

## RESEÑA REFERATVA

# CRIOCONSERVACION DE CELULAS NEURALES: IMPLICACIONES PARA EL NEUROTRASPLANTE

Y. González Mena y L. Castillo Díaz.

Centro Internacional de Restauración Neurológica, Avenida 25 No.15805 entre 158 y 160, Playa, CP 11300, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 5 de junio de 1996.

**RESUMEN.** Uno de los problemas prácticos asociados al trasplante neural es la limitada disponibilidad de tejido donante. La capacidad para crioconservar neuronas y tejido satisfactoriamente, pudiera resultar en el establecimiento de una fuente alternativa de tejido utilizable en el neurotrasplante. En este trabajo se comentan brevemente los aspectos técnicos de mayor relevancia relacionados con la crioconservación de neuronas y tejido neural primario y se revisa el progreso alcanzado en su introducción en el neurotrasplante. Mientras que los estudios realizados han mostrado la significación práctica de la crioconservación, también han evidenciado la necesidad de desarrollar una mayor experimentación que permita definir la posible relación entre las condiciones de esta técnica aplicada al tejido nervioso humano, la sobrevivencia y funcionalidad del trasplante.

**ABSTRACT.** One of the practical problems associated to neural transplant is the limited availability of donor tissue. The ability to cryopreserve neurons and tissues satisfactorily could result in the establishment of an alternative source of tissue to be used in neurotransplant. In this work, the technical aspects of greatest importance, related to cryopreservation of primary neurons and neural tissue are briefly enumerated. The progress that was obtained is revised here as to the introduction to neurotransplant. Meanwhile the studies already performed, have shown the practical significance of this manipulation and have also evidenced the necessity of a greater experimentation which would allow to define the possible relation between the conditions of applied procedures to the human nervous tissue, its survival and functional significance of transplant.

## INTRODUCCIÓN

La disponibilidad, almacenamiento y transporte del tejido donante están entre los mayores problemas prácticos asociados a la aplicación del trasplante de células neurales en las enfermedades neurodegenerativas humanas.

La crioconservación, que ha sido usada exitosamente para el almacenamiento prolongado de muchos tejidos y líneas celulares de diferentes orígenes, se revela como una posible solución práctica para resolver la conservación del tejido para el trasplante neural. Sin embargo, la crioconservación de tejidos y células primarias muestra una mayor complejidad, ya que estas son más susceptibles a las condiciones del microambiente que las rodea.

Asimismo, las células y el tejido neural primario pueden ser fácilmente dañados, debido a sus características morfológicas y fisiológicas, que les confieren una mayor vulnerabilidad.

Probablemente, es por esto que su crioconservación no ha sido abordada tan extensamente como en el caso de otros tipos celulares.

Con esta actualización sobre la crioconservación del tejido neural, enfocada hacia su potencial aplicación al trasplante neural, se pretende sintetizar el estado actual en el desarrollo de esta metodología aplicada al tejido neural y valorar su alcance y sus limitaciones para su aplicación al neurotrasplante.

Este trabajo contempla solamente los aspectos relacionados con la crioconservación de células y tejido neural primario, por constituir la fuente fundamental utilizada para los trasplantes en el Sistema Nervioso (SN) hasta el presente.

## Crioconservación de células primaria neurales. Aspectos técnicos críticos

La crioconservación es un método que se emplea desde hace mucho tiempo para el almacenamiento prolongado de células, tejidos y organismos a bajas temperaturas.

Cuando se crioconservan células neurales, hay determinados factores que resultan de vital importancia para obtener resultados exitosos en el cultivo y en el trasplante que se realice con ellas.

En la crioconservación de las células nerviosas se aplican con frecuencia la congelación lenta o la escalonada. Esta última combina el efecto de las congelaciones rápida y lenta. La temperatura final en estos procesos es, generalmente, la del nitrógeno líquido (-196 °C).

