

Principios básicos de Criobiología

Dra Irene Boiso.

Servicio de Medicina de la Reproducción. Departamento de Obstetricia y Ginecología.
Institut Dexeus. Barcelona.

INTRODUCCIÓN

El objetivo esencial de la criopreservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular. La supervivencia celular a la congelación es el producto de numerosos factores que interaccionan entre sí.

EVENTOS QUE TIENEN LUGAR DURANTE EL ENFRIAMIENTO

La criopreservación de material biológico tiene lugar usualmente en una solución acuosa, con diferentes solutos presentes. Las propiedades fisico-químicas que rigen los eventos a los cuales está sometida la solución durante la congelación derivan de la concentración de solutos disueltos en ella. El punto de congelación de la solución es inversamente proporcional a la concentración de solutos presentes (Vila, 1984).

Cuando una suspensión celular es enfriada y alcanza temperaturas entre -5 y -10°C se forman núcleos de hielo distribuidos aleatoriamente en el medio extracelular que darán lugar a regiones en fase cristalina. El hielo en el espacio extracelular coexiste con el agua líquida intracelular gracias a la membrana plasmática que constituye la barrera que detiene el crecimiento cristalino dentro de la célula (Vila y García, 1983).

Cuando en el medio extracelular ocurre la cristalización se forma hielo puro, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida, a medida que el cambio de fase progresa. De manera que las células en suspensión deben deshidratarse para mantener el equilibrio osmótico con un medio extracelular cada vez más hipertónico.

En un proceso programado de enfriamiento, a medida que el sistema de refrigeración extrae calor la temperatura baja hasta que alcanzado el punto eutéctico, la fase líquida remanente y los solutos solidifican (Vila y Carretero, 1985). El punto eutéctico refleja la máxima concentración de solutos que puede alcanzarse justo antes de que agua y solutos solidifiquen conjuntamente (Grossmann y Santaló, 1991).

Se denomina sobreenfriamiento a un estado metaestable, en el que la suspensión celular enfriada lentamente alcanza temperaturas por debajo de su punto de cristalización manteniéndose sin embargo en estado líquido. El agua intracelular sobreenfriada, fluye hacia afuera en respuesta a la diferencia de potencial que se crea entre el medio intra y extracelular.

Al ocurrir la cristalización, durante la transición de una a otra fase hay una liberación de energía en forma de calor latente de solidificación. Este eleva transitoriamente la temperatura de la muestra. Como el sistema de refrigeración continúa extrayendo calor y la temperatura de la cámara continúa descendiendo la muestra rápidamente se enfría. Sin embargo, este proceso de aumento y disminución rápida de la temperatura es perjudicial para las células.

Para evitar los efectos dañinos de el sobreenfriamiento, se realiza la inducción de nucleación de cristales (denominado habitualmente seeding) a una temperatura ligeramente superior que la de la nucleación espontánea de la solución.

INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE CONGELACIÓN

Tal como se explicara anteriormente, cuando la cristalización ocurre en el medio extracelular los so-

lutos se hacen progresivamente más concentrados en la fracción líquida haciéndolo hipertónico, a medida que el cambio de fase progresa. En respuesta a la diferencia de gradiente que se genera entre el medio intra y extracelular, el agua fluye hacia afuera.

Si la velocidad con que desciende la temperatura es muy rápida, la célula puede no ser capaz de deshidratarse suficientemente rápido y al llegar a la temperatura de nucleación, el agua remanente se congela formando hielo intracelular. Si por el contrario la velocidad de enfriamiento es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiéndose llegar al colapso celular.

Con una velocidad de enfriamiento adecuada, la célula se deshidratará y concentrará intracelularmente antes de alcanzar la temperatura de nucleación, de forma que la posibilidad de congelación intracelular y consecuentemente de daño celular se minimizará (Mazur, 1984).

Por tanto la supervivencia celular a la congelación será máxima a una velocidad de enfriamiento óptima, que es específica para cada tipo celular.

INFLUENCIA DE LOS FACTORES FÍSICOS

De acuerdo a Mazur (1984) los períodos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial del enfriamiento y el período de retorno a condiciones fisiológicas.

