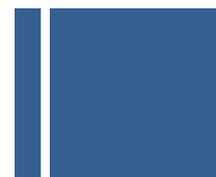


Modelado matemático e
implementación práctica de
sistema de vitrificación ultra-
rápida mediante radiación láser



CAPÍTULO III

IMPLEMENTACIÓN DE SISTEMA DE VITRIFICACIÓN ULTRA-RÁPIDO MEDIANTE RADIACIÓN LÁSER



1. INTRODUCCIÓN

Como ya se ha referido anteriormente existen principalmente dos grupos de técnicas utilizadas tradicionalmente en la criopreservación de material biológico: el enfriamiento lento o slow freezing y la vitrificación.

Las técnicas tradicionales en ambos sistemas presentan dificultades. En el caso del enfriamiento lento se evita la formación de hielo intracelular pero a costa de la formación de la formación del extracelular lo que origina una deshidratación de la célula que trae como consecuencia la deformación de la estructura celular. Como solución a esta dificultad se introducen sustancias crioprotectoras que presentan el enorme inconveniente de ser tóxicos para muchos tipos de células.

El segundo grupo de técnicas, fundamentadas en la consecución de la vitrificación, se basan precisamente en someter a la célula a velocidades elevadas de forma que no se genere hielo ni intracelular ni extracelular. Esta técnica, si bien ha proporcionado muy buenos resultados, adolece de una importante dificultad dado que al vitrificar sale gran cantidad de agua a través de la membrana provocando por un lado un aumento tóxico de sales en la célula y una rápida salida de agua lo que supone una deformación en la estructura de la misma. Para evitar estos efectos, al igual que en los términos anteriores se requiere del uso de crioprotectores que reduzcan este flujo de agua, con la evidente problemática anterior: su toxicidad.

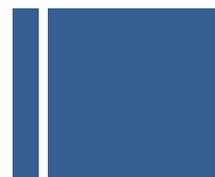
Para lograr vitrificación con una reducida cantidad de crioprotector de tal forma que no sea tóxico para las muestras biológicas se requieren velocidades de enfriamiento muy rápidas, del orden de decenas de miles de grado por minuto que no se alcanza con el método tradicional de inmersión directa en nitrógeno líquido (varios miles de grados por segundo).

Teniendo en cuenta el perfil gaussiano del laser, reducimos el problema a calcular los coeficientes A_n tales que en el instante inicial, permitan que se cumpla

2. MÉTODO PROPUESTO DE VITRIFICACIÓN ULTRARRÁPIDA

Con el presente proyecto, tal y como se ha desarrollado matemáticamente en los modelos anteriores se pretende plantear una técnica de vitrificación con la que se pretende alcanzar velocidades de enfriamiento del orden del millón de grados por segundo.

El método de vitrificación ultra-rápida que se propone consta básicamente de dos etapas.

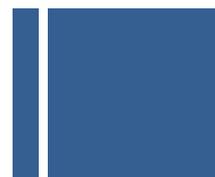


- En la primera etapa del proceso la radiación procedente de una fuente láser de potencia regulable, se focaliza sobre la muestra biológica (utilizando para ello uno de los canales de un microscopio) con objeto de mantener permanentemente la temperatura de la misma en unos márgenes tolerables (37°C), cuando todo el medio situado en el exterior es enfriado hasta los -150°C, haciendo uso de una mezcla de nitrógeno gaseoso a diferentes temperaturas cuya proporción es controlada actuando electrónicamente sobre sendas válvulas. Esta muestra biológica se puede instalar en un recipiente adecuado para ello. Se barajó en un estadio temprano el uso de un recipiente tipo cryostage dotado de ventanas transparentes a la radiación empleada y de una serie de conductos de entrada y salida por donde discurriría fluido refrigerante que permite generar el entorno frío que se pretende crear para la muestra; no obstante finalmente se optó para una primera configuración el uso de capilares de policarbonato anteriormente descritos y que presentan unas adecuadas propiedades de transferencia del calor.

Lograr que la muestra biológica se mantenga a una temperatura constante de 37°C requiere de la implementación de un lazo cerrado de realimentación de tal forma que a partir de medidas de la temperatura de la muestra se actúe sobre la potencia de emisión del láser aumentándola o disminuyéndola de acuerdo a una determinada ley de control. Con objeto de mantener el entorno de la muestra a una temperatura de -150°C en el permanente e implementar un perfil descendente lineal durante las fases iniciales del proceso también se requiere de la determinación de la temperatura de dicho entorno.

- En una segunda etapa del procedimiento de vitrificación considerado la fuente de radiación láser se desconecta súbitamente, accionado por una señal de control (en los modelos matemáticos anteriormente presentados este hecho se ha considerado en $t = 0$), de tal forma que la muestra queda totalmente expuesta a las temperaturas extremas del entorno de la misma de tal forma que como se recoge en los modelos matemáticos anteriores y se constata en los experimentos realizados se alcanzan velocidades de enfriamiento del orden de 10^6 °C/s, lográndose por tanto una adecuada vitrificación. Con objeto de minimizar los efectos de la deshidratación y alteración de la estructura celular ocasionados por los fenómenos crioscópico y osmótico se deben incorporar pequeñas cantidades de crioprotector aunque sin alcanzar niveles tóxicos.

El método de dos etapas antes descrito requiere no obstante para su aplicación de la resolución de dos importantes problemas: medir in situ la temperatura de la muestra sin que se



produzcan alteraciones en la célula a causa del propio proceso de medida y calentar la muestra, en su mayor parte agua, haciendo uso de luz láser a la que es prácticamente transparente.

3. MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA

El sistema de control del láser que calienta la muestra manteniéndola a 37°C aún cuando el entorno en que se encuentra inmerso se halla a -150°C requiere para su correcto funcionamiento de la determinación constante de datos acerca de la temperatura de la muestra con objeto de precisar de acuerdo a una determinada ley de control si hay que actuar sobre el láser aumentando o disminuyendo su potencia.

Evidentemente la técnica de estimación de la temperatura que se implemente debe minimizar los efectos sobre la propia muestra durante el proceso de medida. A este respecto se han contemplado tres posibles técnicas de medición de temperatura:

- Utilización de Rodamina B
- Empleo de termopares
- Espectroscopía Raman

De las técnicas propuestas se han implementado experimentalmente las dos primeras, quedando la tercera opción como una propuesta novedosa que conduciría a la implementación del termómetro Raman, herramienta que podría proporcionar información muy relevante acerca de la calorimetría de la célula.

3.1. UTILIZACIÓN DE RODAMINA B

La Rodamina B es un compuesto químico empleado como colorante y que pertenece al grupo de las rodaminas. Se utiliza habitualmente como colorante de seguimiento en un líquido para rastrear la tasa y dirección de su flujo y transporte. La rodamina posee fluorescencia y puede detectarse fácilmente a un coste bajo mediante unos instrumentos conocidos como fluorómetros. Se utilizan especialmente en aplicaciones de biotecnología tales como microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, espectroscopía de correlación de fluorescencia, etc.

La Rodamina B presenta además una propiedad especialmente interesante de cara a su utilización como sensor de temperatura dada o que la intensidad de la fluorescencia que emite es sensible a la temperatura.