Las neuronas necesitan ser congeladas más lentamente que otros tipos celulares. Los mejores resultados se obtienen con una velocidad de enfriamiento de 1 °C/min.<sup>1,2,4,5,7,9,10,11,14,15</sup> Por otra parte, la descongelación rápida, en baño de agua a 37 °C, es la más recomendada. De esta forma, la descongelación total es el 60% entre 3 y 7 min.<sup>2,5,16,17</sup>

El agente crioprotector debe ser eliminado tan pronto como las células hayan sido descongeladas y comiencen a cultivarse, ya que este puede resultar tóxico y provocar efectos deletéreos si se deja actuar por períodos prolongados de tiempo.<sup>16</sup> Este paso brinda mejores resultados si se realiza de forma gradual, haciendo diluciones sucesivas que eviten el estrés osmótico de las células.<sup>6</sup>

Es importante destacar que esta rigurosa eliminación de la sustancia crioprotectora resulta un requerimiento específico en la crioconservación de neuronas, debido a su extrema sensibilidad.

La práctica también ha demostrado la necesidad de centrifugar la muestra para eliminar el agente crioprotector y del empleo de medio enriquecido con suero para la recuperación de las neuronas descongeladas.<sup>3,5,7,9,10,12,17,18</sup>

Otro método de crioconservación es la refrigeración a temperaturas cercanas a 0 °C, generalmente a 3-8 °C, lo que se conoce como **hibernación**. Las muestras casi siempre se almacenan en el llamado **medio de hibernación**, aunque también, se han obtenido buenos resultados empleando otros medios de cultivo con diferentes composiciones.<sup>8,17</sup> Las mayores viabilidades celulares se han obtenido empleando un medio de hibernación libre de calcio, tamponado con 30mmol/L de fosfato, con concentraciones de sodio entre 10 y 30mmol/L y de potasio entre 30y 70mmol/L.<sup>8</sup>

En la hibernación no se requiere de agente crioprotector y para las células neurales este proceso resulta más exitoso cuando el almacenamiento se realiza a 4 °C en un medio de hibernación.<sup>8,19,20,29</sup>

### **Las neuronas crioconservadas sobreviven y mantienen las características morfofuncionales de las neuronas sin crioconservar**

En los últimos años las técnicas de crioconservación han sido aplicadas a tejidos neurales de ratas y primates y se han analizado los parámetros físicos y bioquímicos que afectan la viabilidad neuronal después de un almacenamiento prolongado a estas bajas temperaturas. El objetivo fundamental de estos trabajos ha sido la obtención de altos porcentajes de células vivas después de la congelación.

Se han realizado estudios sobre la crioconservación de diferentes estructuras del Sistema Nervioso Central (SNC) y del Sistema Nervioso Periférico, a partir de embriones de ratas, tejido embrionario y adulto de ratón, así como fetos y neonatos de monos. También han sido crioconservadas células neurales humanas.<sup>2,3,5,7,13,17,21,22,27,28</sup>

Los factores más estudiados para analizar los efectos de la crioconservación sobre las neuronas están relacionados con la morfología, la neuroarquitectura, el desarrollo en el cultivo celular, la sensibilidad a los agentes neurotóxicos, así como la supervivencia y crecimiento del tejido fetal después del trasplante intracerebral.

Como sucede en la congelación de cualquier tejido, el tejido neural congelado rinde un número menor de células viables que el tejido no crioconservado. Además, la supervivencia en cultivo del tejido crioconservado disminuye, aunque no significativamente, con respecto a la del tejido fresco y este comportamiento se ha observado en tejidos procedentes de ratas, primates no humanos y humanos.<sup>1-4,8,10,12,17,21</sup>

Las células que sobreviven al proceso de congelación mantienen sus marcadores específicos, sus características neuroquímicas y su integridad morfológica, confirmada hasta el nivel ultraestructural, mostrando la preservación de organelos fundamentales como la mitocondria y el retículo endoplasmático rugoso.<sup>1-4,12,14,17,21,22</sup>

Se ha evidenciado que la influencia del tamaño del tejido durante el almacenamiento depende del procedimiento de conservación empleado. Las células hibernadas mantienen un nivel basal de metabolismo del cual se derivan influencias perjudiciales que se acentúan si el tejido ha sido desmenuzado o triturado antes de la refrigeración. Durante la congelación, las células se mantienen en un estado latente, con lo cual se minimizan las influencias tóxicas derivadas del metabolismo celular. Sin embargo, en los tejidos congelados intactos, el restringido espacio extracelular limita la capacidad de las células para acomodarse a los cambios de volumen

celular y a la formación de cristales de hielo durante el ciclo congelación-descongelación.<sup>8,29</sup> Probablemente, es por esto que la disociación del tejido antes de la congelación mejora la viabilidad, ya que en la suspensión celular el espacio extracelular es mayor.<sup>8,21,29</sup>