Si bien una velocidad de enfriamiento adecuada es necesaria para evitar la congelación intracelular, per se no garantiza la supervivencia celular. Mazur (1984) postula que la lesión celular crioinducida podría explicarse en función de la formación de hielo intracelular (consecuencia de una velocidad de enfriamiento inadecuada) y la acción combinada de factores físicos. Los factores físicos a los que se refiere son, por una parte el stress osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación a consecuencia de la formación de hielo y por otra, la fuerza física constituida por el frente de hielo en expansión, que presionaría sobre las células. Esto resultaría en deformación de las células, deformación que a bajas temperaturas resultaría letal (Mazur, 1984).

Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de congelación en general, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas entre 10 y 16°C alterando todas las funciones de la membrana y

confiriéndole un alto grado de fragilidad (Grossmann y Santaló, 1991).

PAPEL DE LOS AGENTES CRIOPROTECTORES

Además de una adecuada velocidad de enfriamiento, para mejorar la viabilidad celular es necesario alterar el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas en las cuales tiene lugar la criopreservación. Para ello se añaden al medio de congelación agentes crioprotectores: sustancias muy hidrosolubles y de baja citotoxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada (García y Vila, 1984). El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor.

Los crioprotectores pueden clasificarse en agentes penetrantes y no penetrantes, de acuerdo a la permeabilidad a través de la membrana celular:

a) Los agentes penetrantes son sustancias de bajo peso molecular y por ello permeables a través de la membrana, que protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta. Los más utilizados son:

1,2-Propanodiol (PROH)
Dimetilsulfóxido (DMSO)
Etilén-Glicol (EG)
Glicerol

Si bien la célula es permeable a estos agentes su permeabilidad nunca es de la misma magnitud que la del agua.

b) Los agentes crioprotectores no penetrantes son sustancias de alto peso molecular, que son efectivas cuando se utilizan velocidades altas de congelación. No son crioprotectores propiamente dichos, ya que no penetran en la célula sino que ejercen su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes.

Los más utilizados son:
Sacarosa, Glucosa, Dextrosa
Polivinil-pirrolidona (PVP)
Dextrano
Polietilen-glicol (PEG)

Dependiendo de la permeabilidad del crioprotector utilizado y de su citotoxicidad, la adición se realiza a 4°C, 37°C o a temperatura ambiente.

Los agentes crioprotectores pueden añadirse y extraerse en pasos, es decir aumentando (o disminuyen-

do) gradualmente la concentración de crioprotector en el medio, lo que reduce el stress osmótico sobre la célula a congelar; o bien añadirse (o extraerse) en un solo paso, lo que reduce el tiempo de exposición celular al crioprotector.

MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN

De acuerdo a la velocidad de enfriamiento y descongelación los métodos de congelación pueden clasificarse en protocolos de congelación lenta-descongelación rápida, congelación lenta-descongelación lenta, congelación ultrarápida y vitrificación.

En los dos primeros, la adición del crioprotector suele hacerse por pasos, y el descenso de la temperatura se realiza lentamente, en un congelador programable. La descongelación lenta se lleva a cabo también mediante el uso del congelador programable, mientras que la descongelación rápida se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño de agua a 30°C, para evitar la recristalización.

La congelación ultrarápida fué originalmente descrita para la congelación de embriones, por Trounson (1986). Implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotector, usualmente DMSO y sacarosa, seguida de inmersión en nitrógeno líquido.

La vitrificación (Rall y Fahy, 1985) tampoco requiere la utilización de un congelador programable.

Se basa en la congelación rápida en una mezcla de crioprotectores utilizados en muy altas concentraciones, que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un vidrio, sin formación de hielo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **García J, Vila L.:** Criopreservadores: concepto y manejo. *Biol Clin Hematol*, 1984, 6:219-225.
2. **García J, Carretero F.:** Lesión celular crioinducida. *Biol Clin Hematol*, 1985, 7: 43-60.
3. **Grossmann M, Santaló J.:** Aspectes teòrics de la congelació de gàmetes i d'embrions. *Treb Soc Cat Biol*, 1991, 42:87-108.
4. **Mazur P.:** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*, 1984, 247:C125-C142.
5. **Rall WF, Fahy GM.:** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 1985, 313:573-575.
6. **Trounson A.:** Preservation of human eggs and embryos. *Fertil Steril*, 1986, 46: 1-12.
7. **Vila L, García J.:** Revisión de los aspectos termodinámicos y cinéticos implicados en un proceso de criopreservación biológica. *Biol Clin Hematol*, 1983, 5: 135-142.
8. **Vila L.:** Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. *Biol Clin Hematol*, 1984, 6:227-236.
9. **Vila L, Carretero F.:** Manejo de congeladores programables. *Biol Clin Hematol*, 1985, 7:61-67.