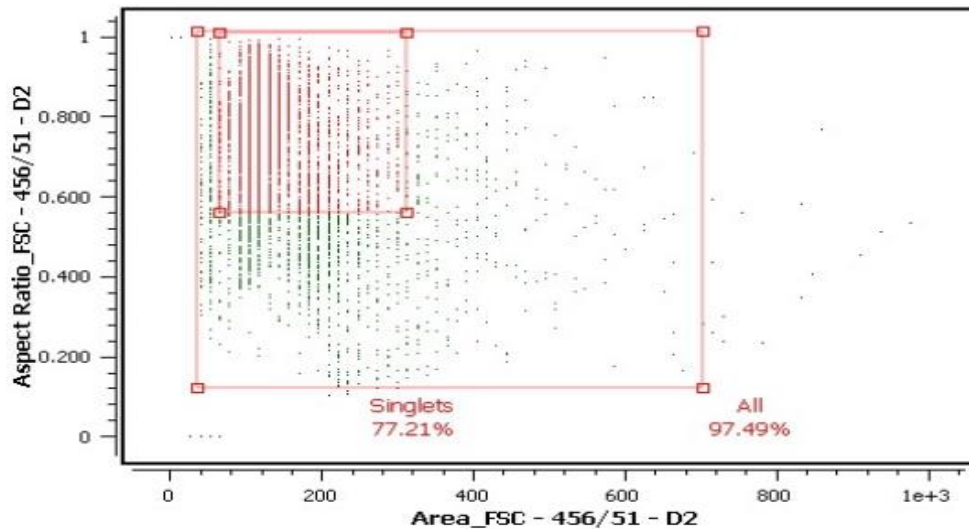
método manual (hemocitómetro) permite el conteo de un menor número de eventos, se realizó una segunda evaluación de la viabilidad celular por citometría de flujo, dado que estos son métodos confiables para distinguir mayores poblaciones de células vivas y muertas.

### Citometría de flujo

Inicialmente, como se observa en la figura 36, se tomó una muestra significativa de aproximadamente 5000 eventos, se seleccionaron las células que tuvieran un área mayor a 20  $\mu\text{m}$  y que tuvieran forma redonda y no alargadas.

### Figura 36

*Selección de la región de interés tomada para el análisis de las muestras*



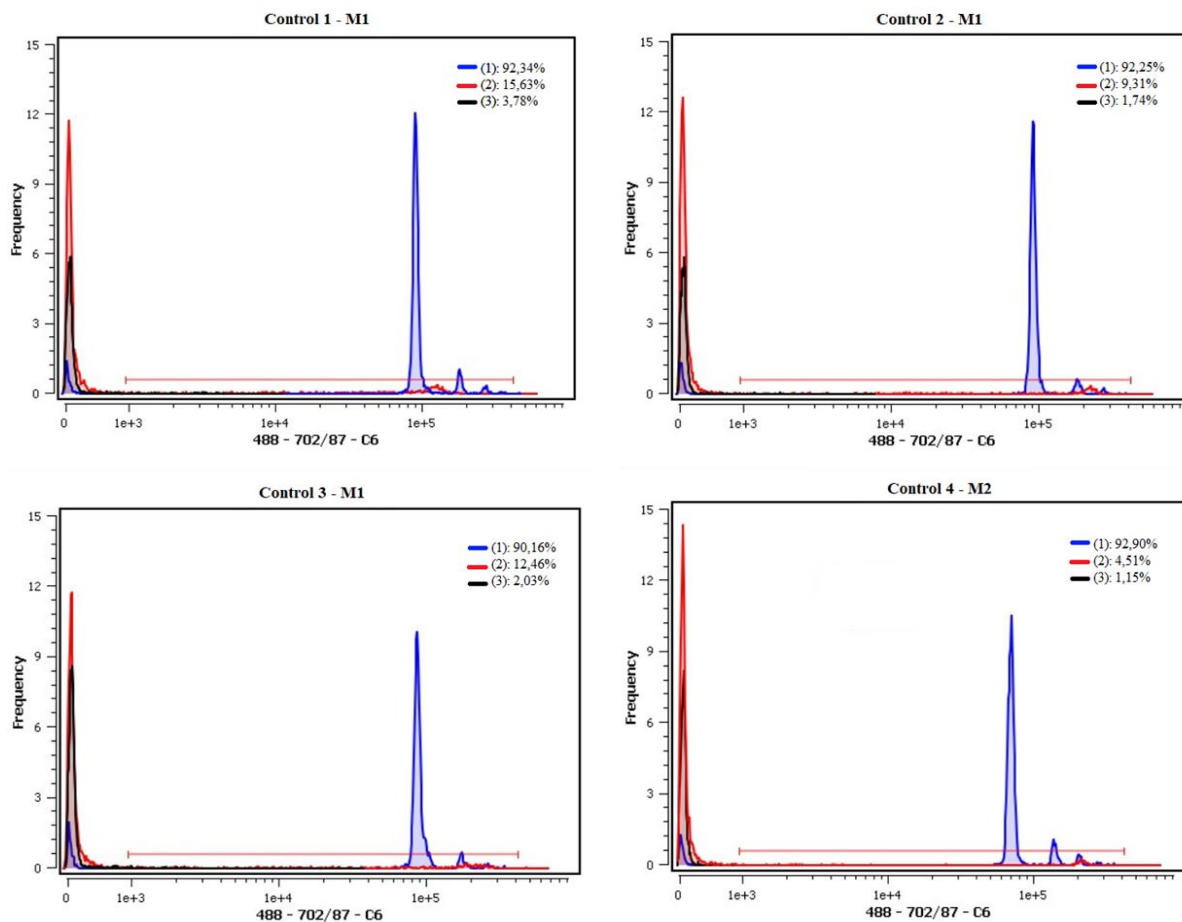
Una vez se definió la región de interés de las muestras seleccionadas, se analizaron las seis muestras descongeladas, se pasaron tres veces las muestras, cada una en una condición diferente como se muestra a continuación:

- **Azul:** Células + Yoduro de propidio + Tritón X-100
- **Rojo:** Células + Yoduro de propidio
- **Negro:** Células

En la figura 37, se observan los resultados obtenidos de las cuatro (4) pruebas de control. El color negro representa el control negativo, es decir, las células sin ningún tipo de marcador. Debido a que las células poseen una fluorescencia propia, el citómetro las consideró células muertas, por consiguiente, este valor se debió restar al valor mostrado de células + IP. El color azul representa el control positivo, y representan una mayor cantidad de células muertas, ya que fueron es por esto que su valor es mayor, y su tendencia es hacia la derecha de la gráfica. Finalmente, el color rojo, son las células marcadas con IP, y son las de interés. El porcentaje mostrado en cada una de las leyendas, significa la cantidad de células muertas detectadas por el citómetro. Asimismo, se observan resultados positivos, ya que, en todos los controles, las células + IP, están sobre el control negativo.

**Figura 37**

*Gráficas de la frecuencia de los marcadores de ADN de las muestras de control.*

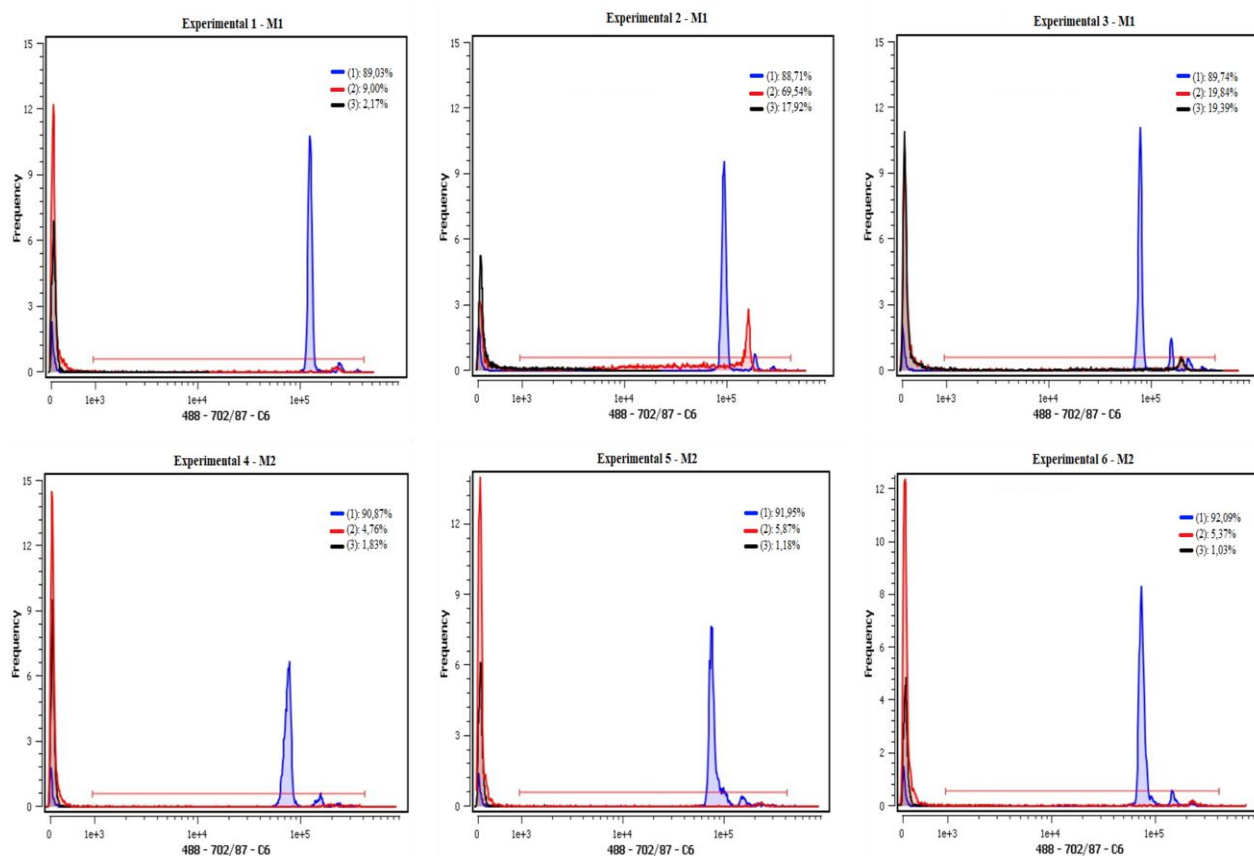


*Nota.* Células + IP + Tritón X-100 (1), Células + IP (2), Células sin ningún tipo de marcador (3).

Igualmente, en la figura 38 se registraron los seis resultados de descongelación, empleando el sistema de inducción. Se observa, al igual que en las células de control, que las células marcadas solo con IP, tienen una tendencia hacia el control negativo, lo que indicó una alta supervivencia post-descongelamiento.

### Figura 38

*Gráficas de la frecuencia de los marcadores de ADN de las muestras experimentales.*



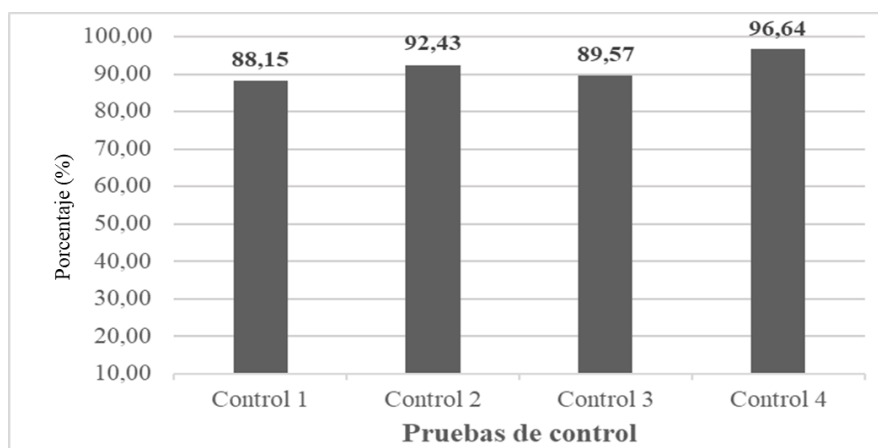
*Nota.* Células + IP + Tritón X-100 (1), Células + IP (2), Células sin ningún tipo de marcador (3).

Producto de los datos obtenidos previamente, en la figura 39, se muestra la viabilidad celular obtenida por citometría de flujo, de las pruebas de control, realizadas mediante el baño serológico.



**Figura 39**

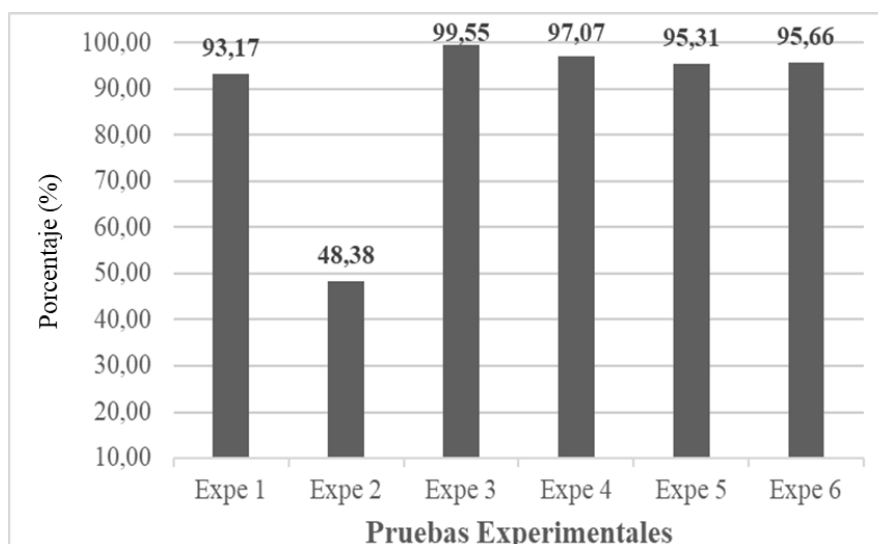
*Porcentaje viabilidad celular post-descongelamiento por citometría de flujo.*



Una vez se descongelaron las muestras, empleando el sistema de inducción, se esperaba que se obtuvieran resultados iguales o superiores en la viabilidad, respecto al baño serológico. En la figura 40, se presentan los porcentajes de viabilidad obtenidos usando el sistema de descongelación en seco. Al igual que por hemocitómetro, se obtuvieron resultados superiores al 90% en todas las pruebas, excluyendo la experimental 2, como se mencionó anteriormente,

**Figura 40**

*Porcentaje viabilidad celular post-descongelamiento usando el sistema de inducción y analizado por medio de citometría de flujo*

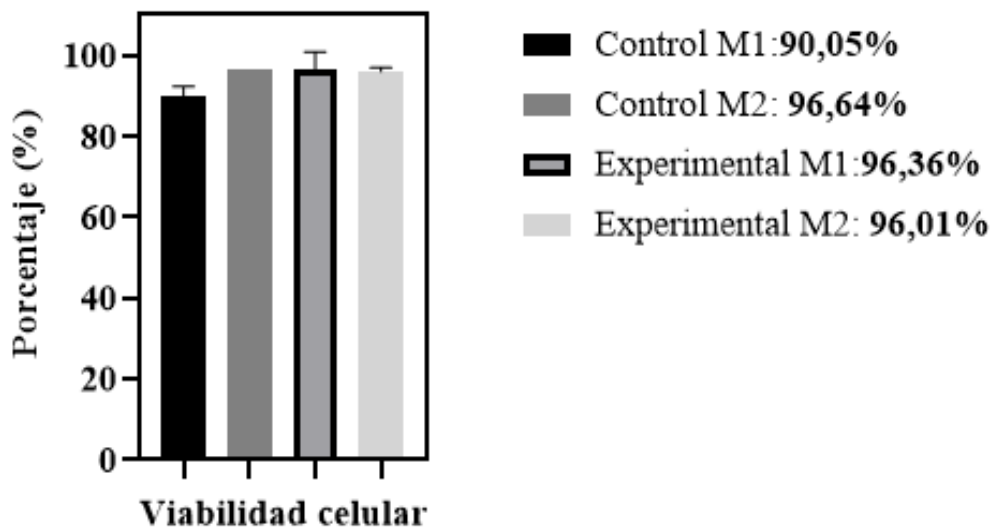


*Nota.* Expe. 1, 2, y 3 pertenecen a las pruebas experimentales realizadas de la muestra M1 y Expe. 4, 5 y 6 pertenecen a las pruebas experimentales realizadas de la muestra M2.