Los trabajos de diferentes grupos han evidenciado que en las suspensiones celulares y las piezas intactas de tejido de embriones de rata (estriado, médula espinal, mesencéfalo ventral) y fetos humanos (corteza) hibernadas hasta una semana, la viabilidad celular no disminuye significativamente.<sup>8,19,20</sup> La congelación de estas estructuras hasta 226 d tampoco afecta significativamente la viabilidad celular.<sup>1,4,6,10,11</sup> Por otra parte, la congelación de neuronas fetales de monos y humanos rinde porcentajes de células viables similares a los de tejido no congelado.<sup>2,5,17</sup>

En la crioconservación de tejido nervioso, es un factor importante la edad del tejido. Collier y col.<sup>1,4</sup> encontraron que en ratas y primates las células embrionarias después de congeladas son capaces de adherirse al sustrato y muestran crecimiento neurítico, aunque en los cultivos la primera emisión de neuritas ocurre con cierto retraso, el crecimiento posterior de estas es comparable al de los controles no congelados. El tejido postnatal de primates, sin embargo, no se adhiere a la superficie de cultivo y por tanto, no se desarrolla.

Las características electrofisiológicas de las células sometidas a la crioconservación, no han sido extensivamente estudiadas. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el presente parecen evidenciar que las neuronas después de congeladas retienen en un grado notable, sus características electrofisiológicas,<sup>9,10</sup> aunque se requieren estudios futuros para caracterizar la electrofisiología de las neuronas centrales crioconservadas y establecer la correlación *in vivo* e *in vitro* con otros parámetros funcionales.

Las células crioconservadas son capaces de responder a suplementos tróficos. Se han observado efectos positivos en la supervivencia y emisión de procesos neuríticos en las células cromafines de la médula adrenal de fetos humanos (utilizadas como modelo neuronal) y en las neuronas hipocámpales y corticales de fetos humanos, tratadas con factor de crecimiento nervioso inmediatamente después de la congelación.<sup>5,23</sup>

Los resultados de Dong y col.<sup>7</sup> y Yoshimoto y col.<sup>18</sup> mostraron que otros suplementos tróficos como el agente antioxidante U83836E, el factor de crecimiento epidérmico, el suero de cordón umbilical humano, el suero de ternera fetal (STF) y el extracto crudo de estriado tienen efectos significativos en la viabilidad de las neuronas de mesencéfalo de rata después de hibernadas a 4 °C, pero no mejoran significativamente la supervivencia neuronal. El STF parece tener un efecto reanimador esencial para la recuperación funcional en el tejido neural dañado por la dispersión o la congelación.<sup>7,18</sup>

Así, el suministro de suplementos tróficos a las neuronas crioconservadas podría ser usado para obtener incrementos de la viabilidad y la funcionalidad de estas.

### **La crioconservación de neuronas como alternativa práctica en el suministro de células para el neurotrasplante**

Para su utilización en el trasplante las neuronas crioconservadas deben conservar los parámetros celulares que determinan la funcionalidad del trasplante: viabilidad, integración axonal, formación de sinapsis, liberación adecuada del neurotransmisor e interacciones electrofisiológicas con las neuronas hospederas.

Diversos trabajos se han dedicado al estudio de la sobrevivencia, la organización y la conexión celular de los trasplantes intracelulares de tejido nervioso previamente congelado.<sup>1,6,11,20,26,27</sup> Estos estudios han determinado que el tejido cerebral inmaduro de rata después de congelado sobrevive al trasplante intracerebral, mostrando que la organización de las conexiones nerviosas intrínsecas y con el cerebro hospedero son similares a las observadas en el tejido sin congelar. Las neuronas congeladas mostraron una morfología y crecimiento neurítico normales en comparación con las de tejido no congelado.<sup>6,14,24,26</sup>

Asimismo, en otros casos, la viabilidad neuronal no disminuyó significativamente cuando el tejido neural fetal de primates no humanos se congeló previo a su trasplante en monos y las neuronas mantuvieron la morfología típica de la región del SNC de procedencia, así como la capacidad de producir sus marcadores neuroquímicos específicos.<sup>1,2,4</sup>

La posibilidad de trasplantar tejido humano, conservado previamente a bajas temperaturas, ha sido explorada utilizando diferentes modelos animales. Aunque el número de estos estudios es aún limitado, los resultados demuestran una sobrevivencia comparable con la del tejido trasplantado sin crioconservar.<sup>2,20</sup>