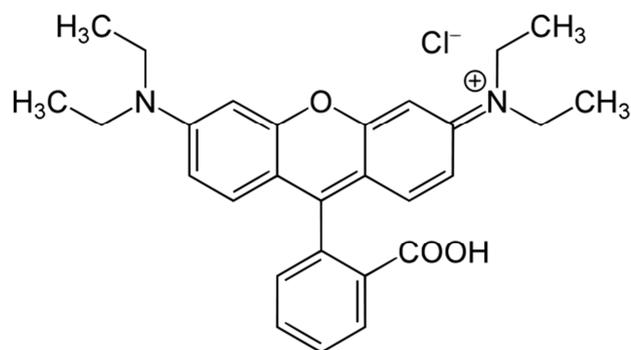


Figura 35. Fórmula química de la rodamina B

Empleando un segundo láser a 514.5 nm se lleva a cabo la excitación de la fluorescencia de la rodamina emitiendo a 590 nm con una intensidad tanto mayor cuanto más fría (menor temperatura) se encuentra la muestra.

Este sistema de adquisición de la temperatura se ha utilizado en el proyecto realizado en la Harvard Medical School and Massachusetts (Center for Engineering in Medicine, Boston, USA) por D. Ramón Risco y otros investigadores alcanzando una precisión superior al 1º C de temperatura.

El sistema que se implementó en aquella ocasión consistía en utilizar un fotodetector que se encargaba de medir la intensidad de la fluorescencia. La señal obtenida es digitalizada y procesada por un software de control, estableciendo a partir de ella una medida de la temperatura de la muestra, lo que permite en función de un determinado esquema de control actuar sobre el dispositivo láser de forma que se mantenga constante la temperatura.

Este sistema de medición de temperatura presenta, no obstante, como principal problema el propio proceso de formación de hielo extracelular, una vez se apaga el láser dado que la zona que no contiene hielo concentrará todo el soluto, entre el que se encuentra la rodamina empleada para medir la temperatura. Dado que se produce un incremento de la concentración de la rodamina se producirá un aumento en la intensidad de la fluorescencia de la muestra de tal forma que no es posible diferenciar entre la que porcentaje de la intensidad de la fluorescencia es debida a la disminución de la temperatura y cual la ocasionada al aumento de la concentración de la rodamina; a causa de esto se pierde la referencia de intensidad y por tanto su validez, a partir de ese instante, como sensor de temperatura.

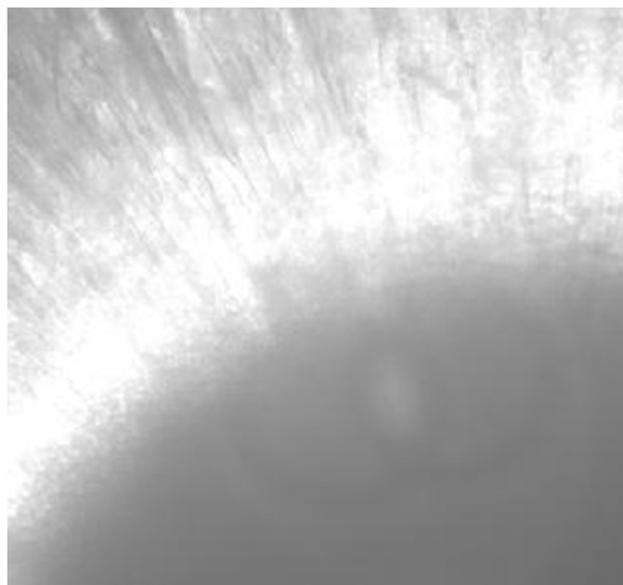


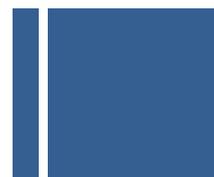
Figura 36. Agua pura con Rodamina (0.025g/l) a la que se ha aplicado el protocolo de enfriamiento ultrarrápido. Se muestra una imagen ampliada a 400X de la zona superior izquierda del lugar tratado. En ella se puede observar la presencia de hielo en la zona no tratada y una estructura opaca que bien pudiera ser agua vitrificada o cristales de hielo de tamaño muy inferior al presente en la otra región

3.2. EMPLEO DE TERMOPARES

El método más sencillo y económico para determinar la temperatura de una muestra es en principio el uso de termopares como dispositivos sensores.

Un termopar en definitiva consiste en el aprovechamiento del efecto Seebeck al realizar la conexión entre dos metales de características diferentes; se produce una caída de tensión que es función de la diferencia de temperatura entre el extremo común en que se unen ambos metales (conocido como punto caliente) y el otro extremo conocido como punto frío. La diferencia de tensión que aparece entre ambos metales cambia directamente con la temperatura, es decir, al aumentar la temperatura de la muestra aumenta también el voltaje en una forma proporcional. Dependiendo del tipo de metales que se empleen en la construcción del termopar pueden medirse diferentes intervalos de temperatura, en particular cuando se utilizan cobre y constantán (aleación de cobre y níquel), se pueden medir temperaturas entre -190°C y 300°C .

En la tabla siguiente se muestra una clasificación de los principales tipos de termopares que se pueden emplear en la práctica:



Tipo	Alcance T ^a (°C)	Material y aleación (+) vs. (-)
Metal - Base		
E	-270 a 1000	Níquel – Cromo vs. Cobre - Níquel
J	-210 a 1200	Hierro vs. Cobre - Níquel
T	-270 a 400	Cobre vs. Cobre – Níquel
K	-270 a 1372	Níquel – Cromo vs. Níquel – Aluminio
M	-270 a 1300	Níquel – Cromo – Silicio vs. Níquel – Silicio - Magnesio

Tabla 5. Clasificación de los diferentes tipos de termopares constituidos por metal -Base.

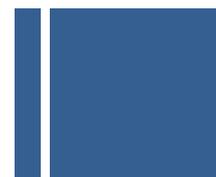
Tipo	Alcance T ^a (°C)	Material y aleación (+) vs. (-)
Metal - Noble		
R	-50 a 1768	Platino – 13% rodio vs. platino
S	-50 a 1768	Platino – 10% rodio vs. platino
B	0 a 1820	Platino – 30% rodio vs. Platino – 6% rodio

Tabla 6. Clasificación de los diferentes tipos de termopares constituidos por metal –Noble.

Por el rango de temperaturas en la que pretendemos trabajar (-150 a 37°C) y por su economía el tipo de termopar más apropiado para emplear en este sistema es el tipo T, es decir el uso de cobre en uno de sus terminales y constatan en el otro.

En la implementación práctica del sistema de vitrificación ultrarrápida, aparte del uso fallido de la rodamina, se han empleado con éxito termopares de tamaño adecuado (acorde con el tamaño de los capilares de policarbonato empleados; concretamente en el sistema se han utilizado dos termopares:

- Uno de los termopares se instalará lo más próximo posible a la muestra con objeto de sensar la temperatura a la que se encuentra la misma. La diferencia de tensión surgida entre los terminales del sensor son captados por una tarjeta de adquisición de datos a través de la cual se obtienen en el sistema de control datos en tiempo real de la



temperatura de la célula generando la señal de control oportuna de actuación sobre el dispositivo láser, permitiendo en todo momento seguir la referencia de 37°C.

