

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

PI052815

<b>TITULO:</b> Sistema de enfriamiento ultrarrápido basado en la aplicación de radiación láser y espectrofotometría Raman del agua para criopreservación celular mediante vitrificación.	
<b>Investigador principal:</b> Ramón Risco Delgado	
<b>DURACIÓN:</b> 1 año <input type="checkbox"/> 2 años <input checked="" type="checkbox"/> 3 años <input type="checkbox"/>	
<b>RESUMEN (Objetivos y metodología del proyecto):</b> (Máximo 250 palabras)	
<p>Objetivo: Existen tipos celulares que no pueden ser criopreservados con facilidad mediante las técnicas convencionales, como por ejemplo los oocitos humanos, ciertas líneas tumorales, etc. La vitrificación (muy altas velocidades de enfriamiento) parece ser la única alternativa. Sin embargo, la alta concentración de crioprotector necesaria para vitrificar resulta frecuentemente tóxica. Con el presente proyecto se pretende alcanzar velocidades de enfriamiento del orden del millón de grados por segundo. Esta velocidad de enfriamiento es muy superior a la convencional mediante inmersión en nitrógeno líquido (varios miles de grados por segundo), y suficiente para vitrificar incluso agua pura.</p> <p>Metodología: En una primera etapa, la radiación láser infrarroja focalizada sobre una célula o un conjunto de células mediante el objetivo del microscopio consigue mantener la temperatura de esta permanentemente a 37° C, aun cuando todo medio extracelular se va enfriando hasta alcanzar -150° C. Llegados a este punto, en la segunda etapa el láser se desconecta súbitamente y la célula vitrifica. El control permanente de la temperatura de la célula durante la primera etapa se realiza utilizando la forma del espectro Raman del agua. La relación de intensidades entre sus dos picos depende de la temperatura de esta, de modo que la potencia del láser infrarrojo viene controlada por la forma de la señal Raman. Intentos previos del control mediante la fluorescencia de la rodamina B (pigmento fluorescente dependiente de la temperatura) no son viables debido a la eyección del soluto cuando aparece hielo, perdiéndose el control por la pérdida de la calibración de la intensidad de la fluorescencia con la temperatura. La espectrofotometría Raman evita este handicap.</p>	
<b>TITLE:</b> Ultra-fast laser cooling technique based on laser radiation and Raman spectrophotometry of water for cell cryopreservation by vitrification.	
<b>SUMMARY (Objectives and methodology):</b>	
<p>Objectives: Many cellular types that cannot be cryopreserved by means of conventional techniques: human oocytes and certain tumoral lines are two examples. Vitrification (very high cooling rates) seems to be the only possibility for them. However, the high concentration of cryoprotectant needed to vitrify is frequently toxic. With the present project we will reach cooling rates of the order of the million of degrees per second. This cooling rate is very superior to the conventional one by plunging into liquid nitrogen (several thousands of grades per second), and enough to vitrify even pure water.</p> <p>Methodology: In a first step, the infrared laser radiation is focalized on a single cell or a group of cells by means of the objective of the microscope. This allows to keep its temperature permanently at 37° C, even when all extracellular media goes cooling down until reaching -150° C. When this situation is reached, in the second step the laser is suddenly disconnected and the cell vitrifies. The control of the temperature of the cell during the first step is carried out using the form of the Raman spectrum of the water. The relationship of intensities of its two picks depends on the temperature of the water; so the power of the infrared laser is controlled by the form of the Raman signal. Previous attempts to the control this temperature by means of the fluorescence of the rhodamine B (fluorescent dye temperature-dependent) has shown not viable due to the ejection of the solute when ice appears, getting lost the calibration of the intensity of the fluorescence with the temperature and therefore the control of the temperature. The Raman spectrophotometry will overcome this trouble.</p>	

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

PI052815

**Investigador principal:** Ramón Risco Delgado

Antecedentes y estado actual del tema (Citar las referencias incluidas en el apartado siguiente)  
(Máximo 3 páginas)

La criopreservación de material biológico en general y de células aisladas en particular es una imperiosa necesidad de la biotecnología moderna. Existen dos procedimientos para tal fin:

I) “Low cooling rate”, con bajas concentraciones de crioprotector y control-optimización de la (baja) velocidad de enfriamiento, y

II) “Vitrification”, con altas concentraciones de crioprotector y muy altas velocidades de enfriamiento.

En la técnica “Low cooling rate”, la célula sufre una importante deshidratación, consecuencia de la cual, entre otras causas, hace que este procedimiento no sea siempre aplicable. En estos casos, la vitrificación se impone como la única alternativa. La superioridad de la vitrificación reside básicamente en la ausencia (o importante reducción) de la necesidad de deshidratación, conservando por lo tanto al máximo la estructura celular o del tejido.

Sin embargo, la vitrificación tampoco esta ausente de problemas, todos ellos provenientes de las altas concentraciones de crioprotector (que juega el papel de agente vitrificante) necesarias. Estas concentraciones de crioprotector pueden ser reducidas sensiblemente, o incluso la necesidad misma de crioprotector puede ser eliminada por completo, si la velocidad de enfriamiento de la muestra fuese varios órdenes de magnitud por encima de los empleados convencionalmente, y que básicamente son los alcanzados mediante una rápida inmersión en nitrógeno líquido (-196 C).

En Harvard Medical School & Massachusetts General Hospital (Center for Engineering in Medicine, Boston, USA) empezamos a implementar una novedosa técnica que contiene a la vez las ventajas de la vitrificación y las ventajas de usar bajas (no tóxicas) concentraciones de crioprotector. La técnica esta basada en la posibilidad teórica de un enfriamiento ultrarrápido de las células mediante la aplicación de radiación láser. Las ventajas que tal sistema tendría serían numerosas, y sus potenciales aplicaciones en el campo de la medicina irían desde la criopreservación de óvulos u otras células muy sensibles, hasta el posible escalamiento para su uso con grandes muestras de tejidos [1].

El proyecto se encuentra en una fase muy avanzada, tanto por el intenso trabajo teórico que otros investigadores han realizado desde 1999 en el proyecto [2], como por el trabajo experimental que el solicitante (Ramón Risco), ha realizado durante un año en dicho centro, cofinanciado por el Ministerio de Educación y por “Center for Engineering in Medicine” (Harvard Medical School).

La idea central del proyecto consiste en alcanzar una situación estacionaria en la que la célula se encuentre a 37°C mientras que todo el medio extracelular se encuentre a -150°C. Para conseguir dicha situación, la célula se deposita sobre la plataforma de un criomicroscopio y se procede al enfriamiento controlado de dicha plataforma. Sin embargo, al tiempo, la célula es calentada mediante un haz de luz láser muy focalizado por el objetivo del microscopio. Cuando la situación es la descrita anteriormente (célula a 37°C y plataforma del criomicroscopio a -150°C), el láser se desconecta, consiguiéndose una velocidad de enfriamiento de millones de grados por segundo (dado lo pequeño de la muestra caliente en relación al baño frío exterior). La principal dificultad reside en realizar un correcto control, o sea en depositar la cantidad justa de radiación sobre la célula, de modo que no sea ni tan baja como para no mantener la célula permanentemente a 37°C, ni tan alta como para producir daño por hipertermia. Como sistema sensor de la temperatura de la célula se usó rhodamina B, un pigmento fluorescente cuya intensidad de emisión es sensible a la temperatura. Un segundo haz láser a 514.5 nm se encarga de excitar la fluorescencia de la rhodamina, reemitiendo a 590 nm con una intensidad tanto mayor cuanto mas fría se encuentre la muestra. Mediante este procedimiento, el solicitante ha implementado un sistema sensor de temperatura de la célula con una precisión superior a 1°C. En la figura 3b (anexo) se puede apreciar la sensibilidad que hemos obtenido. Un fotodetector se encarga de sensar la intensidad de la fluorescencia; la señal es digitalizada y procesada por la computadora, que envía una señal de control al láser de calentamiento con la cantidad de energía que este debe depositar para mantener la temperatura de la célula siempre a 37°C. El problema principal de esta forma de realizar el control basado en la dependencia de la fluorescencia de la rhodamina con la temperatura se presenta cuando aparece hielo extracelular (figura 4c). En ese momento, la zona que no contiene cristales de hielo concentra (por eyección de la fase sólida) el soluto, en este caso la rhodamina, de forma que se pierde la referencia de la intensidad de la fluorescencia y por tanto la calibración fluorescencia/temperatura de la célula. En el presente proyecto deseamos implementar UN NUEVO SISTEMA SENSOR DE TEMPERATURA mediante espectroscopía Raman. En los apartados de esta memoria: Hipótesis, Objetivos y Metodología se explica en detalle esta variante.