Partiendo de los resultados obtenidos por citometría de flujo, en la figura 41, se comparó la media  $\pm$  desviación estándar de la viabilidad celular obtenida bajo el método de baño serológico y el sistema de inducción. Se observó una leve mejoría en el porcentaje de viabilidad de las pruebas realizadas con la muestra M1, ya que, el porcentaje de viabilidad fue mejor cuando se utilizó el sistema de inducción que cuando se descongeló con el baño serológico. Para la muestra M2, al solo tener una muestra de control, no se pudo determinar la media  $\pm$  desviación estándar, sin embargo, los porcentajes de viabilidad por ambos métodos fueron similares.

#### **Figura 41**

*Viabilidad celular de las pruebas de control y experimentales por citometría de flujo*



Finalmente, por medio del análisis de varianza (ANOVA) de una vía, comparando los porcentajes de viabilidad celular por los dos métodos de descongelación planteados, es posible afirmar que, la descongelación de CMSP por medio de baño serológico y por medio del sistema de

inducción, no representaron diferencias significativas ( $p=0,0831$ ) en ninguna de las dos muestras evaluadas (M1 y M2), confirmando, además, los resultados estadísticos obtenidos por medio del hemocitómetro.

### **Análisis de Resultados**

La descongelación de células criopreservadas mediante procesos de calentamiento en seco, representan un aporte significativo en el área de la medicina regenerativa, y en los cultivos celulares, dado que se puede brindar un proceso de descongelamiento reproducible, automatizado y rápido.

Durante el desarrollo de este proyecto, en cuanto a la realización del diseño del prototipo, se buscó tener un sistema más compacto en comparación con los baños serológicos. Por otra parte, se comparó nuestro diseño del sistema de inducción con otros sistemas desarrollados; En 1990, Ruggera, trabajaron utilizando bobinas helicoidales resonantes (Ruggera et al, 1990), sin embargo, estos autores no tuvieron en consideración un sistema adiabático para la ubicación de la bobina. En nuestro diseño, se buscó que, en lo posible, no se presentarán alteraciones en la temperatura ambiente en el interior de la pieza a causa de factores externos, es por esto que se diseñó un sistema adiabático utilizando EPS.

En nuestro sistema, se realizó la descongelación de CMSP a una temperatura de setpoint de  $120^{\circ}\text{C}$ , esta temperatura hace referencia al ambiente en el interior de la pieza metálica (figura 7), sin embargo, el criovial descongelado, no alcanzó esta temperatura, ya que, al estar a  $-196^{\circ}\text{C}$  el vial, entró en equilibrio térmico con la temperatura del sistema, y es por esto, que en los resultados obtenidos, se observó una disminución de la temperatura, de  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  durante la descongelación de los viales experimentales (ver figura 32). Dentro del sistema adiabático, se presentan los fenómenos de transferencia de calor tanto de conducción como de convección. De conducción, por el contacto

entre el vial y la pieza metálica, y de convección, ya que no fue un contacto completo entre las dos partes. Por otra parte, al ser el aire, el medio de transferencia en la convección y ser este, un mal conductor de calor, debido a su baja conductividad térmica, se produjeron pérdidas de calor, que fueron las que evitaron que el vial superará los  $5.3^{\circ}\text{C}$  durante la descongelación.

A partir de los resultados obtenidos, se evidenció que, debido a los fenómenos de transferencia de calor presentes en el sistema, la temperatura a la que se llevó a cabo el descongelamiento es inversamente proporcional al tiempo que tardó este. Se registró, que al tener un setpoint de  $37^{\circ}\text{C}$ , el sistema tardó aproximadamente entre 6 y 6.2 minutos, en realizar la descongelación, mientras que, al tener un setpoint de  $120^{\circ}\text{C}$ , el tiempo disminuyó notablemente a 2.5 - 2.7 minutos. Constatando estos resultados, Triana et al, en el 2013, utilizó un dispositivo de calentamiento en seco, y obtuvo como resultado un tiempo medio de descongelamiento de 10 minutos a una temperatura de  $23^{\circ}\text{C}$  (Triana et al, 2013).

Se tomó  $120^{\circ}\text{C}$  de setpoint como la máxima temperatura soportada por el sistema, ya que, al realizar pruebas a  $130^{\circ}\text{C}$ , la pieza metálica alcanzó temperaturas a más de  $200^{\circ}\text{C}$ , y al momento de terminar la criopreservación y observar el estado de descongelamiento, se evidenció un mal estado físico del vial, presentando partes derretidas en la base de este (ver anexo 47). Es por esto, que se delimitó nuestro sistema a una temperatura máxima de setpoint de  $120^{\circ}\text{C}$ .

Por otra parte, Baust reportó que para obtener una mayor viabilidad luego de descongelar las muestras, se requiere de una tasa de calentamiento de  $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$  a  $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (Baust et al, 2017), sin embargo, en 2021, realizados por Whaley D, evidenciaron que el calentamiento de células, con tasas entre  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y  $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , no presentaron afectaciones en la viabilidad post-descongelamiento(Whaley D, et al,2021). Para nuestro sistema, se estimó una tasa de calentamiento

de 78°C/min, y se obtuvo una viabilidad mayor al 90% en todas sus muestras, lo cual confirma que manteniendo una alta tasa de descongelación, se obtienen resultados óptimos.

En términos de evaluación de viabilidad, autores como Baust y Kilbride, recomiendan utilizar entre 2 o 3 métodos de evaluación, con el fin de comparar mejor los resultados y su potencial impacto (Baust et al, 2017 & Kilbride et al, 2020), es por esto, que, en este proyecto, se evaluó mediante el ensayo de exclusión de azul de tripano (hemocitómetro) y por medio de citometría de flujo. El porcentaje de viabilidad es importante tanto en la pre-criopreservación como en la descongelación, Snyder planteó que la viabilidad de la muestra antes de la congelación debe ser superior al 90% (Snyder et al, 2004). En los resultados obtenidos, se determinó un porcentaje de viabilidad de 97,88% en las células M1, y 98,33% para las células M2.

Por otra parte, se tienen los porcentajes de viabilidad correspondientes a la evaluación post-descongelación, en cada uno de los dos métodos, en donde el menor porcentaje de viabilidad registrado, utilizando el hemocitómetro, para ambas muestras M1 y M2 fue de 94,12%, mientras que el menor porcentaje de viabilidad por citometría de flujo fue de 93,17%. Esto evidenció un correcto desempeño del sistema de inducción, sin embargo, no se obtuvo diferencias significativas a comparación con el baño serológico; al igual que Kilbride, quien realizó la descongelación de muestras, mediante baño serológico y un sistema libre de agua, y concluyó de igual manera que, bajo ambos métodos, se obtuvo una alta viabilidad (Kilbride et al, 2020).

## **Capítulo 6. Conclusiones y recomendaciones**

En el presente estudio, se realizó la descongelación de CMSP mediante inducción electromagnética, teniendo una temperatura ambiente (setpoint) de 120°C, ya que esto permitió la descongelación de las muestras, en el menor tiempo posible, sin llegar a afectar el sistema, ni el estado del criovial. Los resultados obtenidos permiten concluir que es un método totalmente válido y

aceptable, dado que la viabilidad obtenida es igual o superior en comparación con el método tradicional por baño serológico. Además, tal como se mencionó a lo largo del proyecto, es de vital importancia, manejar cuidadosos protocolos, tanto para el congelamiento de las células como en su descongelación y su manipulación post-descongelamiento, ya que como se evidenció en una de las pruebas, debido a un mal manejo en el lavado post-descongelamiento, se presentó una disminución de la viabilidad del 40%. Por otra parte, el uso de un sistema de inducción permite, además, obtener una ventaja con respecto al método convencional, en términos de la no contaminación de la muestra durante la descongelación, puesto que se considera como un método más aséptico, en vista de que el vial no está en constante interacción con el operador, lo cual ayuda a mantener un mayor ambiente estéril y porcentajes de viabilidad altos. Asimismo, se permite tener una trazabilidad del comportamiento de la temperatura de descongelación, para posteriores estudios o análisis.

Sin embargo, este es un sistema que puede estar sujeto a diversos cambios desde la construcción del mismo; desde el diseño electrónico del circuito, la bobina empleada, el tipo de sensor utilizado, hasta el método de control utilizado, varían inmediatamente el comportamiento del sistema.

Finalmente, para obtener datos estadísticos más precisos se recomienda ampliar el número de muestras evaluadas en la descongelación dado que en el presente estudio, por aspectos de costos - beneficio, se delimitaron a 10 pruebas con CMSP de dos diferentes muestras de sangre.

## Referencias

- Acevedo Picon, A. (2007). Metodología Para La Construcción De Un Horno De Inducción Electromagnética. 1-75.
- Acevedo Picon, A., Barrero Perez, J., & Gelvez Figueredo, J. (2007). Calentamiento por inducción electromagnética: diseño y construcción de un prototipo. *Revista UIS Ingenierías*, 6(1), 69-76.
- Alpi, L. (2019). Control PID: rompiendo la barrera del tiempo. *NOVUS*.
- Ambrell Induction Heating, S. (2018). Acerca de Inducción Calentamiento.
- A. M. Vorotilin, A. V. Zinchenko, and V. A. Moiseyev, “Cell injury at the stage of thawing,” *Cryo-Lett.*, vol. 12, pp. 77–86, 1991
- Arduino. (2015). Arduino Mega 2560 Rev3. In.
- Baust, J. M., Campbell, L. H., & Harbell, J. W. (2017). Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 53(10), 855-871. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0201-y>
- Bazanella, A. S.; Silva Júnior, J. M. G. Da. “Sistemas de Controle”: princípios e métodos de projeto. 1.ed. Editora UFRGS, 2005
- Bengochea, G. R., & Della Torre, H. (2000). *Una Paradoja a Bajas Temperaturas-Efecto Leidenfrost*.

- Boström, F., Ekemar, L., Olsson, D., Egberg, N., & Lundahl. (2009). Rapid thawing of fresh-frozen plasma with radio wave-based thawing technology and effects on coagulation factors during prolonged storage at 4 °C. *Vox Sanguinis*, 97, 34-38. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.001175.x>
- Cabrera, P., & Fernández, A. (2006). Criopreservación de Embriones: una herramienta básica en la Reproducción Asistida. *Facultad de Ciencias Veterinarias*, 47(2), 59-70.
- Canales, M. A., Arrieta, R., & Navarro, F. H. (1999). Criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas. *Sangre*, 44(6), 473-481.
- Carrillo, M. (2021). Introducción de Arduino. 9(4), 4-8.
- Celeste, R., Banchio, C., & Montaner, A. (2017). "Criopreservación de células madre neurales embrionarias (CMNEs) mediante la metodología de enfriamiento lento". 72-72.
- Conesa, J. A. (2013). Mecanismos de transmisión de calor. 1-23.
- Corace, J. J. (2009). Mecanismos De Transferencia Del Calor. 1-30.
- Cáceres, J. (1998). ALFA Y OMEGA DE LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS. 1(1), 6-6.
- Dagur, P. K., & McCoy, J. P. (2015). Collection, storage, and preparation of human blood cells. *Current Protocols in Cytometry*, 2015(July), 5.1.1-5.1.16. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0501s73>



Fabián, C., Guerrero, B., & Ramos, G. (2017). Diseño E Implementación De Un Calentador Por Inducción Electromagnética Para El Montaje De Rodamientos. *I*, 1-38.

Fernandez, A., Gonzalvo, M., Clavero, A., Ruiz, R., Zamora, S., Roldan, M., . . . Castilla, J. (2009). Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *Asebir*, *14*(1), 19-27.

Fuss, I. J., Kanof, M. E., Smith, P. D., & Zola, H. (2009). Isolation of whole mononuclear Cells from peripheral blood and cord blood. *Current Protocols in Immunology*(SUPPL. 85), 1-8. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0701s85>

G. H. Atmospheres (2020). Induction Heating: What It Is, How it Works. In.

González Muñoz, M. A. (2012). Diseño y construcción de un instrumento prototipo para la medición de campo magnético homogéneo sinusoidal en baja frecuencia. *Revista Tecnura*, *15*(30), 111-111. <https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.tecnura.2011.2.a11>

GoodRx. (2021). Meet The Tool Helping Millions Of Americans Save On Prescriptions. In.

Gurina, T. M., Pakhomov, A. V., Polyakova, A. L., Legach, E. I., & Bozhok, G. A. (2016). The development of the cell cryopreservation protocol with controlled rate thawing. *Cell and Tissue Banking*, *17*(2), 303-316. <https://doi.org/10.1007/s10561-015-9533-6>

Hunt, C. J. (2019). Technical Considerations in the Freezing, Low-Temperature Storage and Thawing of Stem Cells for Cellular Therapies. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, *46*(3), 134-149. <https://doi.org/10.1159/000497289>

Industrias, G. S. L. (2021). Sensor infrarrojo. In.

- Irdani, T., Mazzanti, B., Ballerini, L., Saccardi, R., & Torre, R. (2019). A non-traditional approach to cryopreservation by ultra-rapid cooling for human mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*, *14*(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0220055>
- Jin, B., Kleinhans, F. W., & Mazur, P. (2014). Survivals of mouse oocytes approach 100% after vitrification in 3-fold diluted media and ultra-rapid warming by an IR laser pulse. *Cryobiology*, *68*(3), 419-430. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.03.005>
- Kapter. (2019). ¿Qué es la emisividad? In.
- Katayama, Y., Yano, T., Bessho, A., Deguchi, S., Sunami, K., Mahmut, N., . . . Harada, M. (1997). *The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells* (02683369/97). (Bone Marrow Transplantation, Issue.
- Ketterer, F. D., Holst, H. I., & Lehr, H. B. (1971). *Improved viability of kidneys with microwave thawing*.
- Kilbride, P., Meneghel, J., Creasey, G., Masoudzadeh, F., Drew, T., Creasey, H., . . . Jestice, K. (2020). Automated dry thawing of cryopreserved haematopoietic cells is not adversely influenced by cryostorage time, patient age or gender. In *PLoS ONE* (Vol. 15).
- Lecchi, L., Giovanelli, S., Gagliardi, B., Pezzali, I., Ratti, I., & Marconi, M. (2016). An update on methods for cryopreservation and thawing of hemopoietic stem cells. In *Transfusion and Apheresis Science* (Vol. 54, pp. 324-336): Elsevier Ltd.
- López Álvarez, E. M. (2019). Métodos Para Determinar La Viabilidad Celular Con Aplicación En Odontología. 1-23.

Mayani, H., Flores-Figueroa, E., Pelayo, R., Montesinos, J. J., Flores-Gusmán, P., & Chávez-González, A. (2007). Hematopoiesis. *Hematopoyesis*, 2, 95-107.