- Un segundo termopar se colocará en contacto con el medio criogénico con objeto de tener monitorizado en todo momento, pero especialmente en el arranque del sistema, la temperatura del entorno. Con objeto de permitir que desde el primer instante la temperatura de la muestra se encuentre dentro de parámetros donde las células puedan sobrevivir se aplica una señal de referencia a seguir por la temperatura descendente hasta alcanzar los -150°C para después mantener constante este valor. La actuación sobre el fluido criogénico se realiza actuando sobre sendas electroválvulas que mezclan nitrógeno gaseoso caliente con nitrógeno gaseoso enfriado al pasar a través de un serpentín por nitrógeno líquido, en una proporción tal que se logre alcanzar la temperatura de referencia.

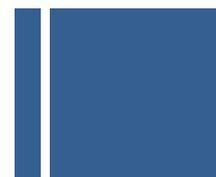
Las características más destacadas de estos sensores de temperatura son principalmente:

- Resultan económicos, frente a otras alternativas.
- Intercambiables.
- Disponen de conectores estándar.
- Capaces de medir un amplio rango de temperaturas.
- Pueden fabricarse termopares suficientemente pequeños como para medir temperaturas de muestras celulares.
- Presentan no obstante unas limitaciones en la exactitud; no obstante, para el caso que nos ocupa en el que se pretenden medir velocidades de enfriamiento del orden de 10⁶°C/s, pueden resultar irrelevantes.

Si bien esta técnica se ha utilizado en la implementación de la configuración del sistema de vitrificación, se presenta a continuación una técnica novedosa que permitirá determinar con exactitud la temperatura aprovechando el análisis espectral de la radiación electromagnética dispersada (scattering) por la muestra al ser sometida a la acción de una fuente monocromática (láser): efecto Raman.

3.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN

Como técnica alternativa a las anteriormente mencionadas para la determinación de la temperatura de la muestra a criopreservar (sin interactuar de ninguna forma sobre la muestra de forma que no se alteren el comportamiento de las células por el solo hecho de realizar la medida), se plantea el uso de las características propias del espectro Raman del agua.



ESPECTRO RAMAN

El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia ν_0 sobre una muestra cuyas características moleculares se desean determinar, y examinar la luz dispersada por dicha muestra. La mayor parte de la luz dispersada presenta la misma frecuencia que la luz incidente pero una porción muy pequeña presenta un cambio de frecuencia como resultado de la interacción de la luz con la materia. La luz que mantiene la misma frecuencia ν_0 que la luz incidente se conoce como dispersión Rayleigh y no aporta información alguna sobre la composición de la muestra analizada. La luz dispersada que por su parte presenta frecuencias distintas a la de la radiación incidente, es la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra y es la que se conoce como dispersión Raman. Las nuevas frecuencias $+\nu_r$ y $-\nu_r$ son las frecuencias Raman, características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra e independientes de la radiación incidente.

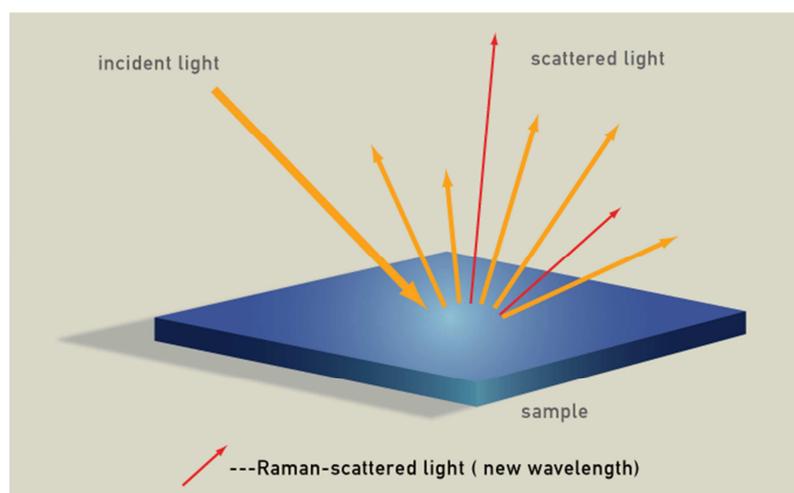
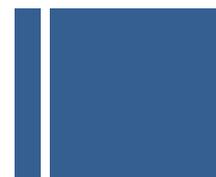


Figura 37. Emisión de luz dispersa (scattered light) tras incidir luz incidente (incident light) sobre la muestra. Algunas de las componentes de luz dispersada constituirán el espectro Raman, presentando componentes de frecuencia diferentes a las de la radiación incidente.

Fuente: Immunome Research 2010

Las variaciones de frecuencia observadas en el fenómeno de dispersión Raman, son equivalentes a variaciones de energía. Los iones y átomos enlazados químicamente para formar moléculas y redes cristalinas están sometidos a constantes movimientos vibracionales y rotacionales; estas oscilaciones se realizan a frecuencias bien determinadas en función de la masa de las partículas que intervienen y del comportamiento dinámico de los enlaces



existentes. A cada uno de los movimientos vibracionales y rotacionales de la molécula le corresponderá un valor determinado de la energía molecular.

Cuando los fotones del haz de luz incidente, con energía $h\nu_0$ (donde h es la constante de Planck) es mucho mayor que la diferencia de energía entre dos niveles vibracionales (o rotacionales) de la molécula, chocan con ella de tal forma que la mayor parte la atraviesan pero una pequeña fracción es dispersada (del orden de un fotón por cada 10^{11} incidentes) pudiéndose interpretar de la siguiente forma: el fotón incidente lleva a la molécula transitoriamente a un nivel de energía vibracional (o rotacional) superior no permitido, el cual abandona rápidamente para pasar a uno de los niveles de energía permitidos emitiendo un fotón; la frecuencia a la cual resulta liberado este fotón dependerá del salto energético realizado por la molécula, pudiendo distinguirse dos casos:

- Si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a la misma frecuencia que el fotón incidente, se dice que el choque es elástico ya que no el fotón ni la molécula sufren variaciones en su estado energético; la molécula vuelve al mismo nivel de energía que tenía antes del choque y el fotón dispersado tiene la misma frecuencia ν_0 que el incidente, dando así lugar a la dispersión Rayleigh.
- Si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a una frecuencia diferente de la incidente, se dice que el choque es inelástico (existe transferencia de energía entre la molécula y el fotón); en este caso pueden darse dos fenómenos:
 - Si el fotón dispersado tiene una frecuencia menor a la del incidente, se produce una transferencia de energía del fotón a la molécula que, después de saltar al estado de energía no permitido, vuelve a uno permitido mayor al que tenía inicialmente; el fotón es dispersado con frecuencia $\nu_0 - \nu_r$ y se produce la conocida como dispersión Raman Stokes.
 - Si el fotón tiene una frecuencia superior a la del incidente se produce una transferencia de energía de la molécula al fotón; esto implica que la molécula, inicialmente antes del choque no se encontraba en su estado vibracional fundamental sino en uno de mayor energía y después del choque pasa a este estado. El fotón es dispersado con frecuencia $\nu_0 + \nu_r$ y se produce la conocida como dispersión Raman anti-Stokes.