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

Partes del proyecto desarrolladas hasta ahora: 1. Construcción de un criomicroscopio especial que evitase el uso de materiales fotosensibles. 2. Calibración de la fluorescencia de rhodamina con la temperatura mediante lector de placas. 3. Calibración de la fluorescencia de rhodamina mediante criomicroscopio. 4. Vitrificación de agua mediante enfriamiento ultrarrápido con láser. 5. Vitrificación de solución con agente vitrificante mediante enfriamiento ultrarrápido con láser. 6. Vitrificación de fibroblastos (3T3-S4).

1. El criomicroscopio se diseñó y se construyó con el estricto requisito de no-absorción de la luz láser. Los criomicroscopios comerciales controlan la temperatura mediante un portaobjetos recubierto con "Tin Oxide" conductor de la corriente eléctrica (700 ohms/cm aprox.), y produciendo calentamiento por efecto Joule. En nuestro caso, el portaobjetos está constituido por un capilar, en el que se deposita la muestra y en el que se introduce un microsensado de temperatura basado en un termopar tipo T cuya señal es acondicionada mediante el amplificador operacional OP741. Dicho capilar es de borosilicato transparente de sección rectangular, lo que permite el análisis de la muestra bajo el microscopio. Este capilar va inmerso dentro de una cámara por la que circula nitrógeno gaseoso en régimen turbulento a la temperatura deseada, entre 40 C y -150 C. Mediante el sensor de temperatura se cierra el bucle de control, siguiendo el enfriamiento de la muestra en el criomicroscopio el protocolo establecido en la computadora que realiza el control sobre las válvulas que regulan el flujo del nitrógeno frío y caliente.
2. La calibración inicial de la fluorescencia de la rhodamina con la temperatura se realizó con un lector de microplacas modificado. En uno de los pocillos fue introducido un termopar y así se pudo establecer la dependencia de la fluorescencia de la rhodamina con la temperatura y la concentración de la misma. La curva de calibración se muestra en la figura 3a.
3. Seguidamente se realizó la calibración de la rhodamina con el criomicroscopio, cuyo detalle se ha resumido en el punto 1. Para ello el microscopio fue dotado de un sensible fotodetector capaz de recoger las variaciones en la intensidad de la fluorescencia de la rhodamina cuando la temperatura varía un grado centígrado. La sensibilidad del sistema se muestra en la figura 3b.
4. Con este sistema de control se abordó la vitrificación de agua pura con rhodamina. El papel de la rhodamina es doble: por un lado sirve de sensor de la temperatura de la muestra. Por otro, permite el calentamiento de la muestra, ya que solamente se usa un láser a 514.5 nm y esta longitud de onda es poco absorbida por el agua. En el agua pura es difícil mediante procedimientos exclusivamente ópticos distinguir el estado de sólido amorfo del estado cristalino. Las imágenes que se obtuvieron (figuras 4ba y 4c) en cualquier caso apuntan a que, si no se alcanzó el estado amorfo, con seguridad sí que al menos se llegó a una estructura muy distinta y posiblemente consistente en microcristales (con frecuencia inocuos en la criopreservación de muestras biológicas).
5. La adición de 10% de glicerol permitió asegurar la obtención del estado vítreo tras el protocolo de enfriamiento ultrarrápido. Para ello una vez que se desconectó el láser, se observó una zona transparente (estado vítreo) rodeada de una zona opaca (zona cristalina). La transparencia es una garantía, casi indiscutible, de la existencia del estado amorfo. Para mayor garantía, sin embargo, se observó el comportamiento de la muestra tras el recalentamiento. Así, la muestra se tornó súbitamente opaca toda ella, evidencia del proceso de desvitrificación (ver figuras 5a-c).
6. Por último se aplicó la técnica a la vitrificación de fibroblastos (3T3-S4). En la figura se puede observar la morfología de los fibroblastos que han seguido el protocolo de enfriamiento ultrarrápido (figura 6a), comparada con la morfología de los fibroblastos que han seguido el protocolo de enfriamiento impuesto por el criomicroscopio (figura 6b). En desarrollos posteriores de este proyecto se harán determinaciones (no sólo morfológicas) de la viabilidad de estos fibroblastos, posiblemente con Calcein-AM

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

PI052815

**Investigador principal:** Ramón Risco Delgado

Bibliografía más relevante

(Máximo 1 página)

Bibliografía:

- [1] Ramon Risco and Jorge Aguilar. "Microwaves and vascular perfusion: getting very fast organ cooling rates". CRYO2004-Beijing, July 15-19, 2004. 41th Meeting of the Society for Cryobiology.
- [2] Alex Fowler and Mehmet Toner. "Cryopreservation of cells using ultra-rapid freezing", HTD-Vol355/Bed – Vol 37, Advances in Heat and Mass Transfer in Biotechnology, ASME 1997.
- [3] Alex Fowler and Mehmet Toner. "Prevention of Hemolysis in rapid frozen erythrocytes by using a laser pulse" Annals of the New York Academy of Sciences 858:245-252 (1998). New York Academy of Sciences.
- [4] Dubravko Risovic and Kresimir Furic, "Comparison of Raman spectroscopic methods for the determination of supercooled and liquid water temperature", J. Raman Spectrosc (2005)
- [5] Elkin Lucena, Diana Patricia Bernal, Carolina Lucena, Alejandro Rojas, Sandra Mojica, Ángela María Sao, Zulma Suárez, Abby Morán, "Primera gestación lograda a partir de óvulos vitrificados", Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología Vol 55 No. 3 (2004)

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

PI052815

**Investigador principal:** Ramón Risco Delgado

### Hipótesis

Las hipótesis de partida que justifican el proyecto a realizar serían las que se consideran a continuación:

- El espectro Raman de la luz dispersada (scattering) por una muestra que ha sido irradiada con luz láser (radiación monocromática y coherente) tiene unas características que dependen de la temperatura de la muestra. En particular, en el caso del agua se distinguen dos picos de emisión en longitudes de onda de 577.6 nm y 589.4 nm. Midiendo la relación de intensidad entre estos dos picos espectrales (relacionados con la concentración de moléculas de agua enlazadas con puente de hidrógeno, y no enlazadas) encontramos una sencilla relación con la temperatura ( $\ln(S_m I_p / S_p I_m) = (H_0 / RT) + RSo$ ). Mediante un espectrofotómetro digital focalizado mediante el objetivo del criomicroscopio obtendremos el espectro Raman de células y desarrollaremos un método no invasivo para determinar su temperatura, tanto en un instante concreto como su evolución en el tiempo.
- Si mantenemos una célula o conjunto de células, mediante un sistema de control que combine el uso de un laser para calentarlas y una criostage enfriarlas, mantendremos la temperatura de la célula entre 4°C y 20 °C: el medio extracelular alcanzará, sin embargo, -196°C. Si seguidamente desconectamos súbitamente el laser de calentamiento, la célula se verá sometida casi instantáneamente a una temperatura muy baja, de forma que no dará tiempo a la formación del hielo intracelular sino que se producirá la vitrificación de esta, evitando así un problema especilamente grave a la hora de llevar a cabo la criopreservación de cualquier tejido, órgano o célula.

### Objetivos

El objetivo principal que persique este proyecto es doble:

- En primer lugar se pretende poner a punto un procedimiento, basándose en las propiedades del efecto Raman, que permita determinar, sin necesidad de utilizar sustancias externas como la Rodamina, la temperatura de una célula, con cierta precisión, de forma fiable, rápida y no agresiva. Esto permitiría obtener, entre otras posibles aplicaciones, con cierta facilidad la calorimetría y termometría de una célula (algo que no se ha realizado hasta la fecha en ningún laboratorio), y de esta forma conocer el comportamiento y la reacción de la misma ante diferentes situaciones. Así pues el primer objetivo que podría alcanzarse con este desarrollo podría ser lograr un "termómetro Raman para células aisladas".
- En segundo lugar, y utilizando la información obtenida por el termómetro Raman, se lograría desarrollar una técnica de enfriamiento ultrarrápida de células evitando la formación de cristales de hielo intracelular, que es uno de los problemas principales a tener en cuenta en el campo de la criopreservación, así como eliminar la necesidad de utilizar soluciones crioprotectoras que resultan altamente tóxicas, en especial para determinados tipos de células de enorme interés en criopreservación como puede ser el oocito humano, entre otras.