La utilización del tejido conservado a bajas temperaturas en el trasplante clínico, presenta un desarrollo incipiente y sólo se ha reportado el trasplante exitoso de tejido mesencefálico hibernado a 8 °C durante 48 h, en un paciente de la enfermedad de Parkinson.<sup>28</sup> Sin dudas, la dirección en que se han dado estos primeros pasos ha estado determinada por dos aspectos: por un lado, el trasplante neural en la enfermedad de Parkinson es el de más amplio desarrollo y por el otro, la hibernación por periodos cortos no altera significativamente el estado fisiológico de las células.<sup>20</sup>

Algunos parámetros del procedimiento de conservación del tejido crioconservado que pueden influir sobre la sobrevivencia del trasplante, no han sido totalmente esclarecidos por la experimentación desarrollada hasta el presente. Debe realizarse un estudio más exhaustivo sobre la influencia del tiempo de congelación en la sobrevivencia atendiendo a los fenotipos neuronales específicos, así como verificar el período de desarrollo neuronal óptimo para la crioconservación.

Resultados obtenidos por los autores<sup>30</sup> y por otros grupos,<sup>25,31,32</sup> han mostrado que la viabilidad de las células antes del trasplante es uno de los parámetros de mayor significación para garantizar la sobrevivencia de las células trasplantadas.

Por otra parte, el trasplante de tejido neural puede realizarse empleando bloques de tejido o una suspensión de células disociadas, por lo que sería conveniente realizar estudios encaminados a determinar la forma en que las células deben ser congeladas (bloques de tejido o suspensión) para garantizar una mayor viabilidad. Además, la utilización en los trasplantes de células previamente crioconservadas, debe contemplar una etapa para establecer el procedimiento de trasplante que menos afecte la viabilidad de estas.

## CONCLUSIONES

Los resultados acumulados hasta el presente, demuestran que las neuronas sobreviven el período de congelación, desarrollan su morfología típica y crecen en cultivo y en los trasplantes neurales. Los métodos de crioconservación descritos son aplicables a diferentes tipos neuronales, pero se

requiere optimizar las condiciones para los diferentes tipos de neuronas y en diferentes estadios del desarrollo, de manera que se definan las características relacionadas con la crioconservación de diferentes subpoblaciones neuronales del SNC humano y su posible dependencia de la edad del tejido. Esto resultaría relevante para el almacenamiento de núcleos celulares específicos del SNC, tanto para propósitos clínicos como experimentales.

Para la obtención de altos rendimientos de células viables es de particular importancia la manipulación del tejido antes y después de congelar. La disociación del tejido aplicando métodos menos rigurosos y la adición de suplementos tróficos antes y después de la congelación, pudieran resultar en aumentos sustanciales de la viabilidad neuronal.

Una alternativa simple y ventajosa para crioconservar las células neurales por períodos cortos puede resultar la hibernación.

Los resultados obtenidos en el trasplante de tejido neural crioconservado en animales de experimentación, han evidenciado la significación práctica potencial de su aplicación en el trasplante experimental y clínico. El poder almacenar el tejido, conservando su viabilidad y funcionalidad, repercutiría significativamente en un aumento de la cantidad de tejido disponible para el trasplante y contribuiría a vencer las dificultades que acarrea la sincronización entre la obtención del tejido donante y su implantación en el hospedero en una misma sesión.

Sin embargo, es de singular importancia en el desarrollo de una metodología para la crioconservación del tejido destinado al trasplante neural, ampliar los estudios empleando tejido fetal humano y determinar cómo se relacionan las condiciones del proceso con la edad del tejido, la sobrevivencia y la funcionalidad del trasplante.