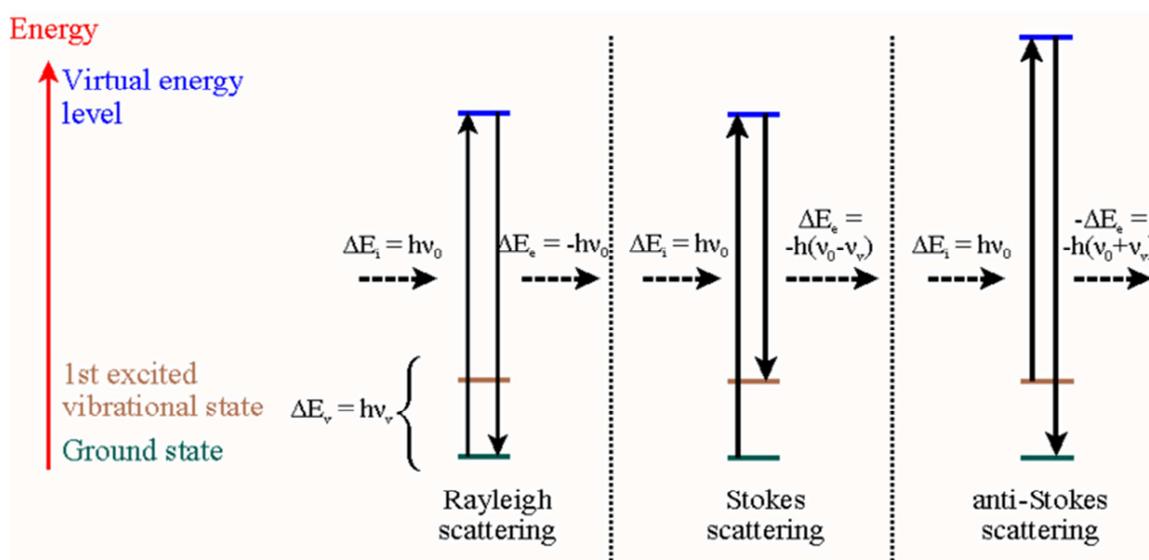


Figura 38. Clasificación de los diferentes tipos de termopares constituidos por metal -Base.

Cada material tendrá un conjunto de valores ν_v , característicos de su estructura poliatómica y de la naturaleza de los enlaces químicos que la forman.

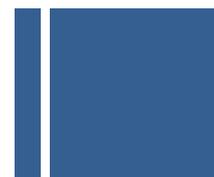
El espectro Raman recoge estos fenómenos representando la intensidad óptica dispersada en función del número de onda normalizado ν al que se produce.

APLICACIÓN DEL ESPECTRO RAMAN COMO SENSOR DE TEMPERATURA

La técnica de la espectroscopía Raman está bien definida como un método para medir concentraciones en gases o líquidos con el fin de investigar la estructura molecular de sustancias puras y medir temperaturas en llamas o en flujos de gases a alta temperatura.

Hay dos efectos diferentes que se pueden emplear para medir temperaturas de cuerpos empleando la técnica de la espectroscopía Raman.

- El primer efecto se basa en la ratio entre las moléculas de gas que están en un estado vibracional excitado y las moléculas de dicho gas que por el contrario se encuentran en un estado de reposo. Esta relación depende de la temperatura a la que se encuentra el gas de acuerdo con la ley de Boltzman. El efecto requiere que las temperaturas del gas se encuentren por encima de los 1000 K, dado que en otro caso el número de moléculas en un estado excitado no será significativo. La aplicación más habitual de la



espectroscopía Raman es en este sentido el medir la temperatura en una llama. En este caso la temperatura de las llamas se puede calcular como una relación entre los picos stokes y antistokes de un cierto componente como el nitrógeno por ejemplo o a través de la forma de la línea vibracional del nitrógeno por ejemplo (Schrader, 1995).

- Un efecto completamente diferente permite medir la temperatura del agua líquida mediante el uso de la espectroscopía Raman. La forma del espectro Raman del agua líquida es bastante diferente de la forma de dicho espectro en el caso del agua en estado de vapor debido a que los enlaces de hidrógenos afectan a la vibración de los enlaces OH. El número de enlaces de hidrógeno depende de la temperatura y la forma del espectro Raman del agua líquida cambia por lo tanto también con la temperatura.

Walrafen describió la influencia de los enlaces de hidrógeno en la línea vibracional cercana a los 3652 cm^{-1} ya en 1976. Él ya sugirió una dependencia de la temperatura de la forma del pico Raman en la región entre 3000 y 3800 cm^{-1} . Walfaren y Fujita e Ikawa (1989), más tarde, utilizaron este efecto para determinar la estructura molecular del agua líquida y determinar la energía de enlace de los enlaces de hidrógeno mediante el uso de espectroscopía Raman y espectroscopía infrarroja.

Leonard y alumnos (1979) llevaron a cabo un primer intento de usar este efecto para la medición de la temperatura del agua en los inicios de la década de los 70. Desarrolló el esqueleto de un sistema LIDAR para medir la temperatura del agua del océano sobre grandes áreas del mismo. Midió las temperaturas a 100 metros por debajo del nivel de la superficie del agua. Dentro de una profundidad de 3 metros consiguió un promedio de $\pm 1\text{ K}$. Schwaiger (1992) empleó por su parte el mismo efecto para medir temperaturas de gotas de agua.

J. Karl, M. Ottman y D. Mein en sus trabajos aplicaron la espectroscopía Raman para medir la distribución de temperatura del agua a lo largo de un haz láser.

ESPECTRO RAMAN DEL AGUA LÍQUIDA

La dispersión Raman es un proceso inelástico de dispersión de la luz. Una molécula puede dispersar luz de cualquier longitud de onda bien elásticamente (sin desplazamiento de longitud de onda) o inelásticamente, en cuyo caso la luz dispersada es desplazada a una longitud de onda diferente. El primer caso se denomina como **dispersión Rayleigh** y el segundo es conocido como **dispersión Raman**. Las dispersiones inelásticas de la luz incidente implican que una cierta cantidad de energía queda en la molécula. La pérdida de energía de los *cuantos de luz* dispersada corresponde con la energía de una cierta vibración de la molécula ocasionada por el proceso de dispersión.



Aquellas vibraciones de la molécula como por ejemplo las vibraciones de estiramiento o rotacionales, son propias y características de la molécula. Esto permite utilizar la espectroscopía Raman en análisis químico cuantitativo o investigar la estructura de la molécula.

El desplazamiento Raman de una cierta molécula depende de la energía de la vibración de una molécula, de su estructura, de la distancia atómica y de los correspondientes pesos atómicos.

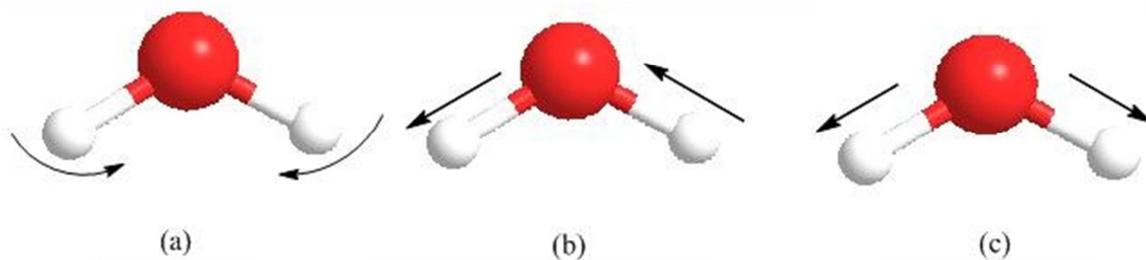


Figura 39. Modos vibracionales de las moléculas de agua. (a) vibración de curvatura (b) vibración por estrechamiento asimétrica (c) vibración por estrechamiento simétrico

Este efecto reduce la energía de vibración asociada a los estrechamientos de los enlaces de los O-H y reduce el desplazamiento Raman. El pico del agua líquida es mucho más amplio que el pico del vapor a causa de que el ángulo entre los enlaces OH y el enlace de hidrógeno puede ser muy diferente. La influencia de los enlaces de hidrógeno en la vibración de estrechamiento de los enlaces O-H depende del ángulo entre el enlace de hidrógeno y los enlaces OH.