Ajustarse al espacio disponible

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

PI052815

**Investigador principal:** Ramón Risco Delgado

Metodología (Diseño, sujetos de estudio, variables, recogida y análisis de datos y limitaciones del estudio)  
(Máximo 3 páginas)

Metodología:

1. Desarrollo de sistema de medición de temperatura de una única célula: existen diferentes métodos y técnicas para llevar a cabo la operación de medición de la temperatura en diversos campos; no ocurre lo mismo a la hora de determinar la temperatura en el ámbito celular. Esto es debido a que no debemos alterar la célula mientras realizamos la medición.

En este proyecto se propone una novedosa técnica de medición de temperatura basada en las características y propiedades del espectro Raman en relación con la temperatura. Este procedimiento permitiría realizar mediciones no invasivas de la temperatura celular, información que podría emplearse en la realización de una calorimetría de la célula a estudiar. Así podríamos conocer con más detalle las reacciones térmicas de la célula en relación a diferentes situaciones. Para ello llevaremos a cabo las siguientes etapas.

A. Montaje de los sistemas requeridos: Aquí se llevaría a cabo el montaje del sistema láser en la mesa óptica, calibrando adecuadamente su potencia, posición y orientación. Mediante un sistema colimador se puede corregir el patrón de radiación del láser para adaptarlo a nuestros intereses. El láser utilizado para realizar la espectroscopía Raman puede trabajar en el visible o en el ultravioleta, donde la absorción óptica es más reducida, de forma que la interferencia con la célula será prácticamente inexistente.

Dado que el objetivo principal de la aplicación es la criopreservación de células aisladas nos vemos obligados a trabajar a escalas micrométricas de forma que hemos de emplear un microscopio, con un objetivo de A.N. 0.65 para poder focalizar correctamente la luz láser sobre la muestra a estudiar. La muestra absorberá energía electromagnética que reemitirá. En su mayor parte la luz reemitida presenta la misma longitud de onda de la radiación incidente (scattering Rayleigh), pero existe una pequeña fracción de radiación reemitida a diversas longitudes de onda diferentes de la incidente y que constituirán el espectro Raman que a nosotros nos interesa. El objetivo del microscopio nos servirá también para recoger esta radiación y guiarla hacia el fotospectrómetro, utilizando diversos filtros ópticos para eliminar componentes espectrales no deseadas (como puede ser la componente Rayleigh). La dirección de propagación de esta radiación se llevará a cabo empleando diversos sistemas ópticos (dicróicos, beam-splitters y lentes) para lograr una adecuada focalización de la luz a la entrada del fotospectrómetro.

El fotospectrómetro se encargará de descomponer la radiación luminosa en diversas componentes espectrales, mediante el uso de redes de difracción. Estas componentes espectrales incidirán sobre diferentes puntos de una cámara CCD. Con esta cámara CCD dispondremos de una información adecuada de la intensidad luminosa de cada una de las componentes espectrales, en cada uno de sus puntos. Gracias a esta información resolveremos el espectro Raman de la radiación considerada.

El espectro Raman recogido por la cámara CCD será enviada al puerto USB del ordenador. Se desarrollará pues un software que se comunique con el puerto USB del ordenador con el fin de leer la información suministrada por la cámara CCD acerca de las intensidades del espectro Raman. Mediante este software se determinarán las intensidades de los picos de interés (577.6 nm y 589.4 nm) y se estimará la temperatura de la muestra con cierta precisión.

Una vez que el sistema de medición Raman de temperatura se haya puesto a punto tendremos a nuestra disposición un sensor no invasivo que nos permitiría continuar con la realización de la segunda parte del proyecto considerado. No obstante antes de esta etapa se podrán realizar diversos experimentos de comprobación del funcionamiento del sistema:

- Calorimetría y termometría de diversos tipos celulares en distintas condiciones.
- Montaje en el mismo criomicroscopio de sistema para de determinación de viabilidad celular, mediante 'dyes' fluorescentes Calceim-AM/Ethidium.

2. Desarrollo del sistema de enfriamiento ultrarápido: Realizaremos la conexión de la cryostage al sistema de enfriamiento, que previamente habremos dispuesto a través de sus diversas entradas y salidas al sistema

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

de enfriamiento (conductos por los que circulará nitrógeno líquido de refrigeración, válvulas controladas eléctricamente, vaso Dewar conteniendo nitrógeno líquido, etc). La ventana dispone de una ventana transparente a la radiación infrarroja puesto que como método de calentamiento de la muestra se utilizará un láser con longitud de onda de 1440 nm, con el fin de aprovechar el máximo relativo que la curva de absorción del agua presenta en esta longitud de onda.

Una vez dispuesta la cryostage y conectada al sistema de enfriamiento y al láser a través del microscopio anteriormente citado (que se encargará de focalizar el rayo sobre la muestra contenida en la cryostage) empleando para ello diversos elementos ópticos, utilizaremos el termómetro Raman descrito más arriba como elemento de medición de temperatura, información esencial en el establecimiento del bucle de control del sistema.

La información acerca del espectro Raman recogida por la cámara CCD será enviada al ordenador, bien a través del puerto USB del ordenador, que será empleado para realizar diversas tareas, como controlador del sistema completo, tanto en la determinación de la temperatura a partir de la información de la cámara CCD, como en la actuación sobre la potencia del láser de calentamiento o las válvulas del sistema de enfriamiento.

Mediante el software desarrollado se determinarán las intensidades de los picos de interés (desplazamientos Raman de 577.6 nm y 589.4 nm respectivamente) a partir de la información procedente de la cámara CCD y se estimará la temperatura de la muestra. Comparando esta temperatura con la referencia que le hayamos especificado al sistema de control se encargará de generar las señales de control apropiadas.

El sistema de control escribirá los valores apropiados en los canales de salida correspondientes de la tarjeta de adquisición de datos, conectada al ordenador. De esta manera controlaremos la potencia que aplica el láser a la muestra calentando más o menos su objetivo, así como las válvulas que permiten el paso del nitrógeno gaseoso, enfriando más o menos la muestra, y logrando de esta forma estabilizar la temperatura de la muestra en unos límites tolerables para la vida celular (entre 4°C y 20°C), gracias a este mecanismo de realimentación. Mediante una cámara acoplada al microscopio podremos observar adecuadamente el comportamiento de la célula en tiempo real, al mismo tiempo que se realiza su criopreservación, pudiendo comprobar si se forma o no hielo durante el proceso, si se daña la membrana celular, etc.

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

PI052815

**Investigador principal:** Ramón Risco Delgado

Plan de trabajo (Etapas de desarrollo y distribución de tareas de todo el equipo investigador, incluyendo los proyectos en los que participe cada uno de sus integrantes y las asignaciones previstas para los becarios. Indicar también el lugar de realización del proyecto)

(Máximo 1 página)

Plan de desarrollo del proyecto:

1. Adquisición del material necesario: espectrómetro, láseres, microscopio, ordenador, etc.  
Duración: 1 mes  
Asignación de tarea: Ramón Risco Delgado y Javier Rivero Gonzalez  
Lugar: Laboratorios de la Esc. Sup. de Ingenieros (Univ. Sevilla) y grupo CryoBioTech (Junta Andaluc)
2. Comprobación del correcto funcionamiento de los elementos que configurarán al sistema.  
Duración: 1 mes  
Asignación de tarea: Ramón Risco Delgado y Javier Rivero González  
Lugar: Laboratorios de la Esc. Sup. de Ingenieros (Univ. Sevilla) y grupo CryobioTech (Junta Andaluc)
3. Montaje del termómetro Raman.  
Duración: 3 meses  
Asignación de tarea: Javier Rivero González  
Lugar: Laboratorio de la Esc. Sup. de Ingenieros (Univ. Sevilla) y grupo CryoBioTech (Junta Andaluc)
4. Desarrollo de software de comunicación con la cámara CCD para obtención del espectro Raman y determinación de la temperatura a partir de dicha información.  
Duración: 2 meses  
Asignación de tarea: Javier Rivero González  
Lugar: Laboratorios de la Esc. Sup. de Ingenieros (Univ. Sevilla) y grupo CryoBioTech (Junta Andaluc)
5. Calibrado y puesta a punto del termómetro Raman, para maximizar su precisión.  
Duración: 2 meses  
Asignación de tarea: Ramón Risco Delgado y Javier Rivero González  
Lugar: Laboratorios de la Esc. Sup. de Ingenieros (Univ. Sevilla) y grupo CryoBioTech (Junta Andaluc)
6. Realización de comprobaciones del funcionamiento del termómetro Raman con diversos experimentos.  
Duración: 3 meses  
Asignación de tarea: Ramón Risco Delgado y Javier Rivero González  
Lugar: Laboratorios de la Esc. Sup. de Ingenieros (Univ. Sevilla) y grupo CryoBioTech (Junta Andaluc)
7. Conexión con los elementos restantes para implementar el sistema de criopreservación por "ultra-fast 'laser' cooling".  
Duración: 3 meses  
Asignación de tarea: Javier Rivero González  
Lugar: Laboratorios de la Esc. Sup. de Ingenieros (Univ. Sevilla) y grupo CryoBioTech (Junta Andaluc)
8. Desarrollo del software de control del sistema.  
Duración: 2 meses  
Asignación de tarea: Javier Rivero González  
Lugar: Laboratorios de la Esc. Sup. de Ingenieros (Univ. Sevilla) y grupo CryoBioTech (Junta Andaluc)
9. Ajuste y puesta a punto del sistema de criopreservación.  
Duración: 3 meses  
Asignación de tarea: Javier Rivero González  
Lugar: Laboratorios de la Esc. Sup. de Ingenieros (Univ. Sevilla) y grupo CryoBioTech (Junta Andaluc)
10. Realización de experimentos diversos de criopreservación con el sistema anterior, empleando diferentes tipos de cultivos celulares.  
Duración: 4 meses  
Asignación de tarea: Ramón Risco Delgado y Javier Rivero González  
Lugar: Laboratorios de la Esc. Sup. de Ingenieros (Univ. Sevilla) y grupo CryoBioTech (Junta Andaluc)

**MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Expediente N°

PI052815

**Investigador principal:** Ramón Risco Delgado

Experiencia del equipo investigador sobre el tema

(Máximo 1 página)

RAMON RISCO DELGADO

**CRYOPRESERVACION:**

Responsable del grupo de Investigación de la Junta de Andalucía: CVI-289: CRYOPRESERVACIÓN DE TEJIDOS Y ORGANOS PARA TRASPLANTES. Desde 2001

Diirección de multiples proyectos en Ingenieria Superior sobre criopreservación que han dado lugar a los trabajos:

AUTORES: Jaime Saenz, Khaid El-Moussaoui, José Antonio Calvillo, Ricardo Campa, Ramon Risco

TITULO: Non-linear cooling rates and the kinetics of water loss

REVISTA: Cryobiology 32, 316 (2001)

AUTORES: Roberto Baena y Ramon Risco

TITULO: "Results of the application of an ultrasound field on the statistical properties of water freezing"

REVISTA: Cryobiology 47, 256 (2003).

AUTORES: Jaime Saenz y Ramon Risco

TITULO: "Linear and non linear cryopreservation protocols for spermatozoa: comparison of ideal and non-ideal solution models"

REVISTA: Cryobiology 47, 268 (2003)

AUTORES: Jorge Aguilar, Servando Alvarez, Jose Manuel Salmeron y Ramon Risco

TITULO: Real transient temperature and mass fields of perfused tissues and organs: a digital image and finite differences method.

REVISTA: Cryobiology 47, 286 (2003).

AUTORES: Jorge Aguilar y Ramon Risco

TITULO: Microwaves and vascular perfusion: getting very high organ cooling rates.

REVISTA: Cryobiology 49, (2004).

AUTORES: Ramon Risco

TITULO: Organ Cryopreservation

LIBRO (capitulo): Extending Lifespan, LIT Verlag Ed. (Hamburg, Germany), ISBN:3-8258-8563-1

**LASERES:**

Responsable, durante cuatro años del grupo de investigación Fundamentos de Mecánica Cuántica, de la Junta de Andalucía, (FQM-239). En el mismo ha realizado trabajos tanto teóricos como experimentales publicados en Physical Review, Eurpopean Physical Journal, Ziftschriffurnaturforschung y otras revistas internacionales de reconocido prestigio (ver curriculum) sobre APLICACIONES IMPORTANTES DE LA RADIACION LASER (ver Curriculum).

**LASERES Y CRIOPRESERVACIÓN:**

Officer: Harvard Medical Shool. Harvard Univesity (Boston, USA). Desarrolla trabajo de colaboración con "Center for Engineering in Medicine and Surgical Services", Massachusetts General Hospital. Aquí colabora en la implementación del sistema de enfriamiento ultrarrapido con laser de celulas y tejidos, donde explora la via del uso de rhodamina B como sistema sensor de la temperatura para el control durante el proceso de enfriaminto. El proyecto solicitado es muy similar, la única diferencia radica en el uso de la espectroscopia Raman en vez de la Rhodamina

**JAVIER RIVERO GONZALEZ (Becario)**

INGENIERO SUPERIOR (Escuela Superior de Ingenieros, Univ Sevilla): Proyecto de Fin de Carrera titulado: "Criopreservación celular mediante láser y espectroscopia Raman: modelo matemático y propuesta experim"

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

PI052815

**Investigador principal:** Ramón Risco Delgado

Resumen del historial científico del grupo en el seno del nodo de la red temática de investigación cooperativa, incluyendo publicaciones y proyectos derivados de la pertenencia a la red (cumplimentar **SOLO** los proyectos coordinados en el marco de las redes temáticas de investigación cooperativa)  
(Máximo 1 página)

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

**Investigador principal:** Ramón Risco Delgado

Actividades de integración y relaciones científicas cooperativas con otro nodo de la red (cumplimentar **SOLO** los proyectos coordinados en el marco de las redes temáticas de investigación cooperativa)  
(Máximo 1 página)

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

PI052815

**Investigador principal:** Ramón Risco Delgado

Utilidad práctica de los resultados en relación con la salud. Posibilidad de patentes u otros resultados explotables comercialmente

Aplicaciones prácticas:

- En primera instancia este proyecto permitiría desarrollar una técnica no invasiva de determinación de la temperatura de una única célula, dado que al basarse en el uso de la información suministrada por el espectro Raman tan sólo es necesario iluminar la muestra con una luz láser de una frecuencia en la que prácticamente no hay absorción de energía por parte de la célula. Este procedimiento permite por lo tanto, sin alterar el estado de la célula, conocer el comportamiento calorimétrico de una célula al ser sometida a diversas condiciones.

- En segundo lugar proporciona una técnica de criopreservación que solventa muchos de los posibles problemas con los que se encuentra actualmente la biomedicina a la hora de conservar diversos tipos de células como oocitos humanos, algunas líneas tumorales, etc.

1. Se elimina la necesidad de emplear sustancias anticongelantes como glicerol, DMSO, etc. para evitar la formación de hielo intracelular, sustancias que para muchas células de interés práctico resultan tóxicas. Esto ocurre, por ejemplo en el caso del oocito humano. Al no poder emplear criopreservantes nos vemos obligados a utilizar temperaturas más altas y consecuentemente disminuye el tiempo de conservación.

2. Por otra parte el proceso de descongelación o recuperación de las células resulta tremendamente simple, dado que bastaría con recalentar la muestra con el láser hasta alcanzar una temperatura óptima, sin necesidad de extraer las sustancias criopreservadoras dado que no son necesarias.

Medios disponibles para la realización del proyecto

Medios disponibles:

- Laboratorios de la Escuela Superior de Ingenieros de la Universidad de Sevilla.
- Material del grupo de investigación CrioBioTech (Campana de extracción, microscopio, estufa, fungible para cultivos celulares, calceim AM/Ethidium)
- Colaboración con centros diversos:
  - 1.-Departamento de Fisiología Médica y Biofísica (Univ. Sevilla)
  - 2.-CSIC (Bioquímica Vegetal, Sevilla): Citómetro de Flujo y Microscopio confocal
  - 3.-Harvard Medical School (Harvard University; Center for Engineering in Medicine), con quien se está colaborando en un proyecto similar, basando el control de la temperatura en la dependencia de la fluorescencia de la rodamina B con la temperatura, en vez del uso de la fotoespectrometría Raman (que se propone aquí).

Ajustarse al espacio disponible

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

PI052815

### Investigador principal:

Justificación detallada de la ayuda solicitada (Máximo 1 página)

La cuantía de la ayuda solicitada se repartiría entre las siguientes partidas que se mencionan:

#### Equipamiento

- Cryostage (FTIR600 de Linkam): sistema en el que se coloca la muestra que se desea criopreservar. Dispone de una ventana transparente que permitirá al láser calentar la muestra, así como enfriarla de forma ultrarápida utilizando un circuito de refrigeración.

- Láseres: Se requieren dos láseres, uno de ellos para lograr el calentamiento de la muestra, y otro para implementar el sistema de medición de temperatura por efecto Raman.

    Laser de Argon-ión: 488nm

    Laser infrarrojo para calentamiento: 1440nm

- Espectrofotómetro (U21830 de B3 Scientific): con el fin de obtener el espectro Raman de la muestra y a partir de ella obtener una medida fiable acerca de la temperatura. Es necesario capturar la luz irradiada por la muestra y separarla en sus componentes espectrales constitutivas. Este equipo se encarga de tales funciones, generando información vital para establecer el control del sistema.