Mazur, P. (2018). *Freezing of living cells: mechanisms and implications*. <http://www.physiology.org/journal/ajpcell>

Meneghel, J., Kilbride, P., & Morris, G. J. (2020). Cryopreservation as a Key Element in the Successful Delivery of Cell-Based Therapies—A Review. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 7): Frontiers Media S.A.

Mera, C., Roa, L., & Ramírez, S. (2007). Hematopoietic stem cells, generalities and pathways involved in their self-renewal mechanisms. *Health Sciences Magazine*, 5(1), 67-89.

Miyazaki, T., & Suemori, H. (2016). Slow cooling cryopreservation optimized to human pluripotent stem cells. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 951, pp. 57-65). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3_5)

Nazarat, H. S. M., Kobayashi, Y., & Ma, Z. (2010). Frequency dependence measurements of complex permittivity of dielectric plates using TE<sub>0m1</sub> Modes in a Circular Cavity. *IEICE Transactions on Electronics*, E93-C(7), 1126-1131. <https://doi.org/10.1587/transele.E93.C.1126>

Pan, J., Shu, Z., Ren, S., & Gao, D. (2017). Determination of Dielectric Properties of Cryoprotective Agent Solutions with a Resonant Cavity for the Electromagnetic Rewarming in Cryopreservation. *Biopreservation and Biobanking*, 15(5), 404-409. <https://doi.org/10.1089/bio.2016.0096>

- Patterson, G., & Sobral, M. (2007). Efecto Peltier. *Universidad de Buenos Aires*(2), 4-4.
- Preininger, M. K., Singh, M., & Xu, C. (2016). Cryopreservation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Strategies, challenges, and future directions. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 951, 123-135. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3_10)
- Pérez, J., & Almaguer, D. (2015). *Célula madre hematopoyética / Hematología* (4a Edición ed., Vol. 1).
- Ramos, T. V., Mathew, A. J., Thompson, M. L., & Ehrhardt, R. O. (2014). Standardized cryopreservation of human primary cells. *Current Protocols in Cell Biology*, 2014(September), A.3I.1-A.3I.8. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cba03is64>
- Rechner, S. (2020). El sensor de temperatura. In.
- Reyes, M., & Pinto, J. (2014). Corriente Parásitas y Fenómenos de Inducción relacionados. *II*(2), 68-74.
- Reyes Pérez, M. E., & Sosa Morales, M. E. (2013). Mecanismos de transferencia de calor que ocurren en tratamientos térmicos de alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 7(1), 37-47.
- Riedhammer, C., Halbritter, D., & Weissert, R. (2014). Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. *Methods in Molecular Biology*, 9-9. <https://doi.org/10.1007/7651>
- Rivera, N. (2015). ¿En qué consiste el efecto Joule? In.

Rivero, J. (2012). Generalidades de la criopreservación. *Modelado Matemático E Implementación Práctica De Sistema De Vitrificación Ultra-Rápida Mediante Radiación Láser*, 30-30.

Robinson, M. P., & Pegg, D. E. (1999). Rapid Electromagnetic Warming of Cells and Tissues. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 46(12), 1413-1425. <https://doi.org/10.1109/10.804569>

Ruggera, P. S., & Fahy, G. M. (1990). Rapid and uniform electromagnetic heating of aqueous cryoprotectant solutions from cryogenic temperatures. *Cryobiology*, 27(5), 465-478. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(90\)90035-3](https://doi.org/10.1016/0011-2240(90)90035-3)

Röllig, C., Babatz, J., Wagner, I., Maiwald, A., Schwarze, V., Ehninger, G., & Bornhäuser, M. (2002). *Thawing of cryopreserved mobilized peripheral blood-comparison between waterbath and dry warming device* (Cytotherapy, Issue.

Snyder, K., Van Buskirk, R., & Baust, J. G. (2004). Biological Packaging for the Global Cell and Tissue Therapy Markets. *BioProcessing*.

Stemcell, T. (2018). Cryopreservation Basics: Protocols and Best Practices for Freezing Cells. In.

Triana, E., Ortega, S., Azqueta, C., Pomares, H., Valdivia, E., Duarte, R., . . . Martín-Henao, G. A. (2013). Thawing of cryopreserved hematopoietic progenitor cells from apheresis with a new dry-warming device. *Transfusion*, 53(1), 85-90. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03669.x>

- Turchin, A. V., Dubov, M., & Williams, J. A. R. (2010). *In situ measurement and reconstruction in three dimensions of femtosecond inscription-induced complex permittivity modification in glass* (OPTICS LETTERS, Issue.
- Verdezoto, J. (2016). *Study of the Laws of Faraday, Lenz and Fleming Estudio de las Leyes de Faraday, Lenz y Fleming.*
- Villalba, J. M., Ferreira, L., Arribas, E., Nájera, A., & Beléndez, A. (2015). Estudio experimental de la inducción electromagnética entre dos bobinas: Dependencia con la corriente eléctrica. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 37(1). <https://doi.org/10.1590/S1806-11173711697>
- Wang, J., Zhao, G., Zhang, Z., Xu, X., & He, X. (2016). Magnetic induction heating of superparamagnetic nanoparticles during rewarming augments the recovery of hUCM-MSCs cryopreserved by vitrification. *Acta Biomaterialia*, 33, 264-274. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.01.026>
- Whaley, D., Damyar, K., Witek, R. P., Mendoza, A., Alexander, M., & Lakey, J. R. T. (2021). Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. In *Cell Transplantation* (Vol. 30): SAGE Publications Ltd.
- Yong, K. W., Choi, J. R., & Wan Safwani, W. K. Z. (2016). Biobanking of human mesenchymal stem cells: Future strategy to facilitate clinical applications. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 951, pp. 99-110). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3_8)

Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., . . . Gómez, C. (2006). Fundamentos de criopreservación TT - Basic points in cryopreservation. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291-300.

## Anexos

```

1 //Librería del sensor infrarrojo
2 #include <Adafruit_MLX90614.h>
3 Adafruit_MLX90614 termometroIR = Adafruit_MLX90614();
4 //Variables a usar
5 float Set_P = 105.5 ;           //Establecer temperatura de SETPOINT
6 float error_PID = 0;           //Variable para guardar el error parcial
7 float error_previo = 0;        //Variable para guardar el error anterior
8 double t_transcurrido, Time, t_previo; //Variables de tiempo a utilizar
9 float valor_PID = 0;           //Se inicia el valor de PID como cero
10 int PID_p = 0;   int PID_i = 0;   int PID_d = 0; //Variables a usar en la fórmula se inicializan en 0
11 int tiempo;                 //Variable para registrar el tiempo desde que inicia el programa
12 int led=3;                  //Se establece el pin digital 3 como la salida hacia el mosfet de control
13 //Constantes del control PID
14 ///////////////////////////////////////////////////////////////////
15 float kp = 320;   int ki = 0.501;   int kd = 5;
16 ///////////////////////////////////////////////////////////////////
17 void setup() {
18   Serial.begin(9600);           //Inicial el monitor serial
19   pinMode(led,OUTPUT);         //Se declara la variable led (pin 3) como una SALIDA
20   while (!Serial);             //Se envía un mensaje de iniciando conexión siempre y cuando el monitor serial se active
21   Serial.println("INICIALIZANDO CONEXIÓN");
22   if (!termometroIR.begin()) {
23     Serial.println("Error connecting to MLX sensor. Check wiring."); //En caso que Arduino no detecte el sensor, se envía un mensaje de alerta
24     while (1);
25   };

```

### Anexo 1. Parte 1 del código de control PID en Arduino.

```

26   Serial.print("Emisividad = "); Serial.println(termometroIR.readEmissivity()); // Se muestra la emisividad del sensor que se está usando
27   Serial.println("=====");
28   delay(1000);
29 }
30 void loop() {
31   float temperaturaAmbiente = termometroIR.readAmbientTempC(); //Se lee la T ambiente
32   float temperaturaObjeto = termometroIR.readObjectTempC(); //Se lee la T objeto
33   error_PID = (Set_P) - temperaturaAmbiente + 5; //Se calcula el error del PID
34   PID_p = 0.01*kp * error_PID; //Se calcula el valor del control proporcional
35   PID_i = 0.01*PID_i + (ki * error_PID); //Se calcula el valor del control integral
36   Time = millis(); // Tiempo actual en milisegundos
37   t_previo = Time; // El tiempo anterior es guarda antes de que se lea el tiempo actual
38   tiempo=Time/1000; // Se divide el tiempo actual en 1000 para registrarlo en segundos
39   t_transcurrido = (Time - t_previo)/1030; // Se halla el tiempo transcurrido
40   PID_d = 0.01*kd*((error_PID - error_previo)/t_transcurrido); //Se calcula el valor del control derivativo
41   valor_PID = PID_p + PID_i + PID_d; // El valor PID total es la suma de P+I+D
42   error_previo = error_PID; //RSe guarda el error previo como error PID para el siguiente bucle.
43   double a = valor_PID;
44   double b = (a*100)/255;
45   if(valor_PID < 0){ //Condicionales para establecer dos valores específicos de PID
46     a = 0;
47     b = 0; }
48   if(valor_PID > 255){
49     a = 255;
50     b = 100;}

```

### Anexo 2. Parte 2 del código de control PID en Arduino.

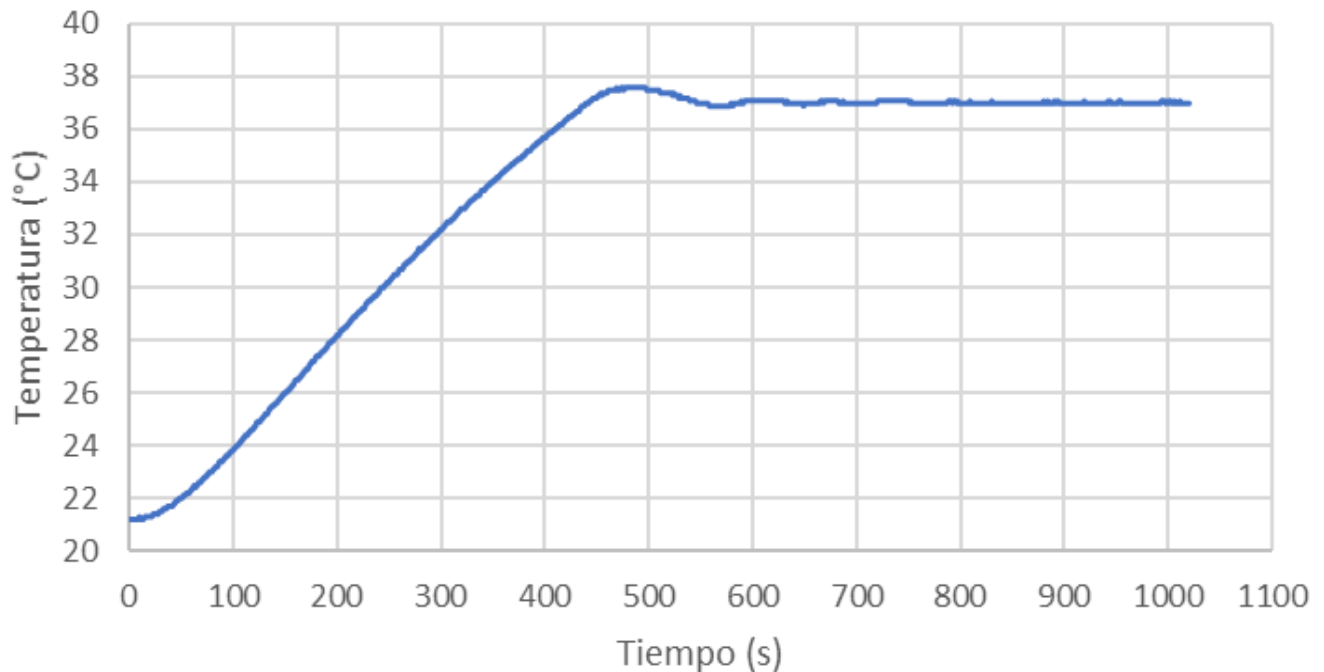


```

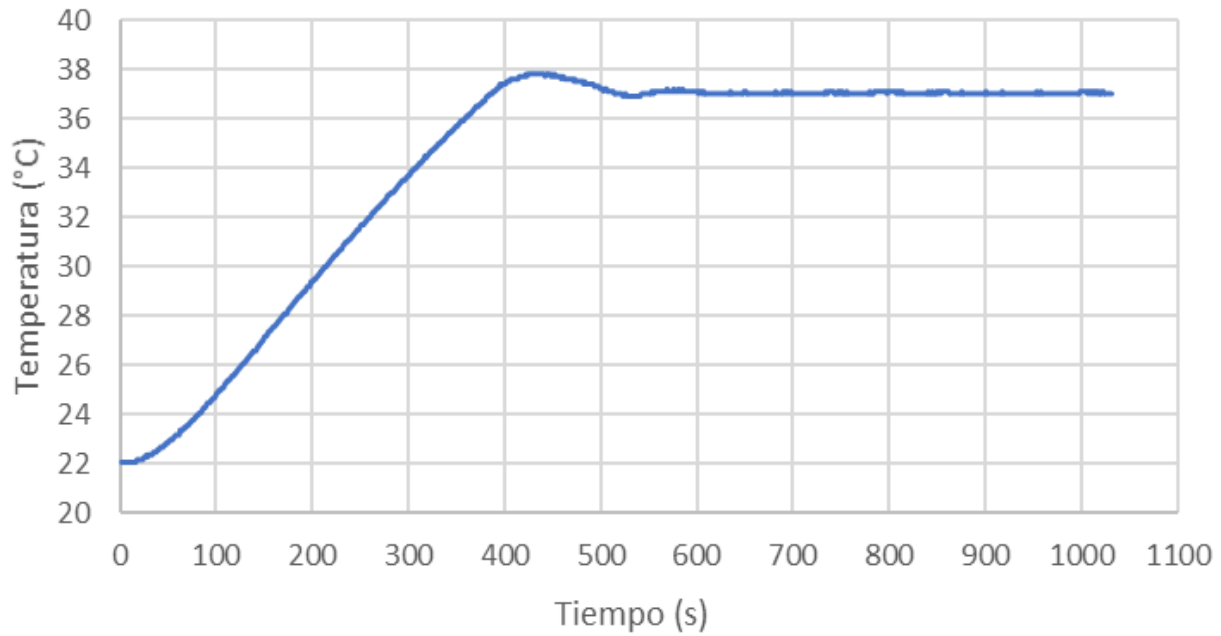
48 if(valor_PID > 255){
49   a = 255;
50   b = 100;}
51 analogWrite(led,a);      //Se envia la señal de a (valor PID) al pin 3 (led) con valores de PWM de 0 a 255
52
53 //Se imprimen cada segundo los valores de tiempo desde que se inicial el programa, setpoint, Tambiente, Tobjeto, valor de PWM y % de PWM
54 Serial.print("Tiempo(s)=> "); Serial.print(tiempo);
55 Serial.print(" Setpoint(°C)=> "); Serial.print(Set_P-5.5);
56 Serial.print(" Ambiente(°C)=> "); Serial.print(temperaturaAmbiente,1);
57 Serial.print(" Objeto(°C)=> ");Serial.print(temperaturaObjeto,1);
58 Serial.print(" Valor_PWM=> ");Serial.print(a);// salida pwm en porcentaje
59 Serial.print(" %PWM=> ");Serial.println( b,1);// salida pwm en porcentaje
60 delay(1020);
61 }