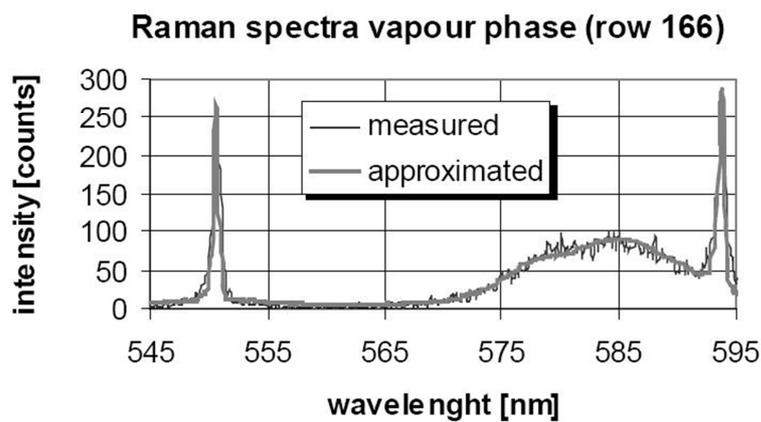


Figura 40. Espectro Raman de una muestra de vapor de agua
Fuente: M. Goldbrunner, J. Karl, D. Hein

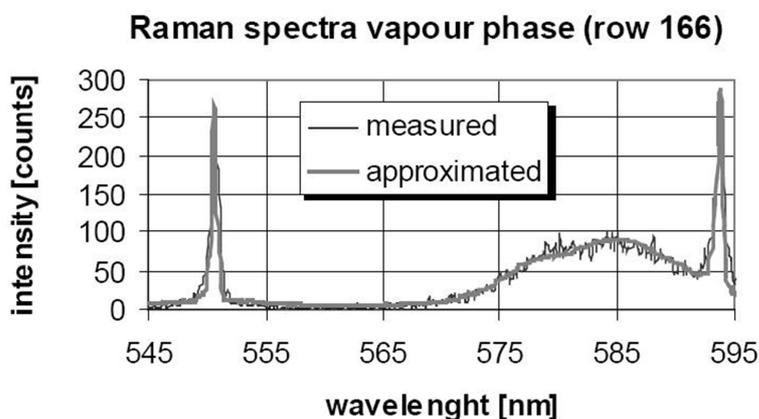


Figura 41. Espectro Raman de una muestra de agua líquida
Fuente: M. Goldbrunner, J. Karl, D. Hein

La forma de los picos agua líquida cambia con la temperatura como se muestra en la figura 42.

Warafen explicó este efecto con una reacción de equilibrio dependiente de la temperatura entre los hidrógenos enlazados y los hidrógenos no enlazados de los osciladores OH en estrechamiento y expansión en agua líquida. El número de enlaces de hidrógeno establecidos decrece a medida que se produce un aumento de la temperatura.

Este efecto puede ser utilizado para medir temperaturas del agua con un error de $\pm 2^{\circ}\text{K}$ utilizando un algoritmo descrito en Karl and Weiss, en 1997.

La figura siguiente muestra la forma del espectro Raman medido para el agua líquida a temperaturas entre 30 y 100 °C. Después de la extracción de la línea base se observa que los picos de la curva del espectro del agua normalizados se cruzan todos en el mismo punto (punto isobéptico) tal y como es documentado por Walfaren.

La estructura molecular real del agua líquida es bastante complicada pero en términos sencillos se puede decir que el pico del agua consta realmente de dos picos con máximos en **577,6 nm** y **589,4 nm** que representan los hidrógenos enlazados de los enlaces OH y los hidrógenos no enlazados de los enlaces OH no enlazados.

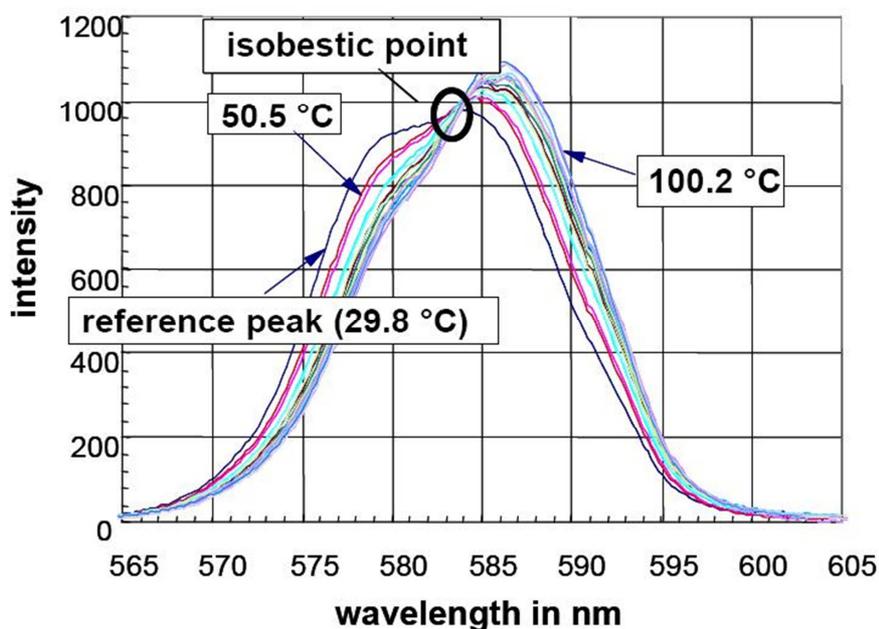


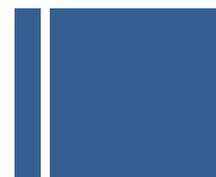
Figura 42. Espectro Raman del agua para temperaturas entre 30 y 100°C
Fuente: M. Goldbrunner, J. Karl, D. Hein

La forma de las diferencias en el espectro entre los dos picos relevantes (577,6 y 589,4 nm) resultan útiles para obtener la relación entre los picos de intensidad de los hidrógenos enlazados y los hidrógenos no enlazados de las moléculas.

Asumiendo un equilibrio dependiente de la temperatura entre los osciladores por estrechamiento de los hidrógenos enlazados y de los hidrógenos no enlazados, este equilibrio puede ser interpretado además como un equilibrio entre hidrógenos enlazados (polímero) y los hidrógenos no enlazados (monómeros) de las moléculas de agua.