- Microscopio y objetivos especiales para IR (Olympus): Aquí el microscopio tendrá una triple función:

- Por una parte permitirá observar que ocurre con la muestra durante toda el proceso.

- En segundo lugar permitirá focalizar la radiación de los láseres hacia la muestra.

- En tercer lugar servirá como mecanismo de captación de la luz irradiada por la muestra, que será guiada hacia el espectrómetro anteriormente referido.

- Cámara CCD (2)

-Tarjeta de adquisición de señales I/O, que se conectará al ordenador y permitirá que éste se comunique con su entorno cerrando así el bucle de control.

-Ordenador: será el centro de control del sistema, encargado de procesar la señal procedente de la cámara CCD y del fotoreceptor, con el fin de calcular la temperatura de la muestra y modificar las actuaciones sobre el láser de calentamiento y el sistema de enfriamiento y así poder establecer el control.

-Software necesario:

    - Control de cryostage (Lynksys32)

- Mesa óptica

- Dispositivos ópticos diversos:

- Dicroicos

- Filtros ópticos

- Colimadores para la luz láser

- Beamsplitters.

#### Personal

- Un becario que se encargaría de realizar el montaje del sistema, así como de la calibración de los diferentes elementos

**MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Expediente N°

PI052815

<b>Investigador principal:</b> Ramón Risco Delgado	
<b>PRESUPUESTO SOLICITADO</b>	
<b>1. Gastos de personal</b>	<b>Euros</b>
1 Becario (a tiempo completo)	1200/mes€
<b>SUBTOTAL</b>	<b>28800€</b>
<b>2. Gastos de ejecución</b>	
<b>a) Adquisición de bienes y contratación de servicios</b> (Inventariable, fungible y otros gastos)	
Cryostage (Linkam)	10900€
Láser (infrarrojo) de 1440nm.	500€
Láser de semiconductor para espectroscopia Raman de 488nm	300€
Mesa Óptica	600€
Espectrofotómetro (modelo U21830 de B3 Scientific)	3000€
Objetivos específicos transparentes a luz infrarroja (Olympus)	1000€
Ordenador (incluyendo software y tarjeta de adquisición de datos apropiada)	1320€
Software(Lynsys32)	800€
	552€
<b>SUBTOTAL</b>	<b>18972€</b>
<b>b) Viajes y dietas</b>	
<b>SUBTOTAL</b>	
<b>SUBTOTAL GASTOS EJECUCIÓN</b>	<b>47772€</b>
<b>TOTAL AYUDA SOLICITADA</b>	<b>47772€</b>

**Investigador principal:** Ramón de Jesús Risco Delgado

**MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN  
ANEXOS**

Expediente Nº | PI052815

**Modelos matemáticos**

Con anterioridad a la propuesta de este proyecto y con el objeto de disponer de un modelo adecuado que simulara el comportamiento de la evolución temporal de la temperatura en una célula sometida a un rápido enfriamiento de la misma se desarrollaron una serie de modelos de transferencia de calor. Partimos para ello de la hipótesis de que mediante un determinado sistema de control se puede lograr la estabilización la temperatura en la célula en un entorno apropiado para su desarrollo vital; para ello utilizamos la combinación de un sistema de refrigeración (cryostage) y de un sistema de calentamiento por láser. Este láser, con el fin de considerar un efecto más realista, suponemos que no calienta uniformemente toda la célula sino que induce una distribución inicial determinada en la misma, de forma que una vez apagado el láser, la temperatura en el interior de la muestra caerá con una determinada velocidad de enfriamiento. Gracias a estos modelos podemos comprobar como será la evolución de la temperatura a partir de este instante en cada punto de la muestra.

La obtención de tales modelos procede del planteamiento y posterior resolución de la ecuación de transferencia del calor, en diversas situaciones, tanto de geometría como de distribución inicial de la temperatura inducida por el láser. En nuestro caso, dada la forma del haz laser, lo más simple resulta emplear una geometría circular (bidimensional) o cilíndrica (tridimensional). Así pues la ecuación a resolver será la que se muestra a continuación:

$$\frac{\partial^2 T(r,\theta,t)}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial T(r,\theta,t)}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 T(r,\theta,t)}{\partial \theta^2} + \frac{\partial^2 T(r,\theta,t)}{\partial z^2} = \frac{1}{\alpha} \frac{\partial T(r,\theta,t)}{\partial t}$$

Tomemos en cuenta una serie de aspectos:

- La **geometría** de nuestro problema permite suponer la existencia de simetría cilíndrica luego la dependencia de la temperatura con respecto al ángulo desaparece.
- El **término  $\alpha$**  se conoce como difusividad térmica y tiene relación con la velocidad con que el calor se difunde hacia zonas más frías durante el proceso de transferencia térmica. Para nuestro modelo supondremos que este término es una constante que no depende de la temperatura. En el caso del agua, el valor que tomaremos será:  $1.48 \cdot 10^{-7} \text{ ms}^{-2}$ .

Así pues la ecuación diferencial en derivadas parciales a resolver, queda reducida a:

$$\frac{\partial^2 T(r,\theta,t)}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial T(r,\theta,t)}{\partial r} + \frac{\partial^2 T(r,\theta,t)}{\partial z^2} = \frac{1}{\alpha} \frac{\partial T(r,\theta,t)}{\partial t}$$

Como en toda ecuación en derivadas parciales será necesario imponer una serie de condiciones, que ayuden a delimitar la solución de la expresión anterior. Distinguiremos entre condiciones de contorno, relacionadas especialmente con la geometría del problema, y condiciones iniciales, relacionadas con el comportamiento temporal.

En relación con las primeras, trabajaremos especialmente con dos tipos diferentes:

- **Conducción:** podemos especificar la temperatura que tendrán los puntos de una curva o superficie a través de las condiciones de contorno conductivas. En nuestro caso serán de la forma:

$$T(r, \theta, z, t)|_{r=R_1} = T_0$$

$$T(r, \theta, z, t)|_{z=z_1} = T_1$$

- **Convección:** estas condiciones de contorno se utilizan cuando la transferencia de calor no se produce por el simple contacto de dos cuerpos con temperaturas diferentes, sino cuando el elemento encargado de extraer calor del sistema es un fluido, a una temperatura diferente, en movimiento. En nuestro caso serán de la forma:

$$-k \frac{\partial T(r, \theta, z, t)}{\partial z} \Big|_{z=z_1} + hT(r, \theta, z, t) = 0$$

donde las constantes que aparecen son:

**k:** conductividad térmica del medio.

**h:** coeficiente de convección.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para esta ecuación diferencial en diversas condiciones de contorno.

### Modelo bidimensional

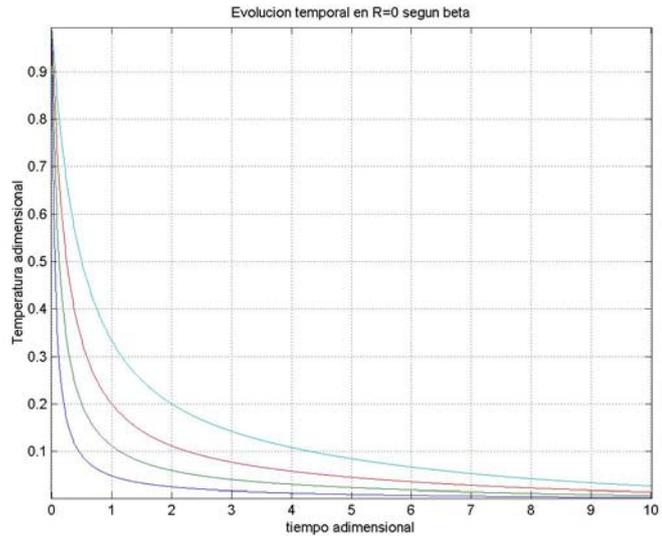
En una primera aproximación a nuestro problema se modeló la muestra contenida en la cryostage como un disco plano sometido a una serie de condiciones:

- **Condiciones de contorno:** supusimos que las condiciones de contorno en el borde de contacto entre la muestra y el resto del medio la transferencia de calor se realizaría mediante el mecanismo de conducción, de forma que al apagarse el láser y transcurrido un breve periodo de tiempo la muestra acabaría a la misma temperatura que el entorno. La tasa de enfriamiento alcanzada mediante este mecanismo es muy elevada.
- **Condiciones iniciales:** con el fin de modelar de forma realista la forma del haz láser, supusimos que la distribución inicial de la temperatura seguía un perfil determinado. Aunque se realizaron diversos modelos, sin duda el más realista es el gaussiano.