```

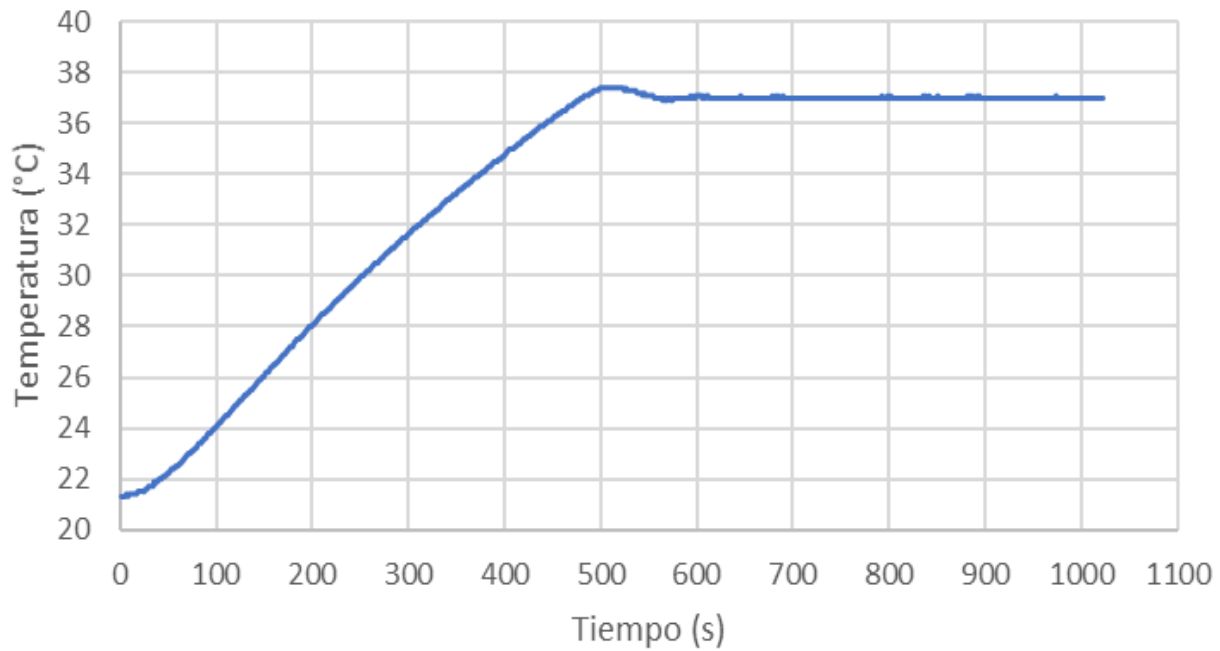
*Anexo 3. Parte 3 del código de control PID en Arduino.*



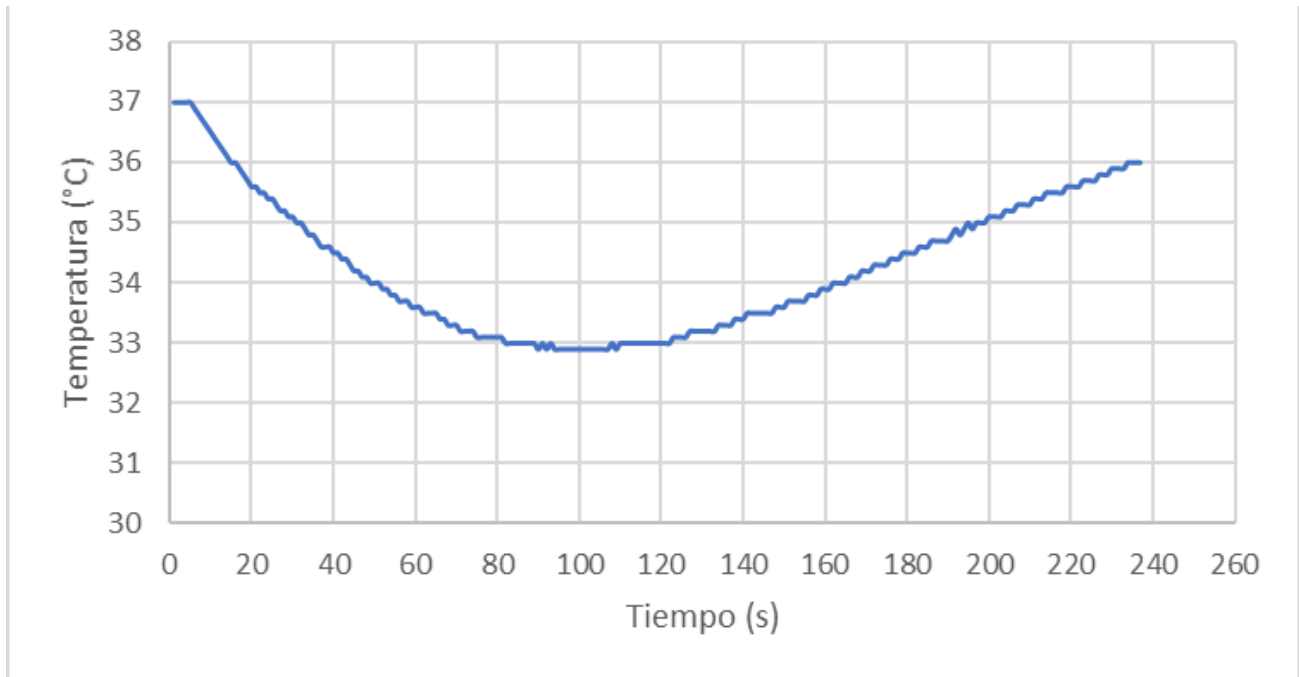
*Anexo 4. Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba 1 de estabilización con setpoint de 37°C.*



Anexo 5. Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba 2 de estabilización con setpoint de 37°C.



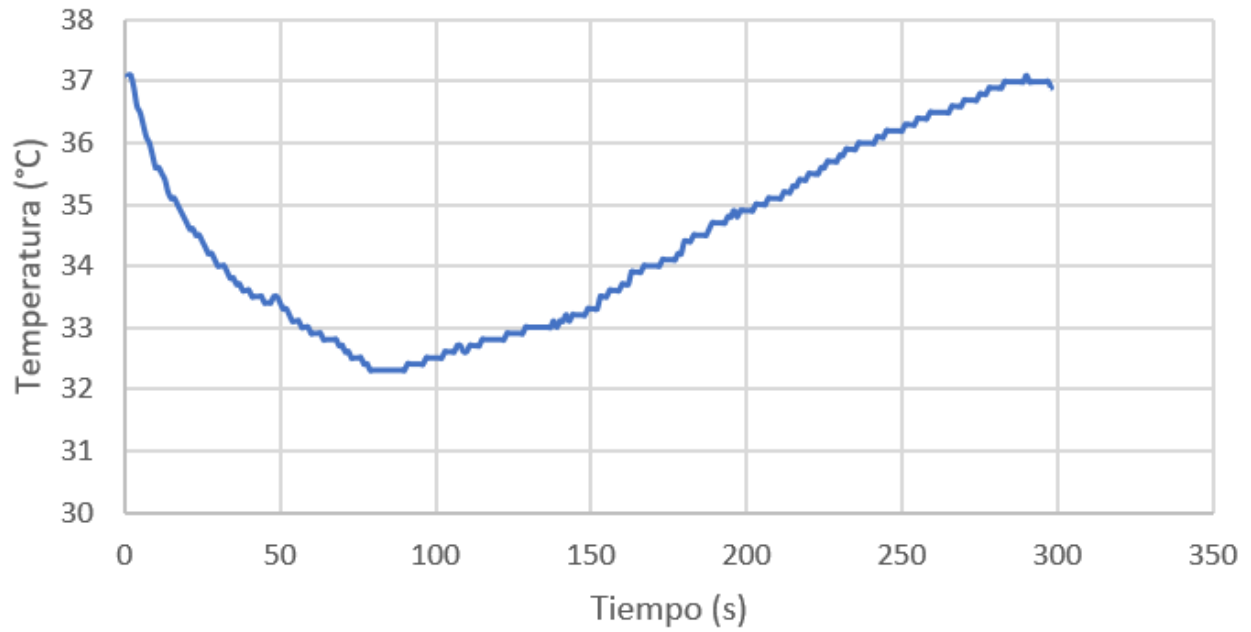
Anexo 6. Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba 3 de estabilización con setpoint de 37°C.



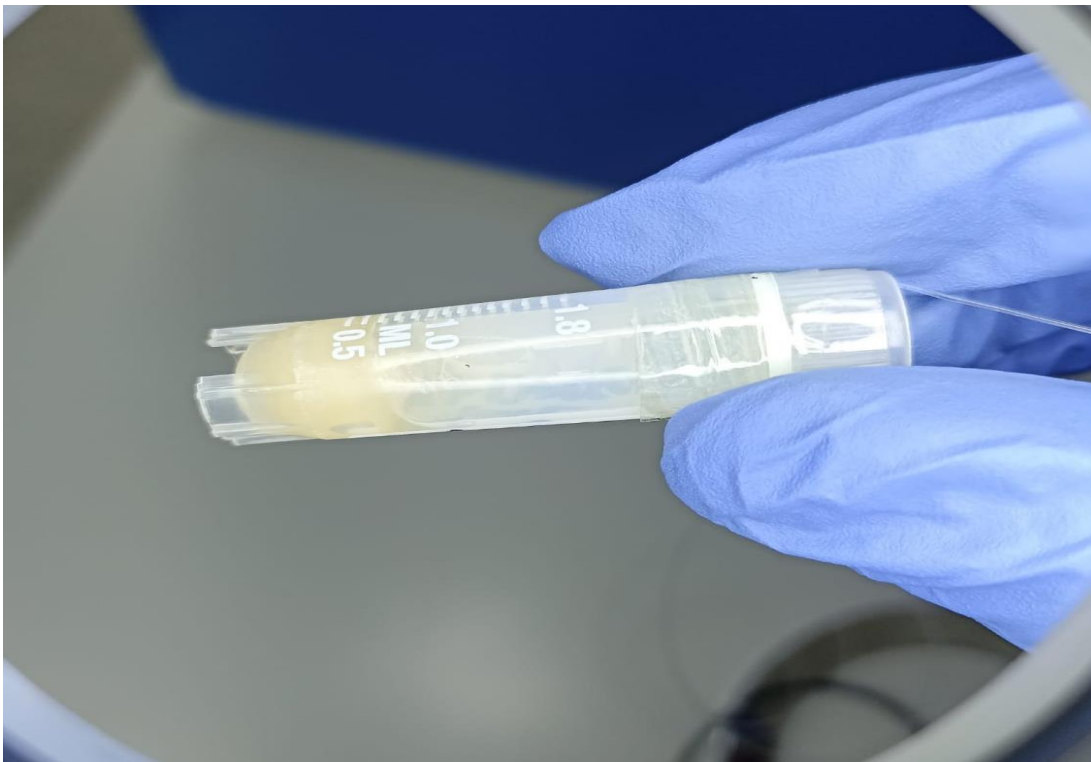
*Anexo 7.* Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba 1 de descongelación durante 4 minutos con setpoint de 37°C.



*Anexo 8.* Estado del vial con FBS + DMSO post-descongelación luego de prueba 1 durante 4 minutos con setpoint de 37°C.

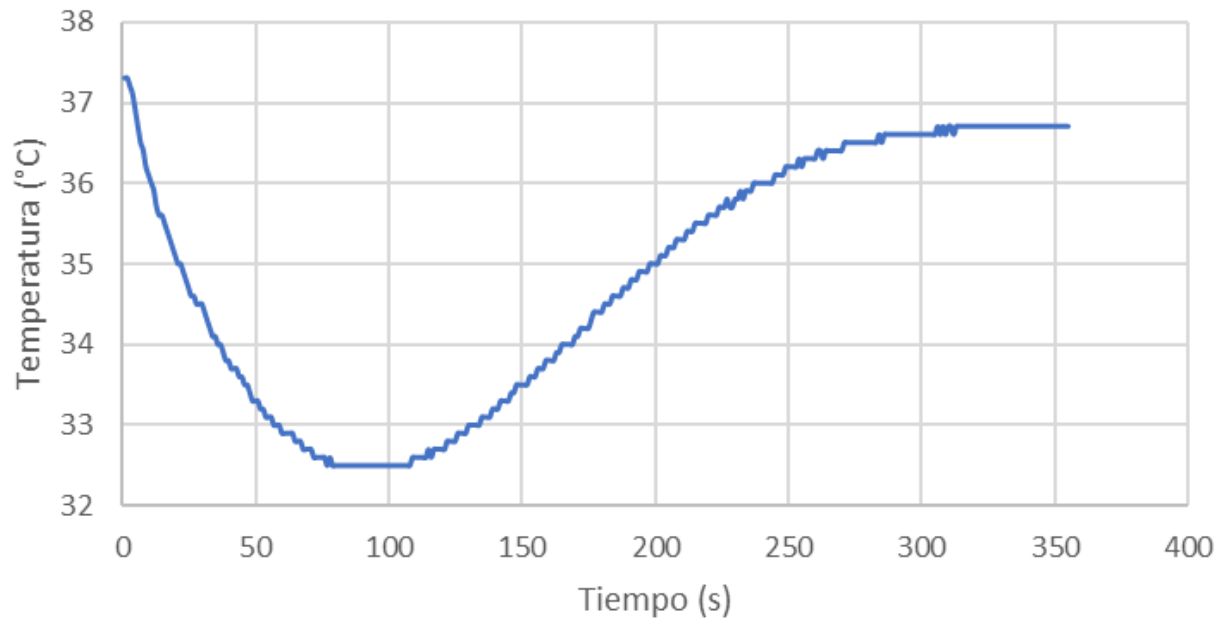


*Anexo 9.* Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba 1 de descongelación durante 5 minutos con setpoint de 37°C.