La relación de concentración de los enlaces establecidos representa la constante de equilibrio de este equilibrio. Esta constante de equilibrio se puede expresar a través de la entalpia de los enlaces de hidrógeno ΔH^0 y la entropía (Atkins, 1986)

$$\ln\left(\frac{[P]}{[M]}\right) = \ln\left(\frac{[O-H]_{no\ enlazados}}{[O-H]_{enlazados}}\right) = \frac{\Delta H^0}{R T} + R \Delta S^0$$



Asumiendo que los hidrógenos enlazados y lo no enlazados de los enlaces O-H del agua causan picos en el espectro Raman con una sección cruzada diferencial S_M y S_P la ecuación anterior se puede escribir como:

$$\ln\left(\frac{S_M I_P}{S_P I_M}\right) = \frac{\Delta H^0}{R T} + R \Delta S^0$$

O bien, estableciendo la relación entre la ratio de las intensidades y la temperatura:

$$\ln\left(\frac{I_P}{I_M}\right) = c_1 \frac{1}{T} + c_2$$

Aplicando aproximación lineal por el método de los mínimos cuadrados a los valores experimentales midiendo las intensidades para diferentes temperaturas se determina el valor de los coeficientes c_1 y c_2 . Utilizando el principio de Vant'Hoffs para calcular la entalpía de los enlaces de hidrógeno ΔH^0 obtenemos para c_1 un valor de $10.47 \cdot 10^3$ KJ/kmol que resulta ser una buena aproximación a las entalpías publicadas.

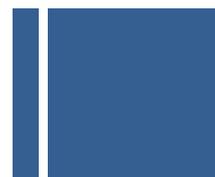
Si la relación entre las intensidades de los picos del espectro $\frac{I_P}{I_M}$ se determina a partir de los datos medidos, la temperatura del agua puede ser calculada a través de:

$$T = \frac{c_1}{\ln\left(\frac{I_P}{I_M}\right) - c_2} = \frac{1259,66 \text{ K}}{\ln\left(\frac{I_P}{I_M}\right) - 3,92}$$

Así pues si empleando algún procedimiento de evaluación de la temperatura determinamos el valor de los niveles de sendos picos, en nuestro sistema de control será fácil calcular el valor de la temperatura estimada para emplearlo como medio para actuar sobre el láser y conseguir que siga la señal de referencia.

PROCEDIMIENTOS PARA EVALUAR LA TEMPERATURA MEDIANTE ESPECTRO RAMAN

Hay dos métodos principales para obtener la relación de intensidad entre los picos del espectro Raman. El primer método requiere del uso de un monocromador o un espectrógrafo tal y como se ha mencionado anteriormente y utiliza toda la información espectral para la evaluación de la temperatura. El espectrógrafo o monocromador proporciona un espectro Raman completo permitiendo calcular la relación $\frac{I_P}{I_M}$ con bastante precisión, y por tanto estimar la temperatura.



La principal ventaja de este método es que cualquier señal Rayleigh, Mie o fluorescencia puede ser separada y eliminada fácilmente.

La extracción de la línea base se puede hacer automáticamente utilizando un procedimiento de ajuste lineal que separe las señales del espectro. El procedimiento de procesamiento de imagen presentado por Karl y Weiss en 1997 proporcionan temperaturas con un error de menos de $\pm 2^{\circ}\text{K}$ dentro del rango de temperaturas de 20°C y.

El segundo método para obtener las temperaturas del agua utiliza filtros de interferencia tipo paso banda estrecha. La idea es utilizar dos filtros paso de banda estrecha que transmitan principalmente las señales Raman de los hidrógenos enlazados y los no enlazados de los enlaces O-H.

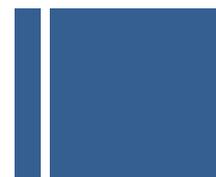
El haz láser puede ser expandido mediante a una lámina de luz. Una cámara CCD muestrea la luz dispersada con o sin un espectrógrafo. Las dos imágenes de la lámina de agua tomadas con diferentes filtros de interferencia son necesarias para evaluar la distribución de la temperatura del agua.

Utilizando dos filtros de interferencia con una longitud de onda central en la longitud de onda Raman de los hidrógenos enlazados y los no enlazados se hace posible obtener la relación entre intensidades a partir de dos mediciones separadas con sendos filtros. Utilizando la línea azul de un **laser de argón ion a 488 nm** se requiere el uso de dos filtros paso de banda cercana a **577 nm** y **589 nm**.

Es evidente que la relación de las intensidades transmitidas a través de filtros depende de la temperatura del agua. La integración de los espectros proporciona la intensidad total transmitida a través de los filtros.

Este método, denominado, de dos colores tiene que tratar con tres importantes problemas:

- Los filtros de interferencia paso banda de banda estrecha son habitualmente filtros del tipo Fabry-Perot que operan con el mismo principio que los interferómetros Fabry-Perot. La longitud de onda central real del filtro depende del ángulo de incidencia. Es obvio que este efecto causará errores severos y sólo es válido para calcular valores de temperatura del agua a partir de la relación de intensidades si el ángulo de incidencia es muy pequeño.



- El segundo problema del método de los dos colores es causado por la fluorescencia. Altas tasas de fluorescencia incrementan las intensidades de los picos de 578 nm y 590 nm y por tanto distorsionan la relación entre las intensidades de los picos.

Con agua pura la mayor parte de la señal de fluorescencia se origina de la superficie del agua. La reflexión y la dispersión de la luz laser sobre la superficie sólida del agua generan fluorescencia adicional con lo que mejora la tasa de fluorescencia total.

- Para cualquier aplicación de la técnica de los dos colores el tercer efecto será el más importante. Cualquier disolvente o partícula causan fluorescencias adicionales que podrían ser incluso más intensas que la señal Rayleigh. La suciedad de la ventana del láser y espejos mejorará la fluorescencia también.

La mejor forma para eliminar el error causado por la fluorescencia es medirla utilizando un espectrógrafo.

4. CALENTAMIENTO DE LA MUESTRA MEDIANTE LÁSER

Uno de los problemas a resolver en el sistema de vitrificación por laser que se está proponiendo es precisamente el núcleo del sistema: ¿cómo conseguir que la muestra, en su mayor parte agua, se caliente por acción del láser?

En la figura siguiente se muestra la absorción del agua para diferentes longitudes de onda de una radiación electromagnética con objeto de decidir que mecanismo podemos emplear para lograr un adecuado calentamiento de la muestra empleando radiación láser.



Figura 43. Curva de absorción de radiación electromagnética del agua

Evidentemente la solución más económica es emplear radiación láser que opere en el rango del visible, es decir la región del espectro electromagnético que el ojo humano es capaz de percibir, siendo el rango típico en el que respondería un ojo humano el que se extiende entre 400 y 700 nm. Con objeto de comprobar si es posible utilizar directamente una fuente láser en esta banda como medio de calentamiento se muestra a continuación la curva de absorción para el agua en el espectro visible:

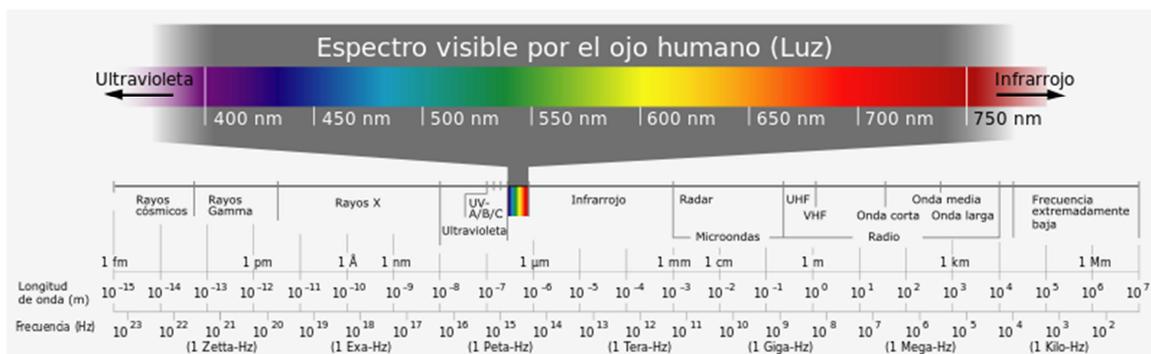


Figura 44. Descomposición del espectro visible.