En esta situación la ecuación diferencial a resolver resulta un tanto más simple, dado que estamos utilizando un modelo bidimensional. Esto es, se supone que la distribución de temperatura no depende de la componente z.

$$\frac{\partial^2 T(r, \theta, t)}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial T(r, \theta, t)}{\partial r} = \frac{1}{\alpha} \frac{\partial T(r, \theta, t)}{\partial t}$$

Así pues resolviendo la ecuación de transferencia de calor en coordenadas polares, sometidas a una condición de contorno conductiva en el borde del disco y modelando la distribución inicial de temperatura en el interior como gaussiana, la evolución de la temperatura con el tiempo una vez que se produce el apagado del láser generan las curvas que se indican a continuación. Dada la simetría angular del problema planteado basta con estudiar el comportamiento en una dirección determinada. Además se comprueba como ajustando la gaussiana podemos obtener unas variaciones más o menos rápidas en la pendiente (tasa de enfriamiento), del orden de  $10^6$  °C/s



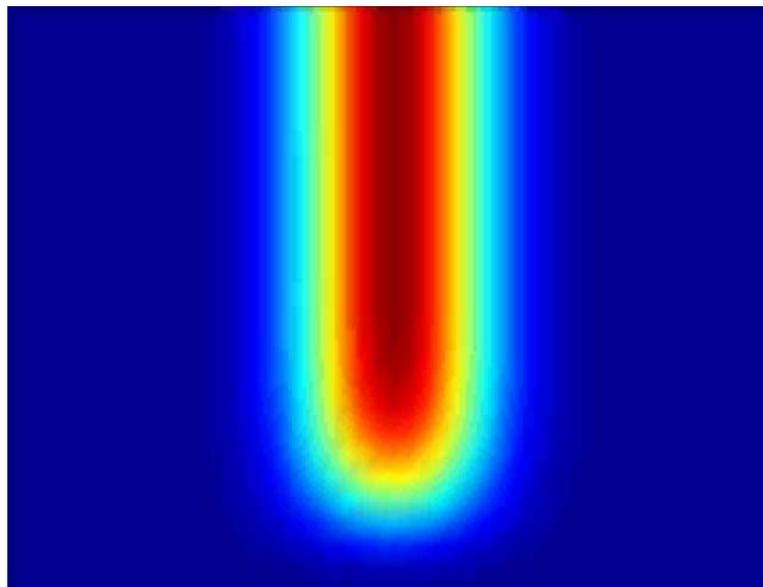
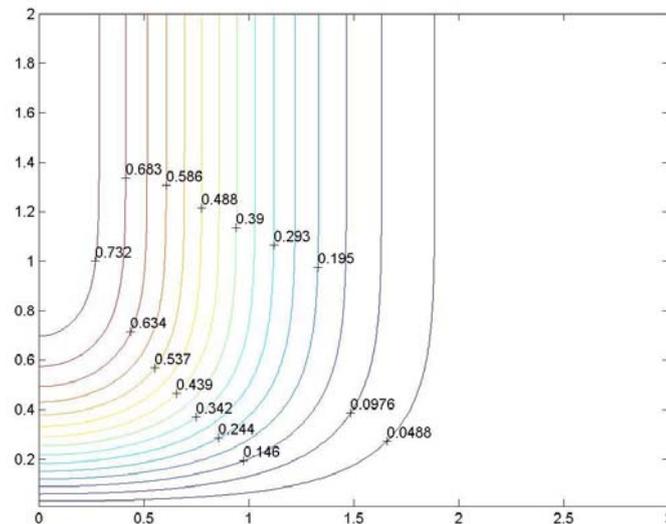
## Modelo tridimensional

Una vez desarrollada una primera aproximación al problema, mediante modelos bidimensionales, optamos por modelar la muestra a estudiar mediante un cilindro finito, sometido a una serie de condiciones de contorno y una distribución inicial de temperaturas determinada.

En la práctica podemos plantear dos posibles situaciones:

- Utilizar como soporte de la muestra a criopreservar una cryostage en la que el enfriamiento de la muestra se realice únicamente por la superficie inferior de la misma. En esta situación la parte superior de la muestra queda al aire, con lo que se puede suponer que la transferencia de calor a través de esta superficie es prácticamente despreciable; esto permite modelarla como adiabática. La resolución de la ecuación diferencial en derivadas parciales, en coordenadas cilíndricas, para el caso tridimensional y asumiendo el comportamiento adiabático de la superficie superior de la muestra, nos permite conocer cómo es la evolución de la temperatura en la muestra una vez que el láser se apaga.

En la gráfica puede verse un ejemplo de distribución de temperaturas en un instante dado según un corte r-z del cilindro (dada simetría cilíndrica del problema, basta con conocer que ocurre en una dirección cualquiera), en este caso para unas condiciones conductivas en la base (En todas las gráficas siguientes: eje OX: dirección radial; eje OY: dirección del laser; curvas con temperatura adimensionalizada):

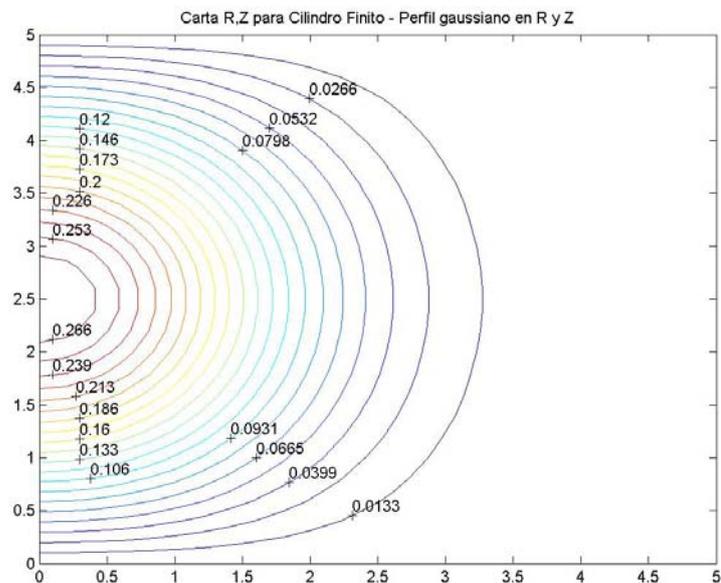


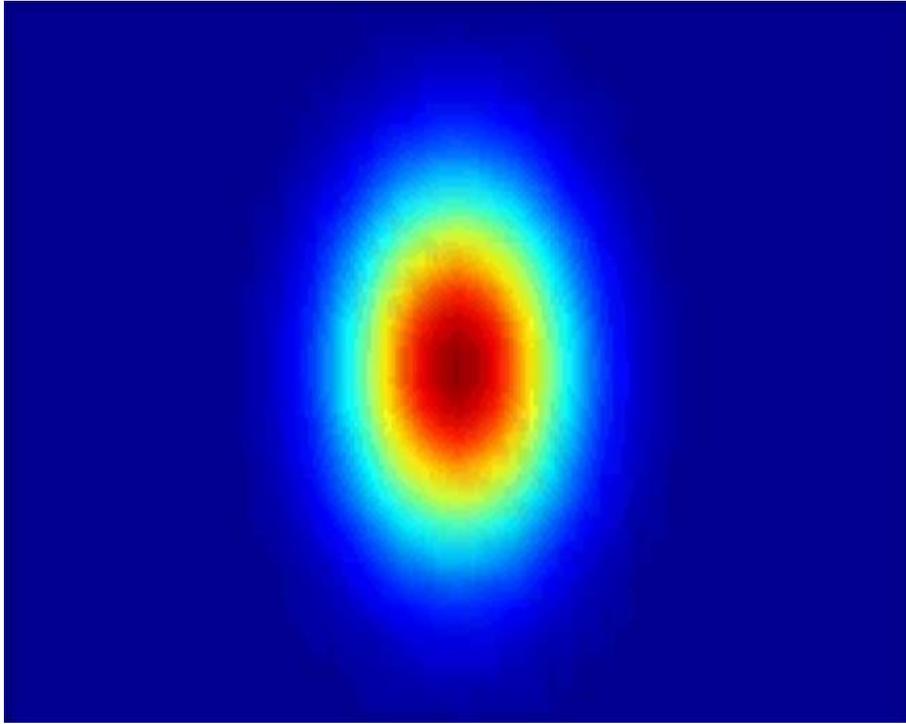
- Utilizar como soporte para contener la muestra una cryostage en la que el enfriamiento por nitrógeno gaseoso se produzca tanto por la superficie inferior de la muestra como por la parte superior. Este tipo de cryostage, de más reciente aparición será el que se utilice en la implementación del sistema de criopreservación anteriormente propuesto. Extraer el calor contenido en la muestra por ambas caras hace que el enfriamiento sea aún más rápido, permitiendo una mayor velocidad de enfriamiento respecto al esquema anterior. Evidentemente el montaje será algo más complejo. La resolución de la ecuación de transferencia del calor, supuesto que el enfriamiento de la muestra se realice por las dos caras del cilindro, imponiendo tanto condiciones de contorno conductivas (la pérdida de calor se produce por el contacto de dos cuerpos con temperaturas distintas) como convectivas (en éste caso se tiene en cuenta la influencia del movimiento del gas en la extracción de calor de la muestra considerada) y teniendo en consideración cómo era la distribución de temperaturas en el interior de la misma justo antes de apagar el láser (suponemos generalmente distribución gaussiana), nos permiten conocer la distribución de la temperatura a partir de ese instante, pudiendo estimar la rapidez de enfriamiento de la muestra, siendo esta muy superior a los valores obtenidos por otros procedimientos. El desarrollo matemático del problema condujo a una solución de la forma:

$$\overline{T(R, Z, \tau)} = \left( \sum_{m=1}^{\infty} A_m e^{-\beta_m^2 \tau} J_0(\beta_m R) \right) \left( \sum_{n=1}^{\infty} Q_n e^{-\eta_n^2 \tau} \text{sen}(\eta_n Z) \right)$$

donde  $A_m$  y  $Q_n$  son coeficientes conocidos.

En la gráfica siguiente puede verse un ejemplo de distribución de temperaturas en un instante dado según un corte r-z del cilindro en este caso para unas condiciones conductivas en las bases, calculado mediante la expresión anterior:

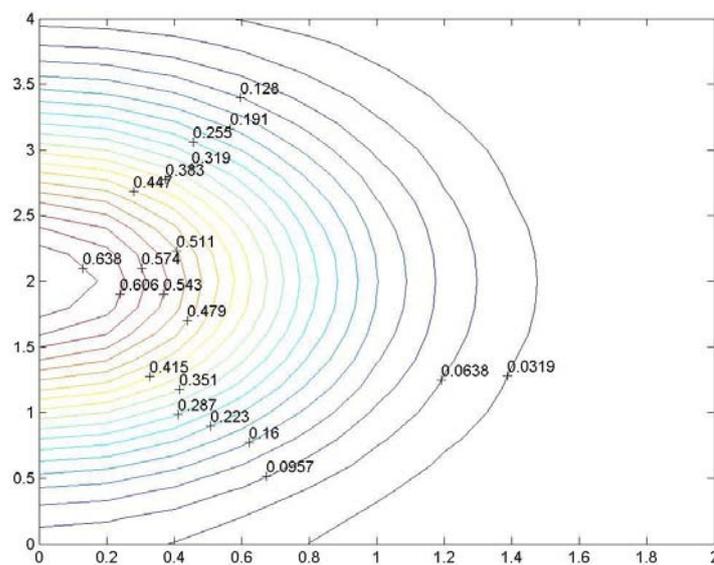


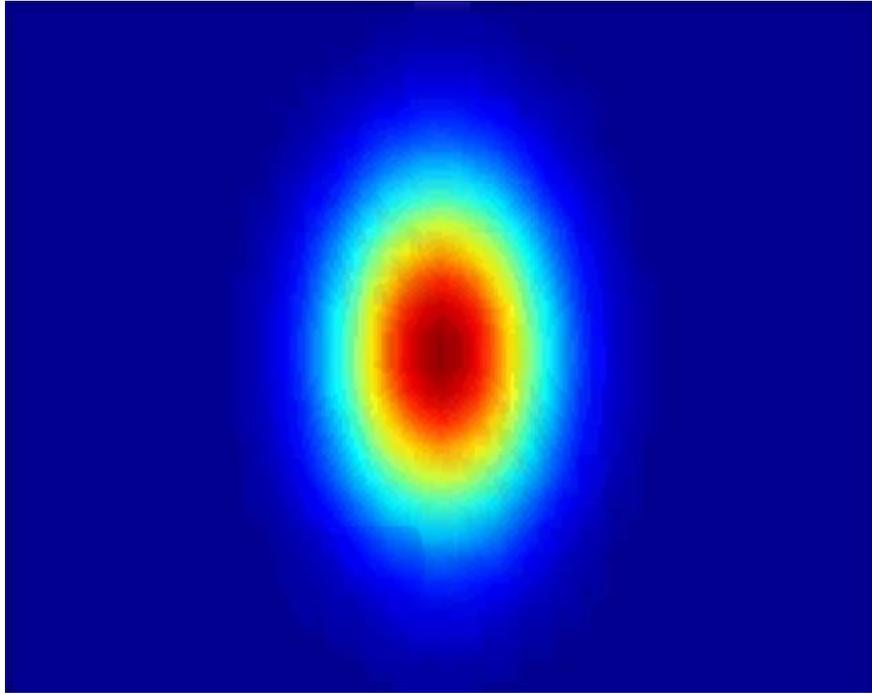


La ecuación normalizada de evolución temporal de la temperatura en la muestra considerada en el caso de que las condiciones de contorno en las tapas del cilindro sean e tipo convectivo conducen a una expresión algo más compleja, pero con una estructura similar

$$\overline{T(R, Z, \tau)} = \left( \sum_{m=1}^{\infty} A_m e^{-\beta_m^2 \tau} J_0(\beta_m R) \right) \left( \sum_{n=1}^{\infty} Q_n e^{-\eta_n^2 \tau} \frac{\eta_n \cos(\eta_n Z) + H_1 \text{sen}(\eta_n Z)}{(\eta_n^2 + H_1^2) \left( c + \frac{H_2}{\eta_n^2 + H_2^2} \right) + H_1} \right)$$

También se muestra a continuación el ejemplo de una muestra sometida a condiciones convectivas en ambas caras, supuesta una distribución inicial de temperaturas, en un instante determinado después de apagar el láser.





Gracias a estos modelos desarrollados, es posible evaluar entre otras cosas dos parámetros de especial importancia para el problema que se nos plantea:

1. Potencia necesaria que debe tener el láser.
2. Velocidad de enfriamiento de la muestra en cuestión.

En la actualidad se desarrollan modelos más complejos que incorporen nuevas variables al problema, como son la presencia del cristal de soporte de la muestra, etc.

**FIGURAS:**

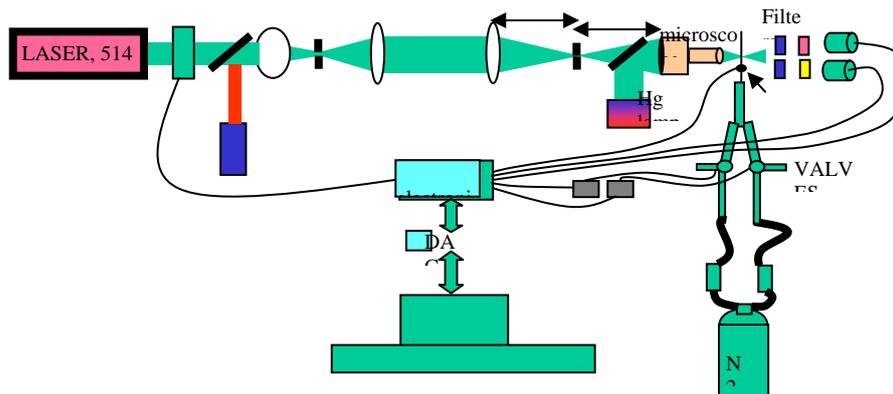


Fig. 1 Esquema del montaje experimental

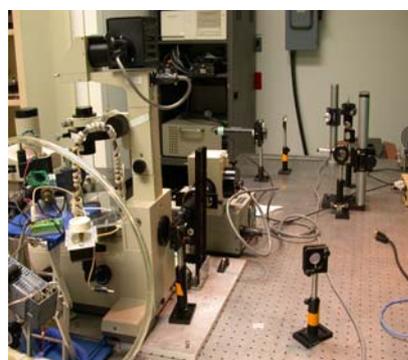
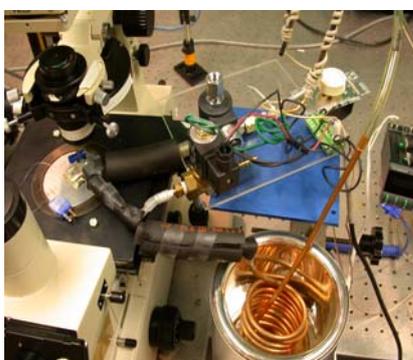


Figura 2 a (izquierda): Detalle de criomicroscopio. Se observa vaso Dewar para circuito refrigerante y resistencia para circuito calefactor. También se observa plataforma de criomicroscopio con cámara para inserción de capilar y termopar de control. En el centro se aprecian las dos válvulas de tres vías sobre las que actúa el software.