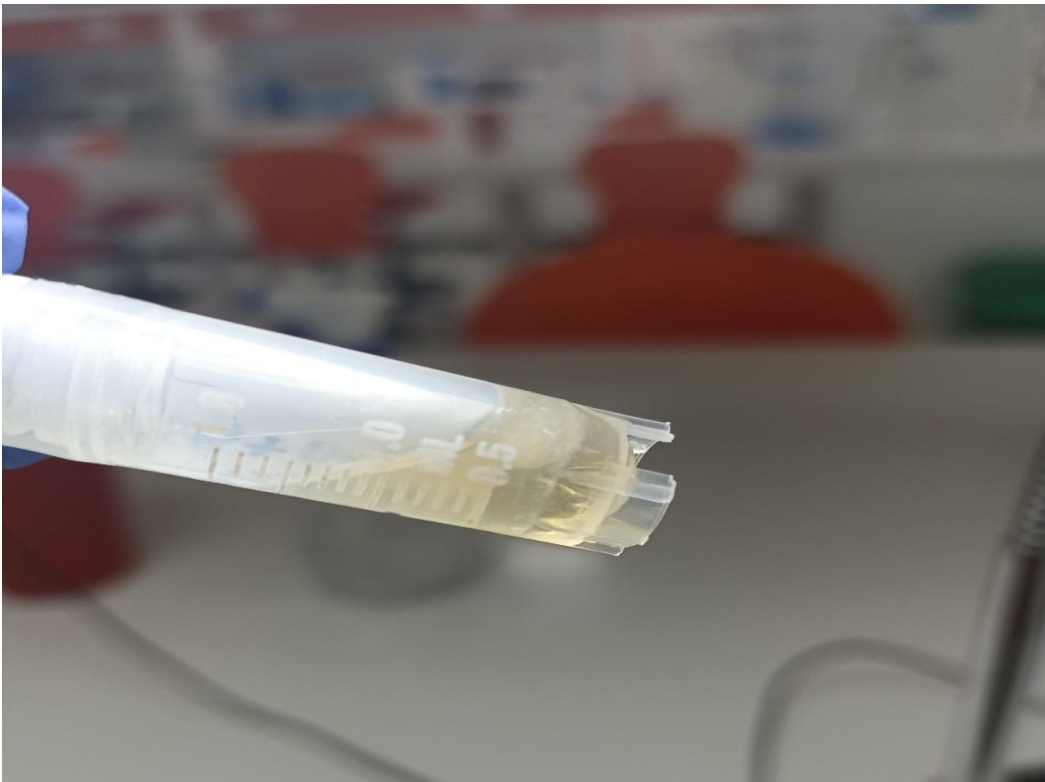


*Anexo 10.* Estado del vial con FBS + DMSO post-descongelación luego de prueba 1 durante 5

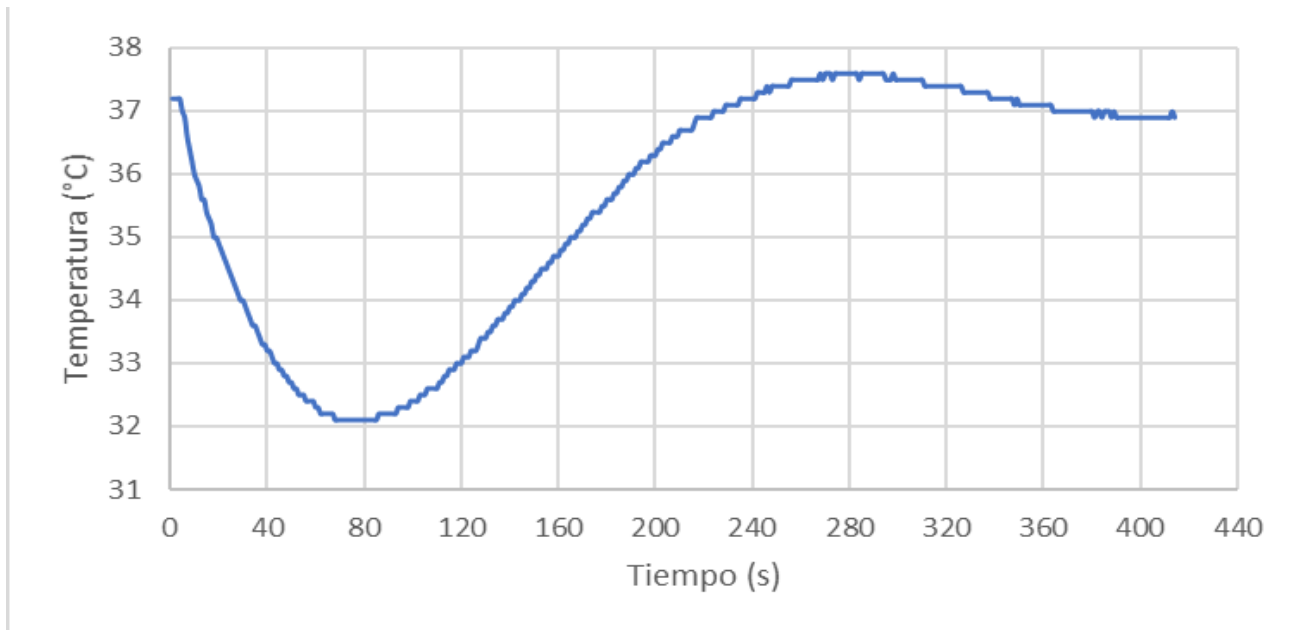
minutos con setpoint de 37°C.



*Anexo II.* Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba 1 de descongelamiento durante 6 minutos con setpoint de 37°C.



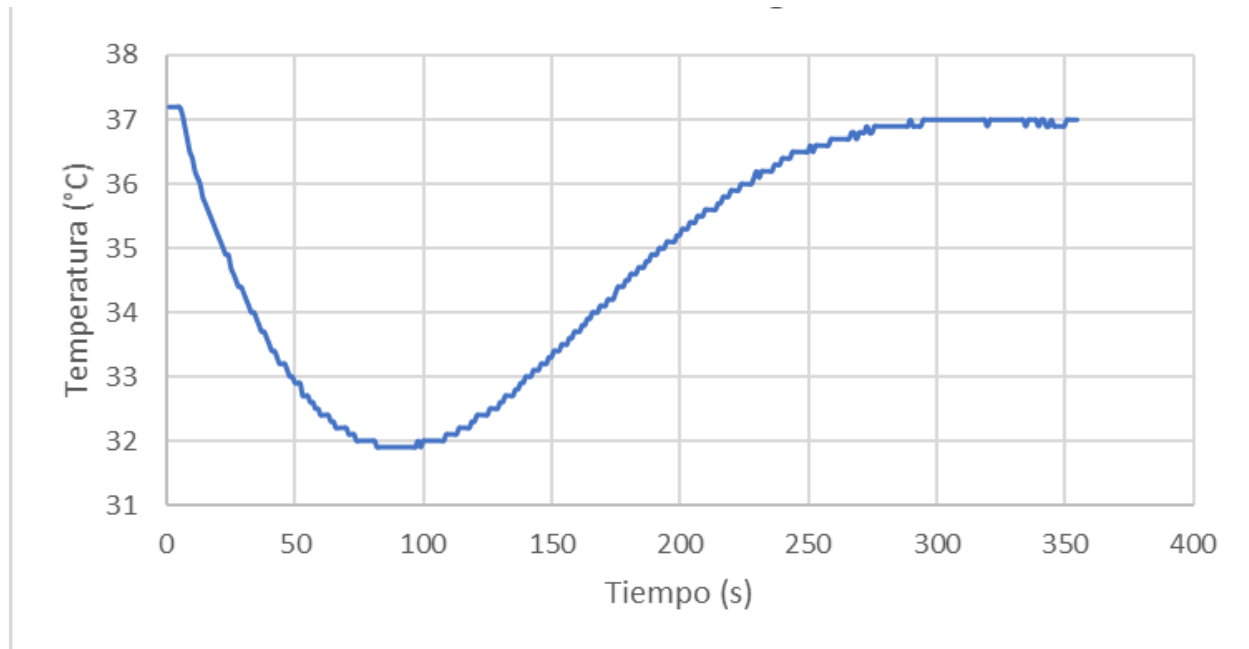
Anexo 12. Estado del vial con FBS + DMSO post-descongelación de prueba 1 durante 6 minutos con setpoint de 37°C.



Anexo 13. Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba 1 de descongelamiento durante 7 minutos con setpoint de 37°C.



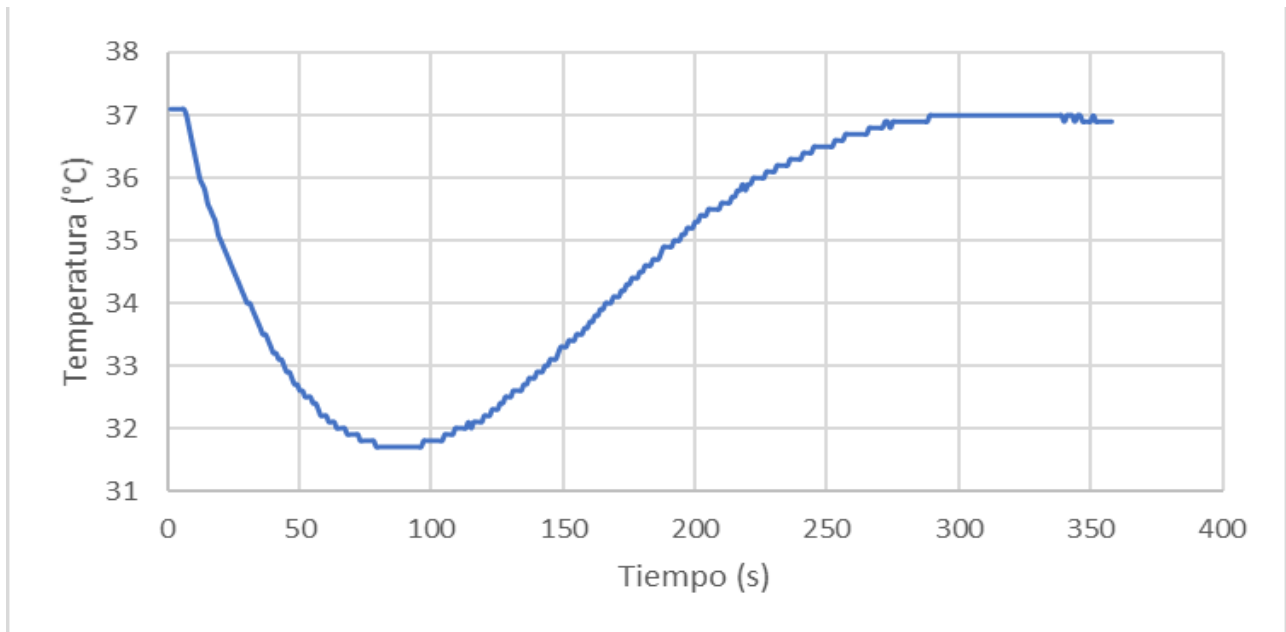
Anexo 14. Estado del vial con FBS + DMSO post-descongelación luego de prueba 1 durante 7 minutos con setpoint de 37°C.



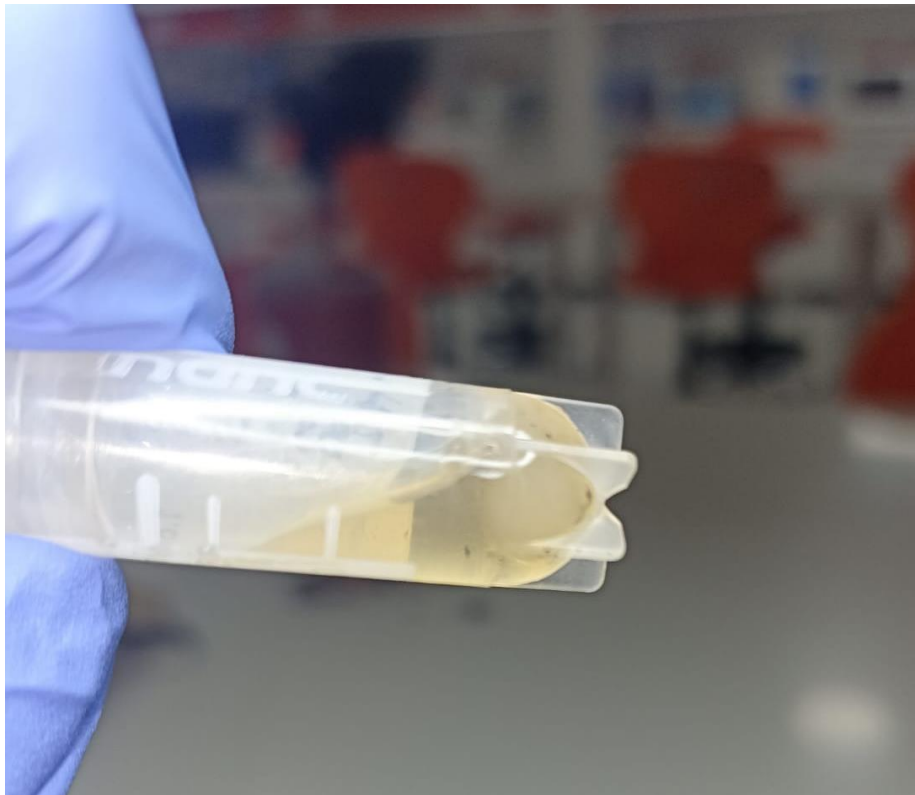
Anexo 15. Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba 2 de descongelamiento durante 6 minutos con setpoint de 37°C.



Anexo 16. Estado del vial con FBS + DMSO post-descongelación luego de prueba 2 durante 6 minutos con setpoint de 37°C.

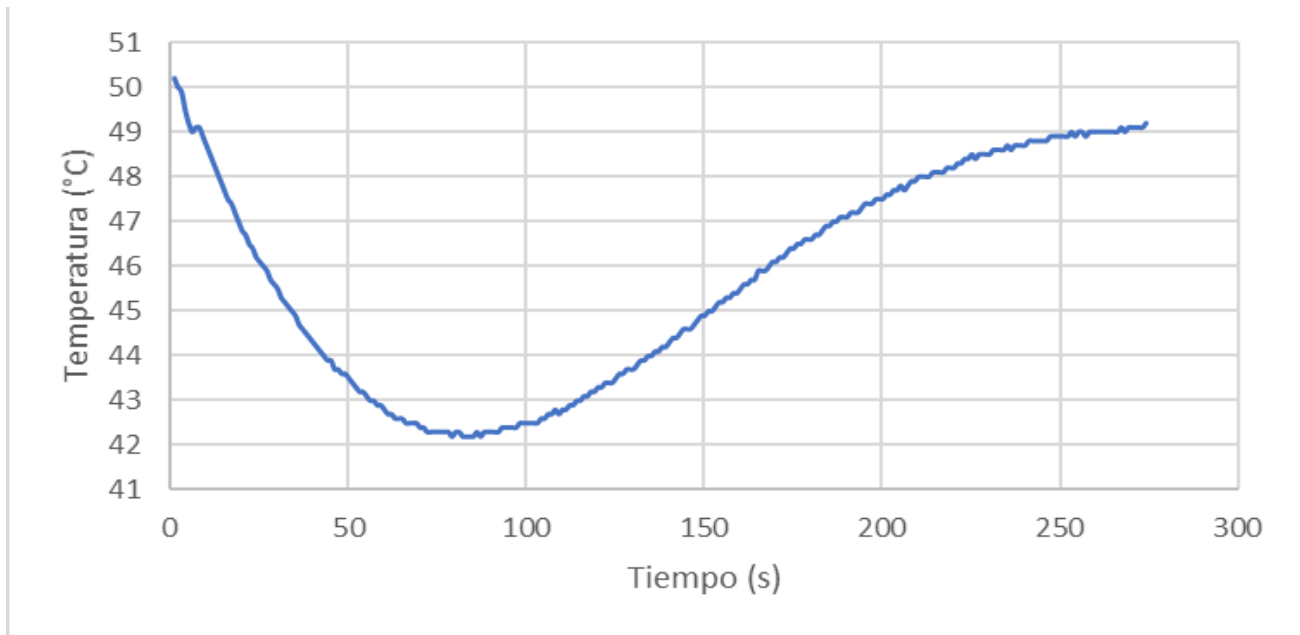


Anexo 17. Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba 3 de descongelación durante 6 minutos con setpoint de 37°C





*Anexo 18.* Estado del vial con FBS + DMSO post-descongelación luego de prueba 3 durante 6 minutos con setpoint de 37°C.



*Anexo 19.* Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba 1 de descongelación durante 4.5 minutos con setpoint de 50°C.



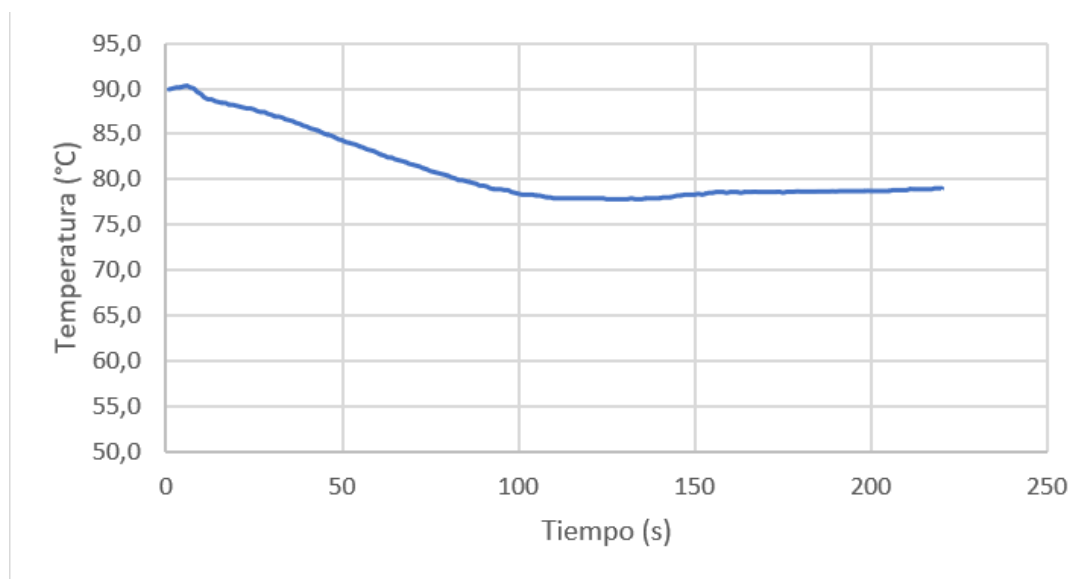
Anexo 20. Estado del vial con FBS + DMSO post-descongelación luego de prueba 1 durante 4.5 minutos con setpoint de 50°C.