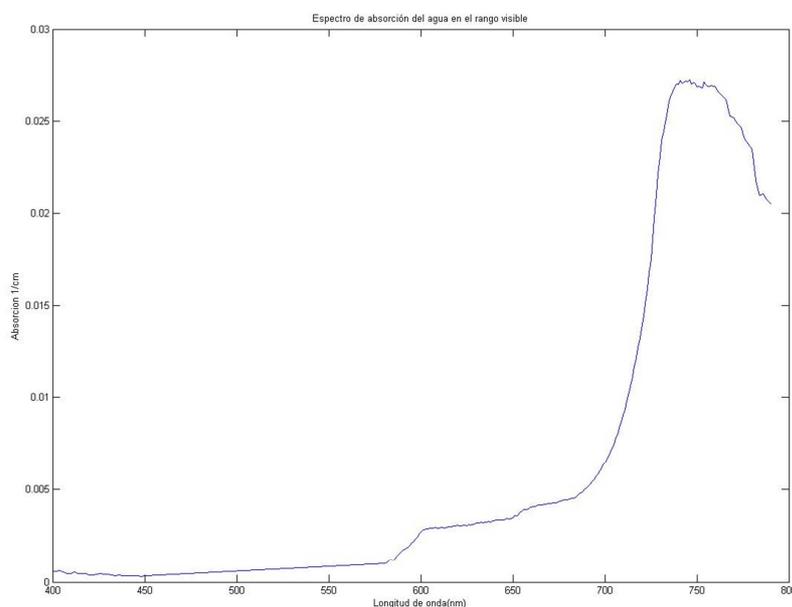


Figura 45. Absorción de la radiación electromagnética por parte del agua en espectro visible.

Como puede comprobarse en las curvas anteriores el agua es prácticamente transparente a la radiación electromagnética en el rango del visible, por lo que para su uso directo se requeriría de un láser muy potente de tal forma que la mayor parte de su radiación se estaría desperdiciando. No es por tanto una solución técnicamente eficiente. Se plantean por lo tanto las siguientes alternativas.

- **Utilización de laser infrarrojo:** a la luz de la forma de la curva de absorción de radiación electromagnética por parte del agua en el espectro de luz visible se comprueba que es poco eficiente emplear este tipo de láser para calentar la muestra; no obstante la curva de absorción electromagnética, en el espectro infrarrojo (situadas inmediatamente a continuación de la luz roja extendiéndose entre longitudes de onda de 780 nm a 1mm) presenta sendos máximos interesantes a 1455 nm y 1930.5 nm respectivamente tal y como se muestra a continuación:

Como puede observarse, el máximo relativo de la curva se alcanza a la longitud de onda de 1930.5 nm donde la absorción es mínima; no obstante debido a lo elevado de la pendiente en el entorno de dicha longitud de onda se tiene un pico muy estrecho, de tal forma que es difícil y muy costoso desde el punto de vista del control mantener esta frecuencia

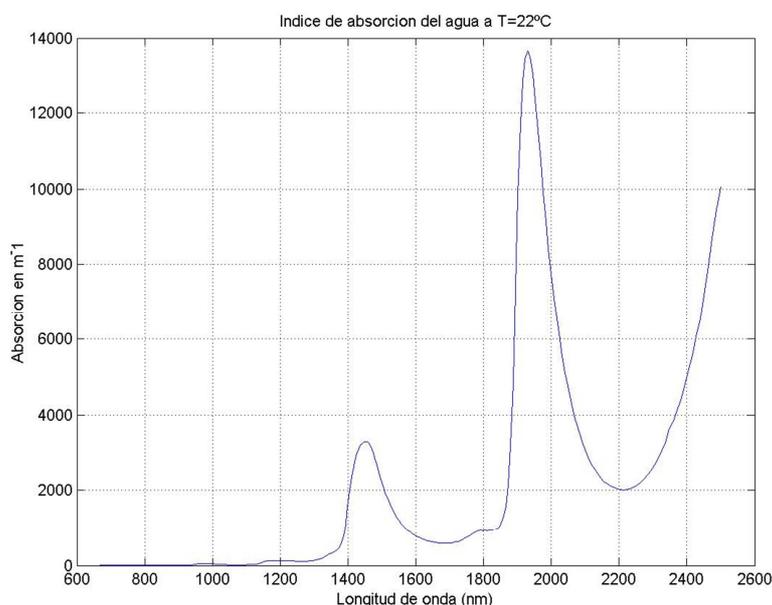
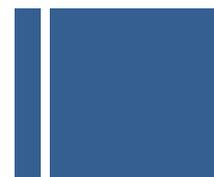


Figura 46. Absorción de la radiación electromagnética por parte del agua en espectro infrarrojo.

Es por ello que se opta como posible solución para calentar la muestra el uso de dispositivo láser a frecuencia infrarroja de 1455 nm.

- **Utilización de láser en el espectro visible:** evidentemente si bien el uso de un láser de radiación infrarroja es una solución plausible el uso de dispositivos láser que operan en el espectro visible resulta una opción notablemente más simple y económica. Si bien su uso directo sobre la muestra no es factible debido a lo reducido del coeficiente de absorción de agua en esta banda es posible lograrlo principalmente de dos formas:
 - Utilizaremos un dispositivo láser que emita en el espectro de la luz visible. Por ejemplo se ha utilizado para los diferentes experimentos un láser de luz verde. Con objeto de aumentar la absorción de la radiación electromagnética de la muestra utilizaremos un colorante no tóxico y que no altere el comportamiento de las células a criopreservar; si utilizamos un láser verde lo ideal será utilizar un colorante rojo que permita absorber gran parte de dicha radiación y lograr un calentamiento de la muestra mucho más rápido y eficiente. Este sistema es compatible con cualquiera de las técnicas de determinación de la temperatura: uso de rodamina (puede emplearse esta misma rodamina como colorante y



seleccionar un laser de luz visible que emita en una frecuencia adecuada en el espectro visible), empleo de termopar y espectroscopía Raman.