Figura 2 b (derecha): Vista parcial de sistema óptico, con telescopio (al fondo), y puerto de entrada en microscopio invertido.

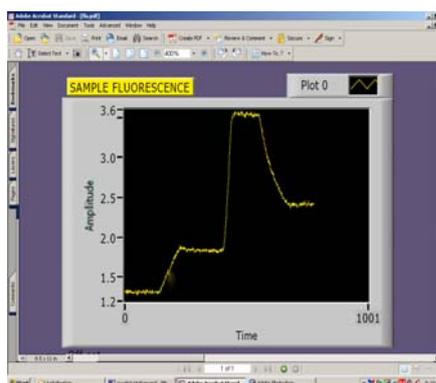
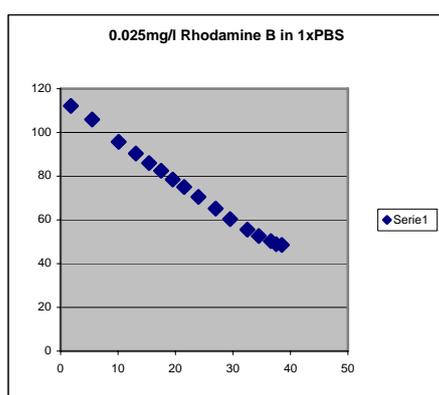


Figura 3a (izquierda). Curva de calibración de la fluorescencia de la rhodamina en función de la temperatura mediante lector de microplacas. En el eje vertical se representa la intensidad de la fluorescencia (pWatts) y en el eje horizontal se representa la temperatura en grados Celsius.

Figura 3b (derecha). Curva de calibración de la fluorescencia de la rhodamina en función de la temperatura mediante el criomicroscopio. La primera línea horizontal es la fluorescencia a 4 C para 0.2 miliwattios de excitación. La segunda línea horizontal es a 37 C, también para 0.2 miliwattios. La tercera línea horizontal es a 37 C para 0.6 miliwattios y la cuarta es a 4 C, también para 0.6 miliwattios.

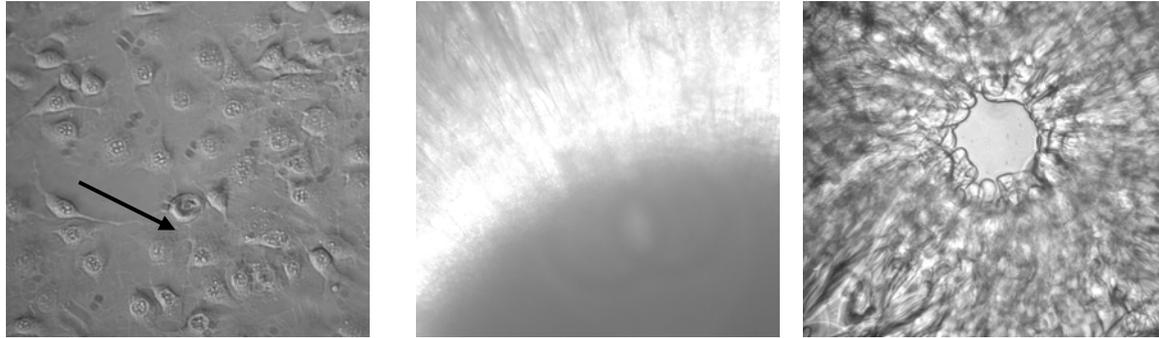


Figura 4. (izquierda) Capacidad de focalización del sistema láser-criomicroscopio implementado. Cultivo de fibroblastos en el que se ha seleccionado una célula concreta (flecha) y se ha sometido a un pulso láser de 10 miliwattios durante 5 segundos. Se observa como el fibroblasto queda destruido sin producirse daño aparente en ninguna de las células vecinas.

Figura 4b<sup>a</sup> (centro). Agua pura con rhodamina (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.

Figura 4c (derecha). Tras el recalentamiento de la sección descrita en la imagen anterior lo que se obtiene es siempre un patrón como el mostrado en esta figura. Se observa cómo la transición sólido-líquido comienza siempre en la zona tratada, algo que está de acuerdo con el hecho de que esta zona sea un sólido amorfo o microcristales de hielo.

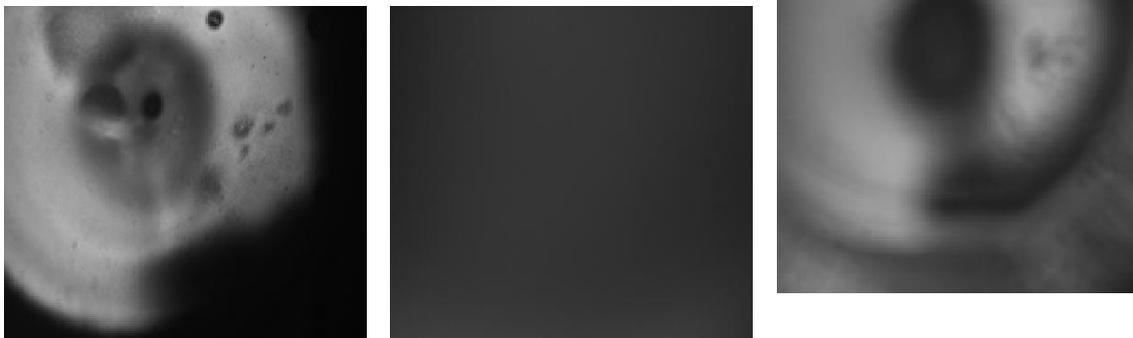


Figura 5a (izquierda). Solución (10% glicerol) tratada con el procedimiento de enfriamiento ultrarrápido con láser. Cuando la temperatura del criomicroscopio alcanzó  $-90$  C, el láser de calentamiento fue desconectado. En la figura se observa cómo las burbujas quedan atrapadas en lo que parece un claro estado vítreo. La temperatura se siguió descendiendo hasta  $-130$  C y la imagen permaneció idéntica. La zona oscura que rodea la zona tratada muestra denota la presencia de hielo.

Figura 5b (centro). Tras el recalentamiento la imagen se torna súbitamente opaca en cierto instante. Esto denota la formación de cristales de hielo (devitrificación o recristalización).

Figura 5c (derecha) Si se continua subiendo la temperatura la muestra comienza a licuarse. Dicho proceso comienza allá donde los cristales eran más pequeños, y esto ocurre en la zona que había sido vitrificada inicialmente. Por ello esta zona retoma en primer término el aspecto transparente.

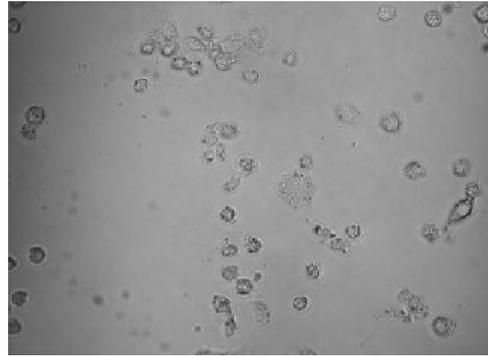
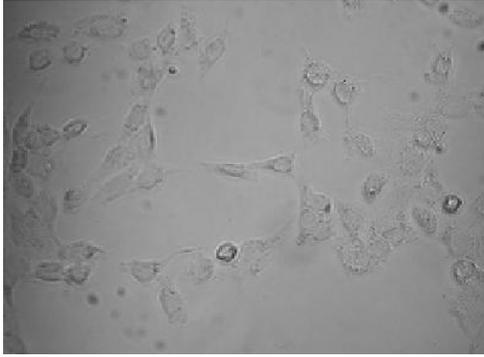


Figura 6a (izquierda). Cultivo de fibroblastos tratados con la técnica anterior ( $1.000.000^{\circ}\text{C}/\text{segundo}$ ). Los fibroblastos son, al menos morfológicamente, normales. Los fibroblastos han sido incubados previamente en 10% DMSO.

Figura 6b (derecha). Mismo experimentos que en la figura 7<sup>a</sup>, pero ahora la imagen es de la zona del capilar que no fue calentada con el láser y que siguió el perfil de enfriamiento impuesto por el criomicroscopio ( $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ ). La morfología es totalmente distinta al caso anterior y el aspecto denota la muerte de estas células.