Anexo 21. Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba 1 de descongelación durante 4 minutos con setpoint de 80°C.



*Anexo 22.* Estado del vial con FBS + DMSO post-descongelación luego de prueba 1 durante 4 minutos con setpoint de 80°C.

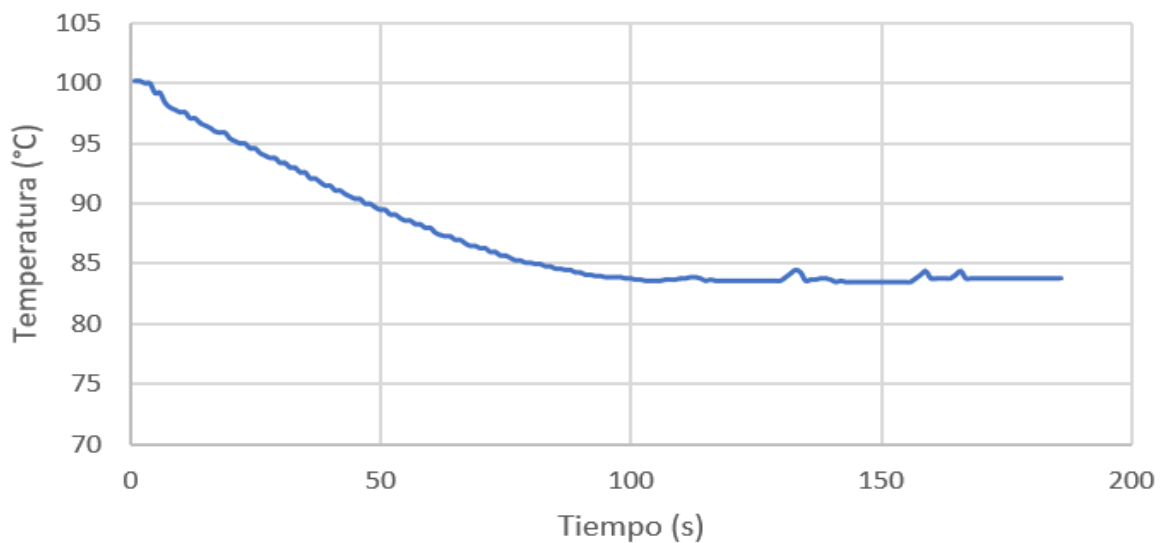


*Anexo 23* Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba 1 de descongelación durante 3.6 minutos con setpoint de 90°C.



*Anexo 24.* Estado del vial con FBS + DMSO post-descongelación luego de prueba 1 durante 3.6

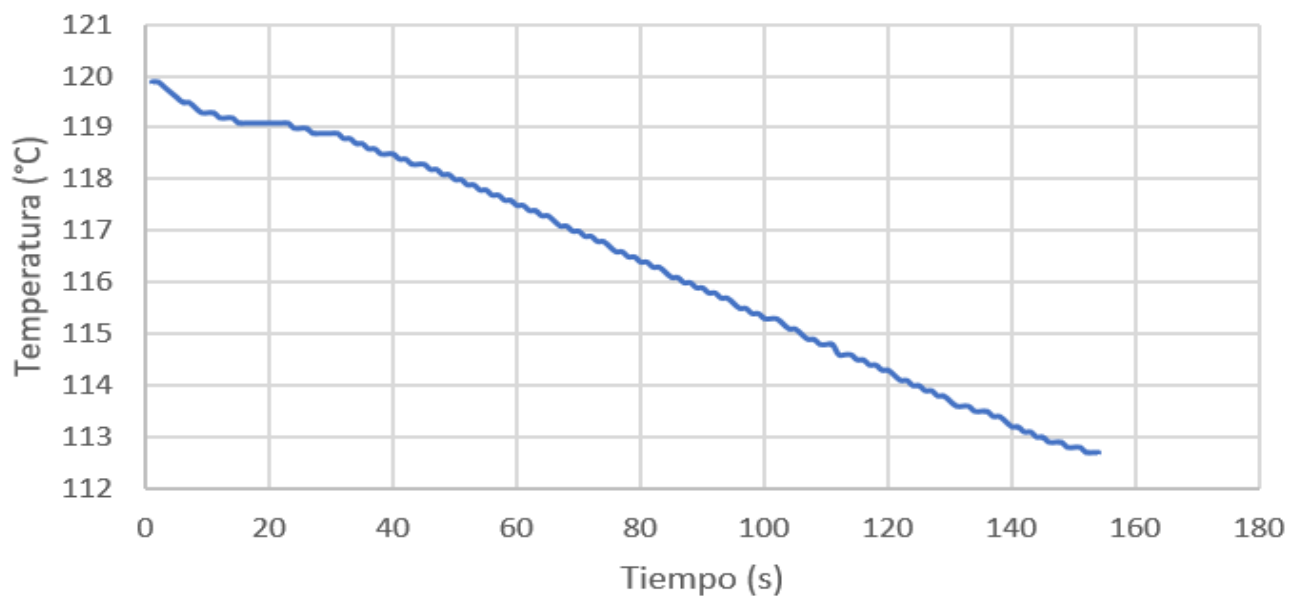
minutos con setpoint de 90°C.



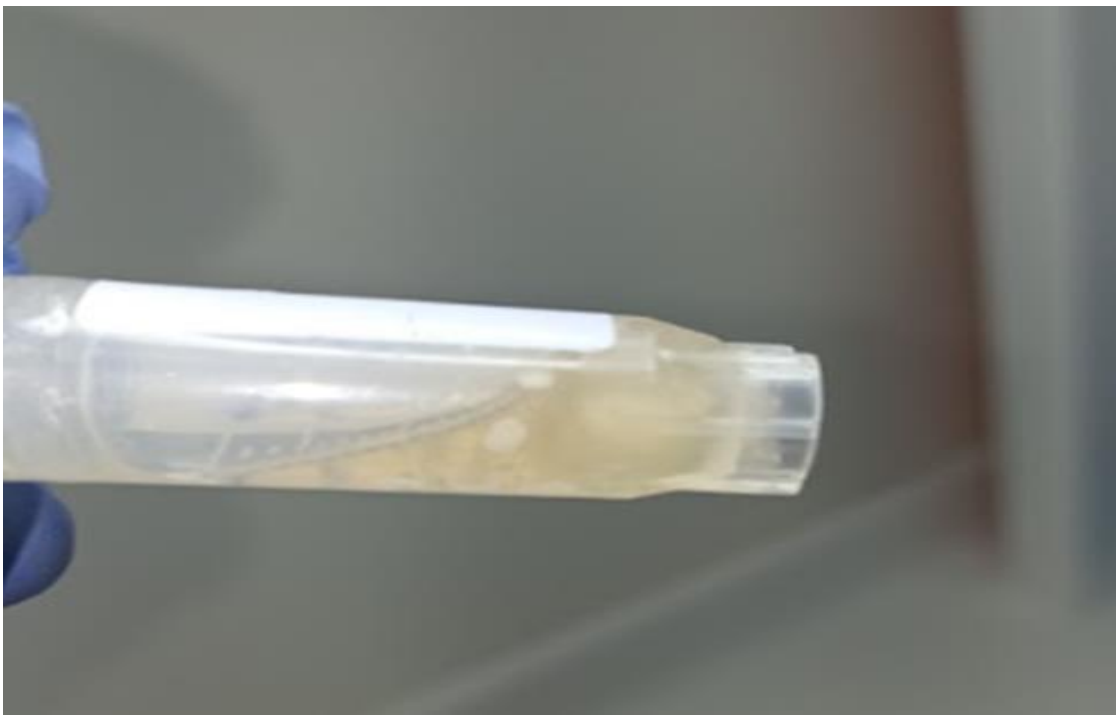
*Anexo 25.* Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba 1 de descongelación durante 3.1 minutos con setpoint de 100°C.



*Anexo 26.* Estado del vial con FBS + DMSO post-descongelación luego de prueba 1 durante 3.1 minutos con setpoint de 100°C.

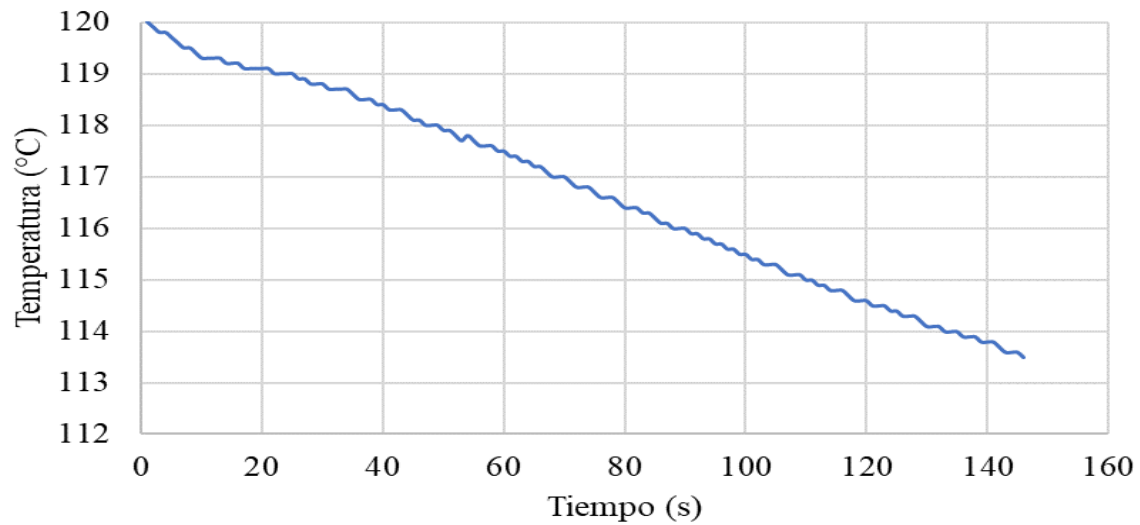


Anexo 27. Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba 1 de descongelación durante 2.5 minutos con setpoint de 120°C.



Anexo 28. Estado del vial con FBS + DMSO post-descongelación luego de prueba 1 durante 2.5

minutos con setpoint de 120°C.

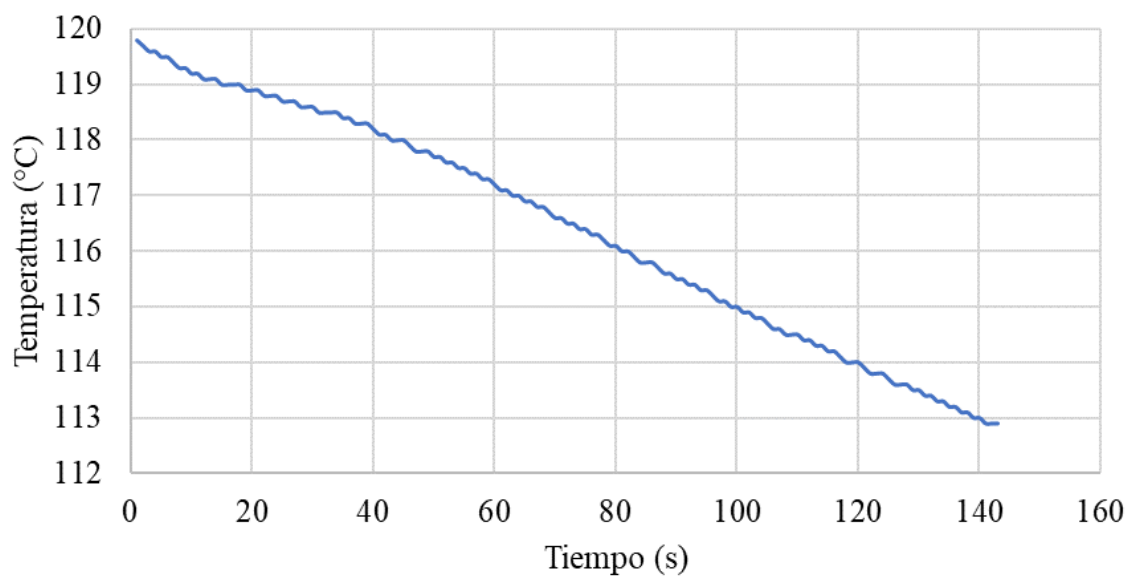


*Anexo 29.* Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba 2 descongelación durante 2.5 minutos con setpoint de 120°C.



*Anexo 30.* Estado del vial con FBS + DMSO post-descongelación luego de prueba 2 durante 2.5

minutos con setpoint de 120°C.