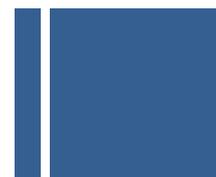
- o Si optamos por emplear como sensor de temperatura para el sistema de vitrificación mediante radiación láser un elemento termopar, que no es más que un elemento metálico (punto caliente) al que se conectan dos metales de propiedades distintas y que generan una diferencia de tensión relacionada con la temperatura, es posible utilizar este mismo elemento para lograr calentar la muestra; apuntaremos el laser de luz verde (utilizado durante las experiencias) directamente sobre el termopar, logrando un doble objetivo: por un lado al calentarse el termopar, por conducción se transferirá el calor a la muestra circundante, y por otro permitirá conocer en cada instante la temperatura a la que se encuentra la muestra tanto durante la fase de acción del láser como cuando este se apaga y tiene lugar el proceso de vitrificación. **Este sistema es el que se ha utilizado en el set-up montado con objeto de lograr la vitrificación; se utiliza para calentar la muestra un laser verde y como medio indirecto para lograr el calentamiento de la muestra, el propio termopar que se utiliza para sensar la temperatura y decidir, en virtud de una determinada ley de control, la acción a ejercer sobre el propio laser.**

5. ESQUEMA DE SISTEMA DE VITRIFICACIÓN REALIZADO

Una vez planteadas las opciones para resolver los principales problemas a que debe enfrentarse la técnica de vitrificación ultrarrápida de muestras biológicas (modeladas como agua pura desde el punto de vista matemático) mediante el uso de luz láser pasamos a describir el sistema (set-up) montado inicialmente:

- Con objeto de lograr un medio externo de muy baja temperatura (-150°C) se utilizó un recipiente de nitrógeno gaseoso a cuya salida se le acopla una unión tipo T d forma que se generan dos caminos para el gas: uno de ellos directo y otro se hace pasar mediante un serpentín a través de un recipiente conteniendo nitrógeno líquido de forma que por conducción se consigue que el nitrógeno gaseoso alcance temperaturas muy reducidas.

La clave de este sistema para conseguir de forma controlada un medio de baja temperatura se encuentra en mezclar el nitrógeno gaseosos que discurre por estos dos caminos y que se encuentran a diferentes temperaturas. Para ello en el extremo final de estos trayectos se acoplan sendas electroválvulas cuya apertura y cierre controlado por ordenador permitirá realizar la mezcla de la forma más adecuada posible. Las



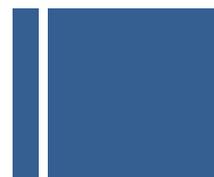
salidas de sendas electroválvulas se interconectan entre si mediante otra unión tipo T, alcanzando así la mezcla el capilar de policarbonato en el que se situará la muestra.

Con objeto de sensar en todo momento la temperatura del entorno frío se utilizará un dispositivo termopar en contacto con el nitrógeno gaseoso y conecta a una tarjeta de adquisición de datos. La diferencia de tensión que se genera con las diferentes temperaturas permitirá al sistema de control no solo conocer dicha temperatura sino actuar sobre las electroválvulas (también conectadas a la tarjeta de adquisición de datos) para mantener un perfil de temperaturas adecuada; este perfil en los instantes iniciales del funcionamiento del sistema será una línea recta decreciente hasta alcanzar la temperatura deseada de -150°C .

- La muestra biológica a criopreservar se instala en un capilar de policarbonato (presenta una adecuada transferencia de calor) y será sometida exteriormente a la acción por conducción del nitrógeno gaseoso. La transferencia se realizará por conducción y no por convección ya que si bien esta última es mucho más eficiente, resulta más difícil de controlar.
- El elemento fundamental de la técnica de vitrificación ultrarrápida propuesta es sin duda el elemento láser. Se utiliza, por su mayor economía y facilidad de control un láser de luz visible de color verde. Este láser se apuntará directamente a un segundo termopar instalado en el interior del capilar en contacto con la muestra a criopreservar de forma que será este sensor quien directamente reciba la acción del láser y por conducción se la traslade al resto de la muestra; de esta forma evitamos la necesidad de utilizar ningún tipo de colorante y logramos calentar la muestra de forma muy eficiente.

El guiado de la luz láser desde el dispositivo hasta la muestra se realizará empleando uno de los canales de un microscopio permitiendo gracias a su objetivo focalizar la radiación sobre las células.

El termopar utilizado indirectamente para calentar la muestra se encuentra conectado a una tarjeta de adquisición de datos que permitirá al sistema de control conocer en todo momento la temperatura de la muestra de tal forma que de acuerdo a una determinada ley de control se pueda actuar sobre el láser y lograr que se siga una determinada referencia (temperatura de 37°C).



6. CONCLUSIONES

El objeto principal de este proyecto ha sido desarrollar tanto desde el punto de vista matemático como de su implementación práctica, un sistema que permita la vitrificación de pequeñas muestras celulares con una velocidad suficientemente elevada como para evitar la formación de hielo intracelular y extracelular sin necesidad de emplear cantidades relevantes de sustancias crioprotectoras que pudieran resultar tóxicas.

El sistema que se ha propuesto se basa en el uso de radiación láser para calentar la muestra en combinación con la acción de nitrógeno gaseoso sobre un capilar de policarbonato que proporciona un entorno con una temperatura muy baja (entorno a -150°C) de tal forma que anulando en un momento determinado el efecto del láser la muestra quede sometida a un fenómeno de conducción que transporte el calor hacia zonas más frías, con una velocidad de enfriamiento notablemente elevada. Se ha comprobado tanto teórica como experimentalmente que pueden alcanzarse tasas de enfriamiento en torno a 10^6 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$, en función del tamaño de la muestra.

El interés por desarrollar este sistema radicaba, en su origen en explorar un posible camino que permitiese la criopreservación de óvulos humanos, algo que hasta hace pocos años era tarea harto imposible. Si bien esta técnica que aquí se propone resulta viable, el devenir del tiempo ha permitido el desarrollo de técnicas basadas en el uso de combinaciones apropiadas de sustancias crioprotectoras, que sin ser tóxicas para dichas células (especialmente sensibles a la presencia de tales sustancias), evitan la formación de hielo durante el proceso de inmersión directa en nitrógeno líquido, de tal forma que se logra el objetivo deseado con rapidez y de modo económico, sin necesidad de someter a las células a radiación electromagnética. Es por tanto que esta técnica aquí propuesta no será viable comercialmente, aunque pudiera tener aplicación en algún campo.

El sistema implementado utiliza, tal y como se ha comentado anteriormente, termopares para llevar a cabo las mediciones de temperatura y a partir de ellas decidir la acción a realizar sobre el dispositivo láser. Como posible mejora a dicho sistema se propone sustituir tales sensores por un espectrógrafo Raman, que permita medir los picos característicos del espectro (con ayuda de una cámara CCD) y de esta forma estimar la temperatura. Esta técnica propuesta permitirá implementar el sistema de vitrificación sin necesidad de utilizar termopares, de una forma fiable pero también permitirá, sin alterar la muestra durante el proceso de medida obtener una calorimetría de la célula que puede proporcionar mucha información acerca de los procesos que tienen lugar en la misma.



Figura 47. Imagen de un óvulo humano. Lograr su criopreservación fue un reto durante varios años. El presente trabajo explora uno d los posibles caminos para lograrlo aunque no la más implementable actualmente, gracias al desarrollo de técnicas más sencillas basadas en la utilización de adecuadas combinaciones de crioprotectores.

En los apéndices II y III se adjunta la memoria de propuesta de proyecto de investigación que se elaboró con objeto de solicitar fondos para el desarrollo del sistema aquí mencionado. En dicha memoria se recogen las experiencias realizadas en este sentido, los modelos matemáticos de comportamiento de la célula, (tanto bidimensionales como tridimensionales) así como las ventajas que supone el aprovechamiento de la forma del espectro Raman del agua para la obtención de la temperatura de la muestra. La investigación que se proponía así como los resultados y modelos matemáticos aportados fue considerada por la dirección del Instituto de Salud Carlos III suficientemente interesante y prometedora como para que fueran concedidos los fondos correspondientes, en el ámbito de la investigación biomédica.