En resumen, la potencialidad terapéutica del trasplante neural en el tratamiento de las enfermedades degenerativas ha generado la necesidad de desarrollar una metodología de crioconservación del tejido neural que satisfaga los requerimientos del trasplante en el SN.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Collier T.J., Redmond D.E., Sladek C.D., Gallagher M.J., Roth R.H. and Sladek J.R. *Brain Res.*, **436**, 363, 1987.
2. Redmond D.E., Naitolin F., Collier T.J., Leranth C., Robbins R.J., Sladek C.D., Roth R.H. and Sladek J.R. *Science*, **242**, 768, 1988.
3. Silani V., Pizzuti A., Strada O., Falini A., Buscaglia M., and Scarfato G. *Brain Res.*, **473**, 169, 1988.
4. Collier T.J., Sladek C.D., Gallagher M.J., Blanchard B.C., Daley B.F., Foster P.N., Redmond D.E., Roth R.H. and Sladek J.R. *Prog. Brain Res.*, **78**, 631, 1988.
5. Silani V., Pizzuti A., Strada O., Falini A., Pezzoli G. and Scarfato G. *Brain Res.*, **454**, 383, 1988.
6. Sorensen T., Jensen S., Moller A. and Zimmer J. *J. Comp. Neurol.*, **252**, 468, 1986.
7. Dong J.F., Datta A., Birch N.J. and Hitchcock E.R. *Restor. Neurol. Neurosci.*, **7**, 217, 1995.
8. Kawamoto J.C. and Barrett J. *Brain Res.*, **384**, 84, 1986.
9. Scott B. and Lew J. *Exp. Cell Res.*, **162**, 566, 1986.
10. Sucher N.J., Cheng T.P. and Lipton S.A. *Neuroscience*, **43**, 135, 1991.
11. Das G.P., Houle J.D., Brasko J. and Das K.G. *J. Neurosci. Meth.*, **8**, 1, 1983.
12. Petite D. and Calvet M.C. *Brain Res.*, **669**, 263, 1995.
13. Swett J.W., Paramore C.G., and Turner D.A. *Exp. Neurol.*, **129**, 330, 1984.
14. Fang J. and Zhang Z.X. *Cryobiology*, **29**, 267, 1992.

15. Linnell R.H. **Science**, **149**, 1266, 1965.
  16. Freshney R.I. Instability, variation, and preservation. In: *Culture of animal cells: A manual of Basic Techniques*. 2nd Ed., New York: Alan R. Liss, Inc., 215, 1988.
  17. Robbins R.J., Torres-Alemán I., Leranthe C., Bradberry C.W., Deutch A.Y., Welsh S., Roth R.H., Spencer D., Redmond D.E. and Nattolin F. **Exp. Neurol.**, **107**, 208, 1990.
  18. Yoshimoto Y., Date I. and Ohmoto T. **Restor. Neurol. Neurosci.**, **6**, 73, 1993.
  19. Yoshimoto Y., Date I., Sakai K., Furuta T., Asari S. and Ohmoto T. **No-To-Shinkei**, **44**, 553, 1992.
  20. Humpel C., Bygdeman M., Olson L. and Stromberg Y. **Cell Transplant.**, **3**, 475, 1994.
  21. Dong J.F., Datta A. and Hitchcock E.R. **Brain Res.**, **621**, 242, 1993.
  22. Kontur P.J., Leranthe C., Redmond D.E., Roth R.H. and Robbins R.J. **Exp. Neurol.**, **121**, 172, 1993.
  23. Mattson M.P. and Rychlik B. **Brain Res.**, **522**, 204, 1990.
  24. Jensen S., Sorensen T. and Zimmer J. **Cryobiology**, **24**, 120, 1987.
  25. Brundin P. Dissection, preparation, and implantation of human embryonic brain tissue. In: *Neural Transplantation. A practical Approach*. ed. by Dunnett, S.B. and Björklund, A., 139-160, 1993.
  26. Sauer H., Frodl E.M., Kupsch A., ten Bruggencate G. and Oertel W.H. **Exp. Brain Res.**, **90**, 54, 1992.
  27. Collier T.J., Gallagher M.J. and Sladek C.J. **Brain Res.**, **623**, 249, 1993.
  28. Kordower J.H., Freeman T.B., Snow B.J., Vingerhoets F.J.G., Mufson E.J., Sanberg P.R., Hauser R.A., Smith D.A., Nauer G.M., Perl D.P. and Olanow C.W. **N. Engl. J. Med.**, **332**, 1118, 1995.
  29. Nikkhan G., Eberhard J., Olsson M., and Björklund A. **Brain Res.**, **687**, 22, 1995.
  30. De la Cuétara K., Castillo L., Castellano O. and Macías R. **Rev. Neurol. Arg.**, **21**, 11, 1996.
  31. Krzanowski J.J. **Basic Sci. Concepts**, **91**, 689, 1994.
  32. Brundin P., Björklund A. and Lindvall O. **Prog. in Brain Res.**, **82**, 707, 1990.
-