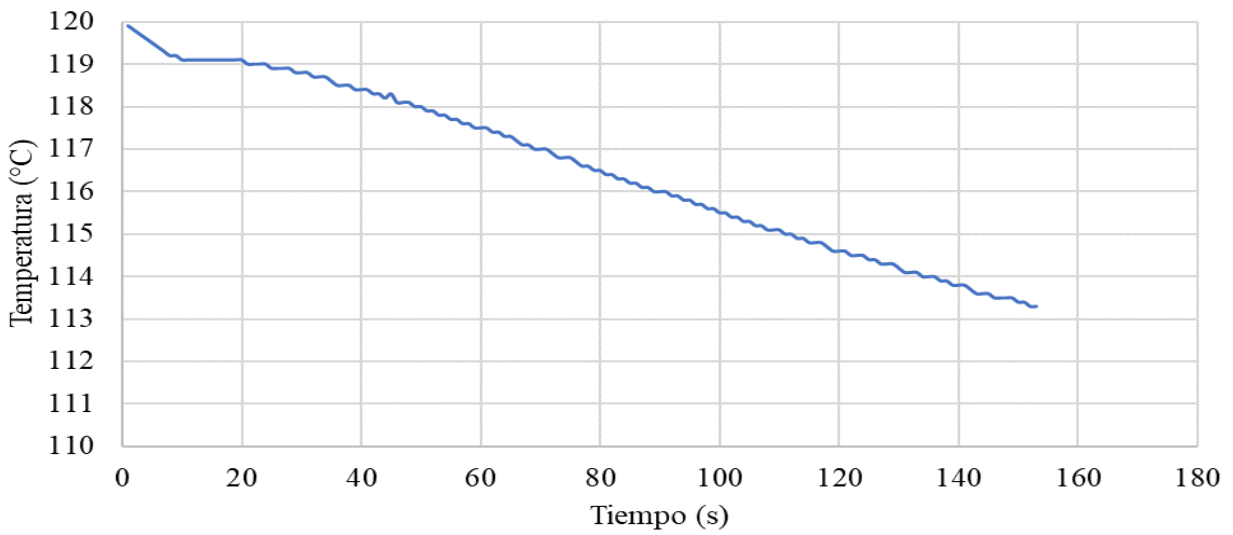


*Anexo 31.* Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba 3 de descongelamiento durante 2.5 minutos con setpoint de 120°C

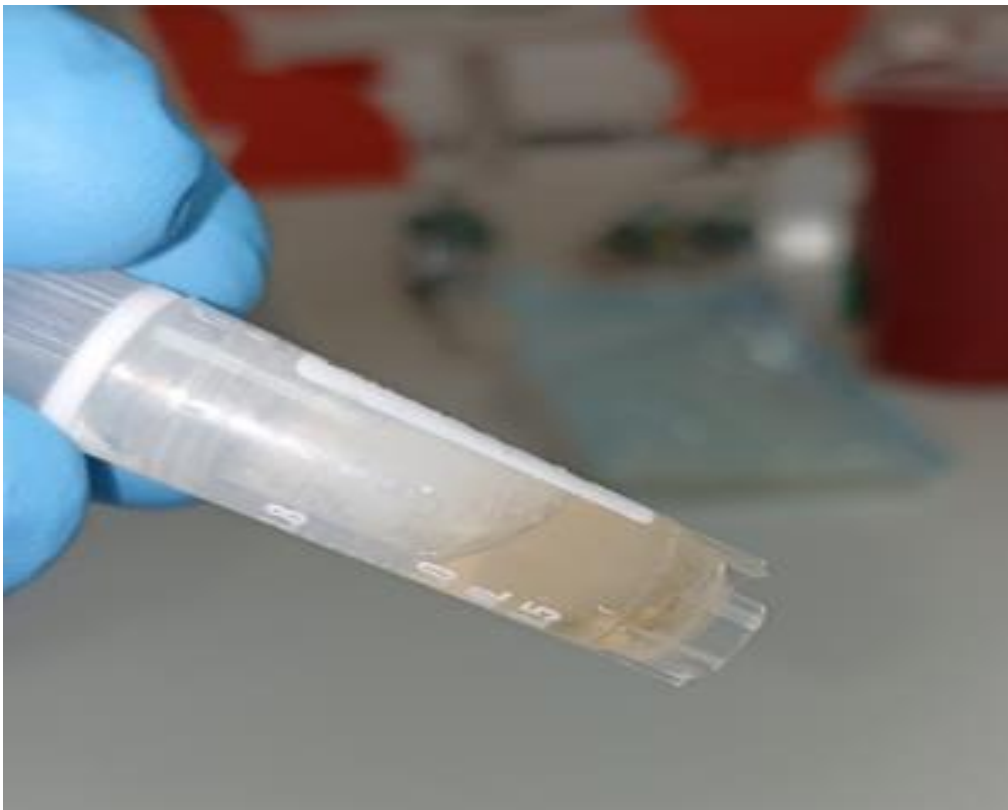


*Anexo 32* Estado del vial con FBS + DMSO post-descongelación luego de prueba 3 durante 2.5

minutos con setpoint de 120°C.

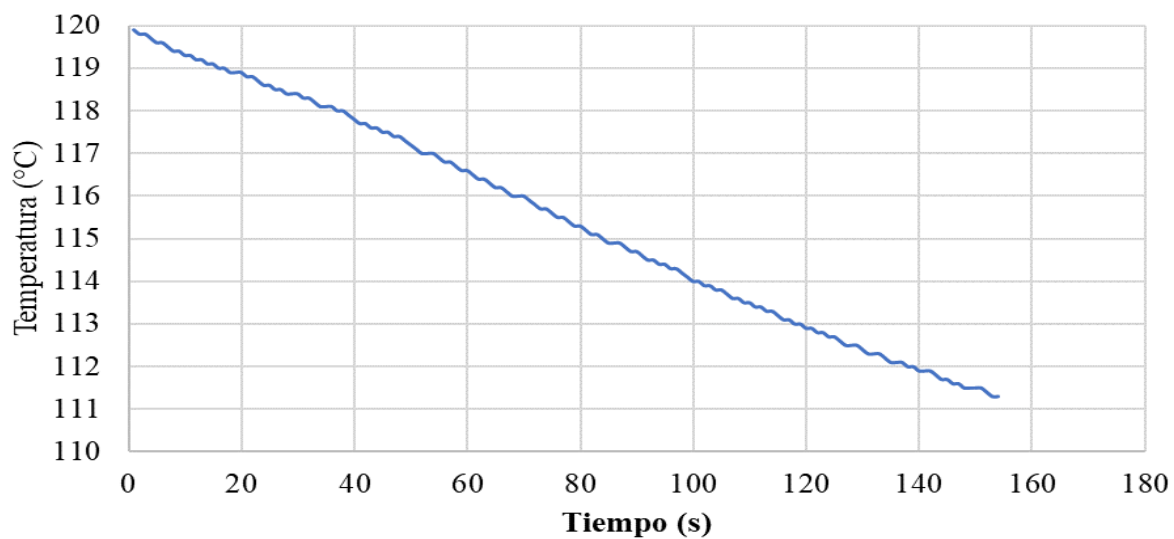


*Anexo 33.* Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba experimental 1 de descongelación con setpoint de 120°C por sistema de inducción.





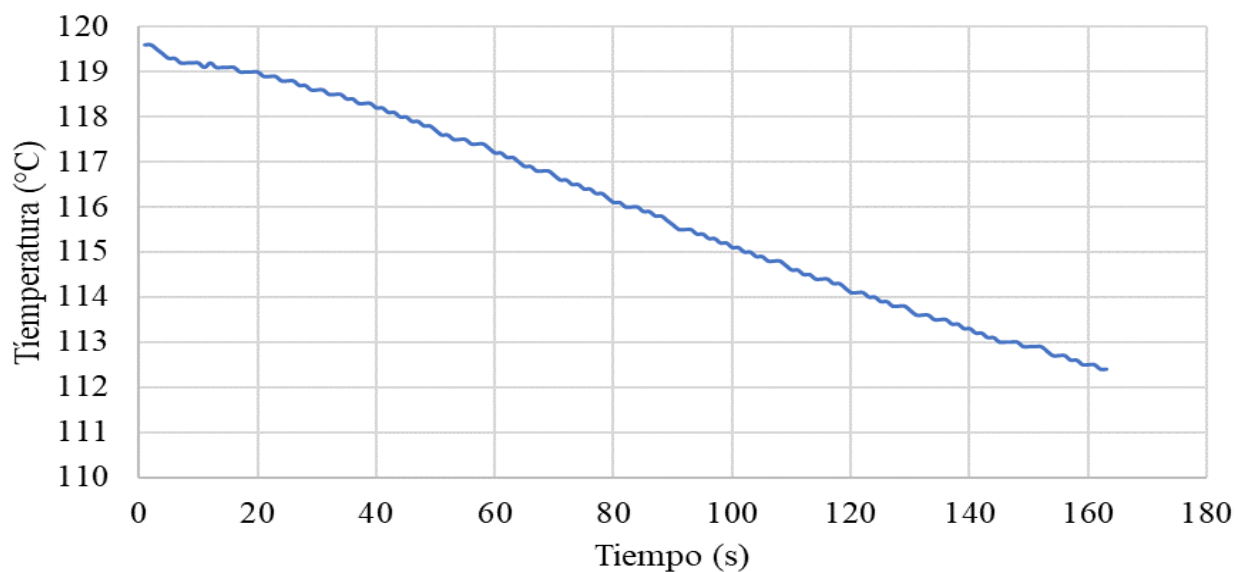
Anexo 34. Estado del vial de CMSP post-descongelación luego de la prueba experimental 1 con setpoint de 120°C.



Anexo 35. Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba experimental 2 de descongelación con setpoint de 120°C por sistema de inducción.



Anexo 36. Estado del vial de CMSPFBS post-descongelación luego de prueba experimental 2 con setpoint de 120°C.

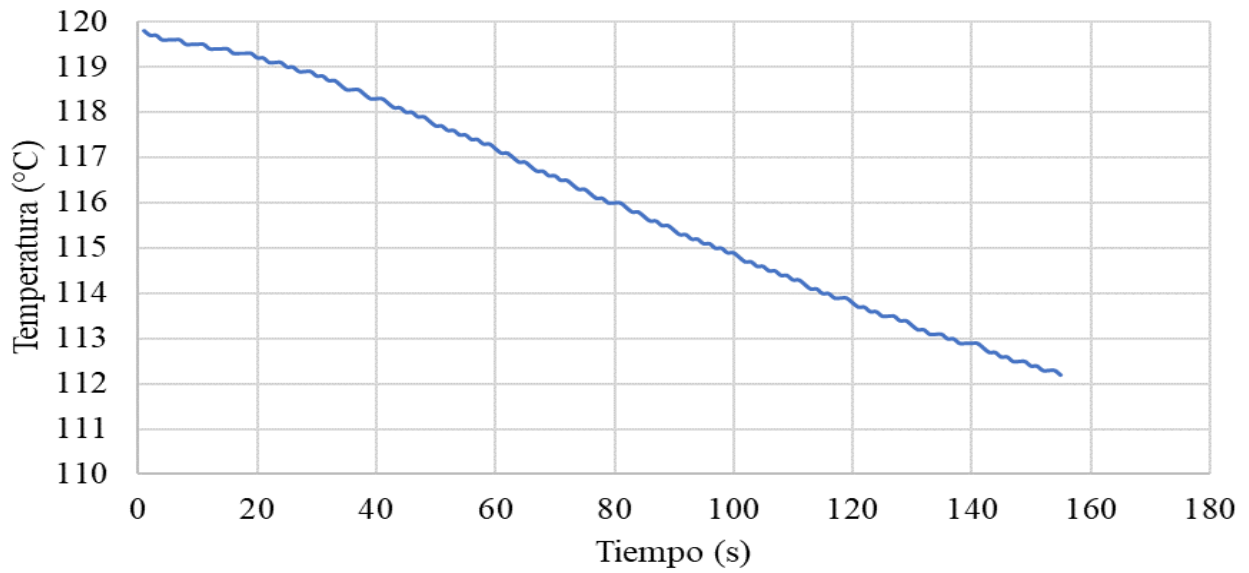


Anexo 37. Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba experimental 3 de descongelación con setpoint de 120°C por sistema de inducción.

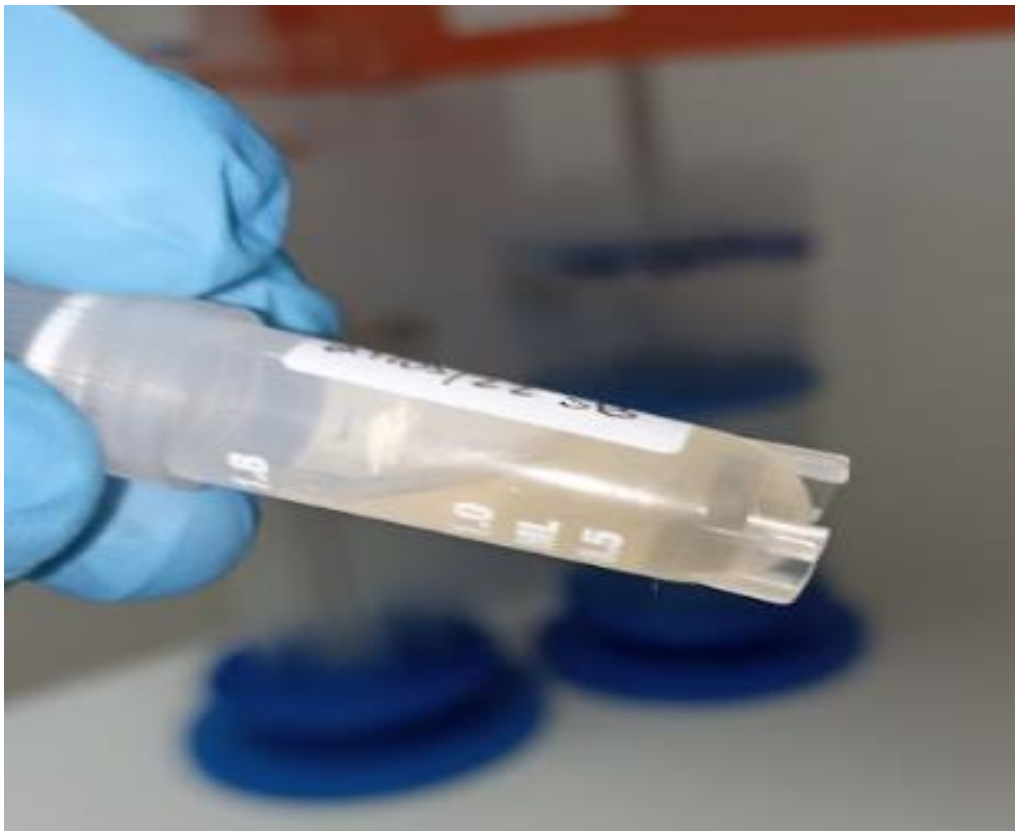


Anexo 38. Estado del vial de CMSPFBS post-descongelación luego de prueba experimental 3 con

setpoint de 120°C.

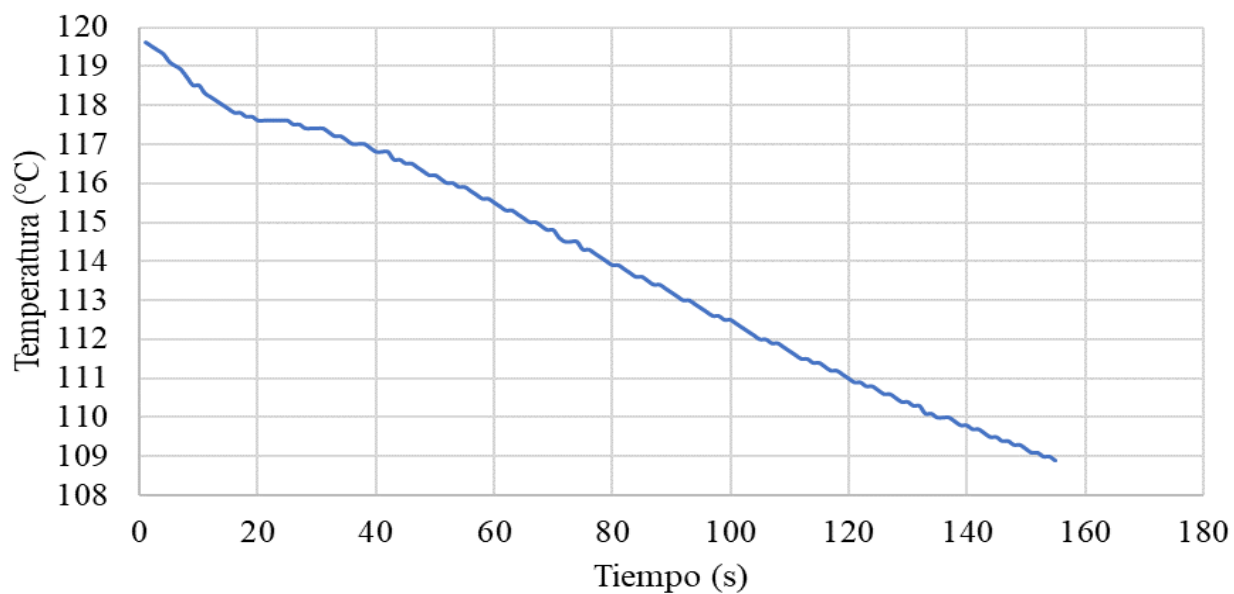


Anexo 39. Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba experimental 4 de descongelación con setpoint de 120°C por sistema de inducción.



Anexo 40. Estado del vial de CMSPFBS post-descongelación luego de prueba experimental 4 con

setpoint de 120°C.

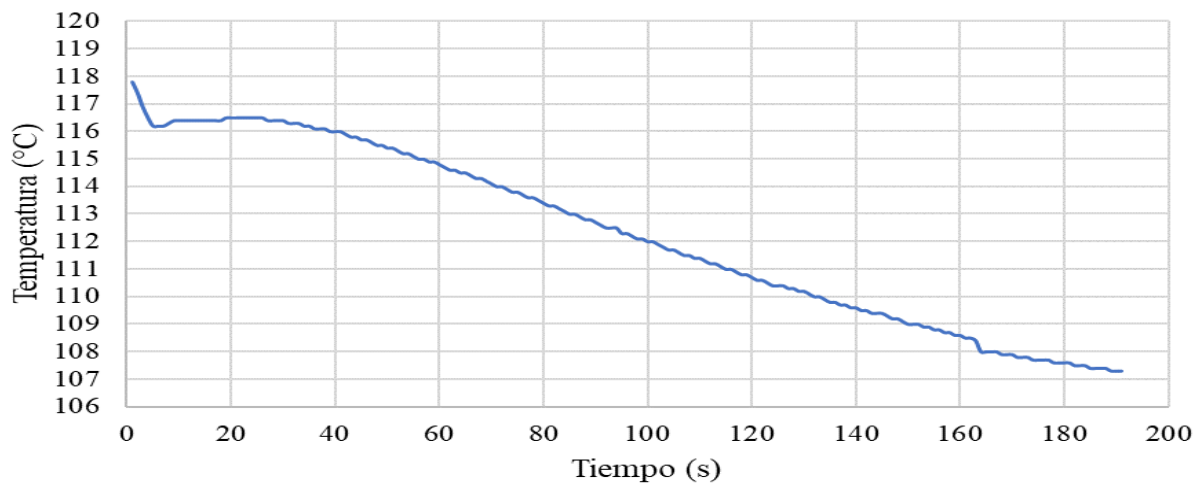


Anexo 41. Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba experimental 5 de descongelación con setpoint de 120°C por sistema de inducción.



Anexo 42. Estado del vial de CMSPFBS post-descongelación luego de prueba experimental 5 con

setpoint de 120°C.



*Anexo 43.* Comportamiento de la temperatura ambiente durante la prueba experimental 6 de descongelación con setpoint de 120°C por sistema de inducción.



*Anexo 44.* Estado del vial de CMSPFBS post-descongelación luego de prueba experimental 6 con

setpoint de 120°C.

| Control 1 - M1   |                 |           |                 |           | Control 2 - M1   |                 |           |                 |           |
|--|-----------------|-----------|-----------------|-----------|--|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| Cuadrante  | Cámara superior |           | Cámara inferior |           | Cuadrante  | Cámara superior |           | Cámara inferior |           |
|  | Vivas           | Muertas   | Vivas           | Muertas   |  | Vivas           | Muertas   | Vivas           | Muertas   |
| 1  | 58              | 5         | 100             | 4         | 1  | 103             | 7         | 114             | 3         |
| 2  | 60              | 6         | 100             | 6         | 2  | 110             | 5         | 122             | 6         |
| 3  | 64              | 8         | 83              | 2         | 3  | 102             | 7         | 111             | 5         |
| 4  | 70              | 7         | 94              | 3         | 4  | 108             | 6         | 119             | 5         |
| <b>Total</b>   | <b>252</b>      | <b>26</b> | <b>377</b>      | <b>15</b> | <b>Total</b>   | <b>423</b>      | <b>25</b> | <b>466</b>      | <b>19</b> |
| <b>Total células vivas</b> 629                                 |                 |           |                 |           | <b>Total células vivas</b> 889                                 |                 |           |                 |           |
| <b>Total células contadas</b> 670                              |                 |           |                 |           | <b>Total células contadas</b> 933                              |                 |           |                 |           |
| $\% \text{ Viabilidad} = \frac{629}{670} \times 100 = 93,88\%$ |                 |           |                 |           | $\% \text{ Viabilidad} = \frac{889}{933} \times 100 = 95,28\%$ |                 |           |                 |           |

| Control 3 - M1   |                 |           |                 |          | Control 4 - M2   |                 |           |                 |          |
|--|-----------------|-----------|-----------------|----------|--|-----------------|-----------|-----------------|----------|
| Cuadrante  | Cámara superior |           | Cámara inferior |          | Cuadrante  | Cámara superior |           | Cámara inferior |          |
|  | Vivas           | Muertas   | Vivas           | Muertas  |  | Vivas           | Muertas   | Vivas           | Muertas  |
| 1  | 85              | 1         | 72              | 1        | 1  | 155             | 3         | 158             | 2        |
| 2  | 84              | 3         | 58              | 1        | 2  | 137             | 1         | 179             | 4        |
| 3  | 79              | 3         | 77              | 2        | 3  | 165             | 6         | 148             | 2        |
| 4  | 88              | 3         | 75              | 2        | 4  | 160             | 4         | 123             | 1        |
| <b>Total</b>   | <b>336</b>      | <b>10</b> | <b>282</b>      | <b>6</b> | <b>Total</b>   | <b>617</b>      | <b>14</b> | <b>608</b>      | <b>9</b> |
| <b>Total células vivas</b> 618                                 |                 |           |                 |          | <b>Total células vivas</b> 1225                                  |                 |           |                 |          |
| <b>Total células contadas</b> 634                              |                 |           |                 |          | <b>Total células contadas</b> 1248                               |                 |           |                 |          |
| $\% \text{ Viabilidad} = \frac{618}{634} \times 100 = 97,48\%$ |                 |           |                 |          | $\% \text{ Viabilidad} = \frac{1225}{1248} \times 100 = 98,16\%$ |                 |           |                 |          |

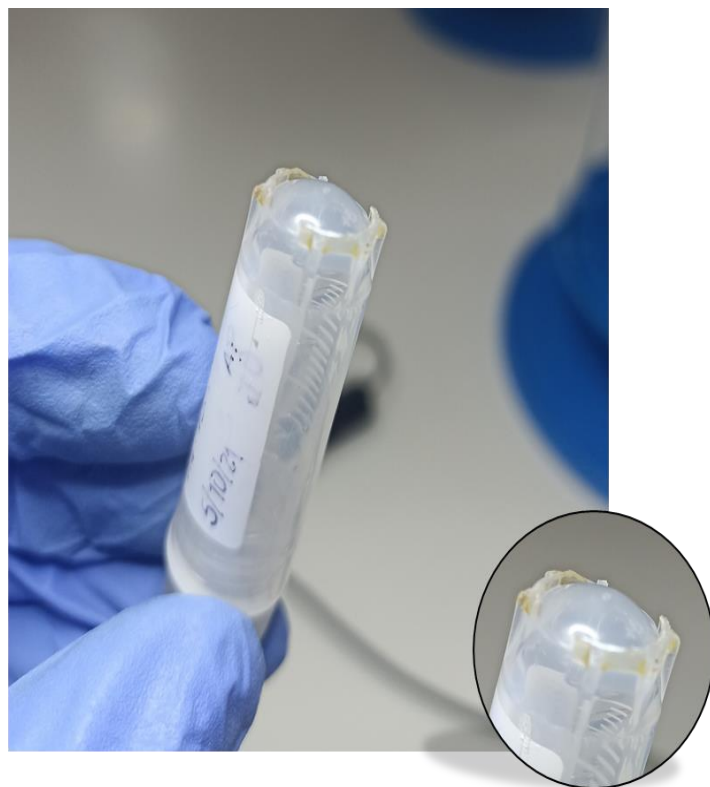
Anexo 45. Conteo celular de las pruebas de control por medio de baño serológico.

| Experimental 1 - M1  |                 |           |                 |           | Experimental 2 - M1  |                 |           |                 |           | Experimental 3 - M1  |                 |           |                 |           |
|--|-----------------|-----------|-----------------|-----------|--|-----------------|-----------|-----------------|-----------|--|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| Cuadrante  | Cámara superior |           | Cámara inferior |           | Cuadrante  | Cámara superior |           | Cámara inferior |           | Cuadrante  | Cámara superior |           | Cámara inferior |           |
|  | Vivas           | Muertas   | Vivas           | Muertas   |  | Vivas           | Muertas   | Vivas           | Muertas   |  | Vivas           | Muertas   | Vivas           | Muertas   |
| 1  | 72              | 2         | 85              | 2         | 1  | 12              | 7         | 4               | 7         | 1  | 58              | 5         | 108             | 5         |
| 2  | 57              | 2         | 73              | 5         | 2  | 8               | 10        | 6               | 4         | 2  | 76              | 5         | 78              | 2         |
| 3  | 56              | 3         | 54              | 1         | 3  | 8               | 5         | 5               | 3         | 3  | 97              | 4         | 83              | 9         |
| 4  | 77              | 3         | 57              | 5         | 4  | 6               | 4         | 5               | 2         | 4  | 79              | 6         | 77              | 5         |
| <b>Total</b>   | <b>262</b>      | <b>10</b> | <b>269</b>      | <b>13</b> | <b>Total</b>   | <b>34</b>       | <b>26</b> | <b>20</b>       | <b>16</b> | <b>Total</b>   | <b>310</b>      | <b>20</b> | <b>346</b>      | <b>21</b> |
| <b>Total células vivas</b> 531                                 |                 |           |                 |           | <b>Total células vivas</b> 54                                |                 |           |                 |           | <b>Total células vivas</b> 656                                 |                 |           |                 |           |
| <b>Total células contadas</b> 554                              |                 |           |                 |           | <b>Total células contadas</b> 96                             |                 |           |                 |           | <b>Total células contadas</b> 697                              |                 |           |                 |           |
| $\% \text{ Viabilidad} = \frac{531}{554} \times 100 = 95,85\%$ |                 |           |                 |           | $\% \text{ Viabilidad} = \frac{54}{96} \times 100 = 56,25\%$ |                 |           |                 |           | $\% \text{ Viabilidad} = \frac{656}{697} \times 100 = 94,12\%$ |                 |           |                 |           |

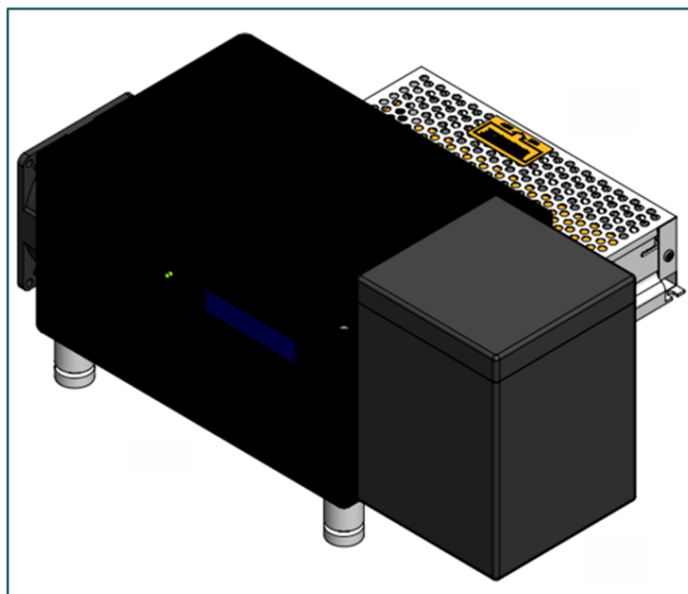
| Experimental 4 - M2  |                 |           |                 |           | Experimental 5 - M2  |                 |           |                 |           | Experimental 6 - M2  |                 |           |                 |           |
|--|-----------------|-----------|-----------------|-----------|--|-----------------|-----------|-----------------|-----------|--|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| Cuadrante  | Cámara superior |           | Cámara inferior |           | Cuadrante  | Cámara superior |           | Cámara inferior |           | Cuadrante  | Cámara superior |           | Cámara inferior |           |
|  | Vivas           | Muertas   | Vivas           | Muertas   |  | Vivas           | Muertas   | Vivas           | Muertas   |  | Vivas           | Muertas   | Vivas           | Muertas   |
| 1  | 176             | 3         | 84              | 4         | 1  | 106             | 2         | 117             | 6         | 1  | 116             | 3         | 154             | 3         |
| 2  | 116             | 5         | 79              | 3         | 2  | 124             | 2         | 59              | 7         | 2  | 150             | 4         | 128             | 4         |
| 3  | 140             | 5         | 124             | 2         | 3  | 154             | 4         | 96              | 5         | 3  | 133             | 2         | 106             | 3         |
| 4  | 104             | 8         | 94              | 2         | 4  | 134             | 4         | 116             | 3         | 4  | 157             | 2         | 102             | 4         |
| <b>Total</b>   | <b>536</b>      | <b>21</b> | <b>381</b>      | <b>11</b> | <b>Total</b>   | <b>518</b>      | <b>12</b> | <b>388</b>      | <b>21</b> | <b>Total</b>   | <b>556</b>      | <b>11</b> | <b>490</b>      | <b>14</b> |
| <b>Total células vivas</b> 917                                 |                 |           |                 |           | <b>Total células vivas</b> 906                                 |                 |           |                 |           | <b>Total células vivas</b> 1046                                  |                 |           |                 |           |
| <b>Total células contadas</b> 949                              |                 |           |                 |           | <b>Total células contadas</b> 939                              |                 |           |                 |           | <b>Total células contadas</b> 1071                               |                 |           |                 |           |
| $\% \text{ Viabilidad} = \frac{917}{949} \times 100 = 96,63\%$ |                 |           |                 |           | $\% \text{ Viabilidad} = \frac{906}{939} \times 100 = 96,49\%$ |                 |           |                 |           | $\% \text{ Viabilidad} = \frac{1046}{1071} \times 100 = 97,67\%$ |                 |           |                 |           |

Anexo 46. Conteo celular de las pruebas experimentales por medio de baño serológico



*Anexo 47. Estado de viales de FBS + DMSO post-descongelación a temperaturas de setpoint mayores a 120°C.*

## GUIA DE USUARIO



### Guía de funcionamiento

1. Conecte el cable de alimentación a una toma de corriente AC.
2. Inicialice el sistema con el interruptor on-off.
3. Espere un lapso de 6 minutos para que el dispositivo alcance la estabilización de temperatura.
4. Deposite el vial en el interior del sistema adiabático.
5. Presione el interruptor de descongelamiento para inicializar el proceso de descongelación del vial.
6. Una vez terminado el proceso de descongelación presione nuevamente el interruptor para estabilizar nuevamente el sistema.
7. Presione nuevamente el interruptor on-off para apagar el dispositivo.

### Limpieza y desinfección



Mantenga el dispositivo libre de polvo.



Asegúrese de que el dispositivo este desconectado para realizar la limpieza y desinfección



Limpiar con un paño húmedo y alcohol isopropílico toda la superficie externa del equipo, fuente de alimentación y sistema adiabático.



Limpie y desinfecte la pieza metálica antes y después de su uso.



## Especificaciones técnicas

|   |   |
|---|---|
| <b>Dimensiones</b>                            | 34 cm de largo x 15cm de ancho x 17,7 cm de alto                          |
| <b>Peso</b>                                   | 10 kg   |
| <b>Modo de funcionamiento</b>                 | Funcionamiento Continuo   |
| <b>Grado de Movilidad</b>                     | Portátil  |
| <b>Tipo de transmisión de datos</b>           | Alámbrica   |
| <b>Tipo de alimentación</b>                   | 120 VAC ~ 60 Hz   |
| <b>Consumo de potencia</b>                    | 10 VDC x 10 A $\approx$ 100 W   |
| <b>Material</b>                               | Carcasa: Plástico ABS<br>Sistema adiabático: Poliestireno Expandido (EPS) |
| <b>Tiempo de funcionamiento</b>               | Hasta 15 horas continuas  |
| <b>Temperatura de trabajo del dispositivo</b> | 0 °C – 120 °C   |

*Anexo 49. Especificaciones técnicas del dispositivo de inducción.*