

REVISION BIBLIOGRAFICA

PAPEL DE LOS CRIOPROTECTORES EN LA CONSERVACION PROLONGADA DE MATERIAL BIOLOGICO A BAJAS TEMPERATURAS

D. Díaz Castro

Laboratorio de Criobiología y Liofilización, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 30 de noviembre de 1987

Recibido: 30 de octubre de 1988

ABSTRACT. A review about the protectant role in the cryopreservation of biological materials is shown here. Cryoprotectants are commonly classified as penetrating and nonpenetrating compounds, regarding their capacity to go, or not, through the plasma membrane. The main action mechanism of the intracellular additives is of colligative type, by decreasing the melting point of cytoplasmic liquid, while the extracellular agents act stabilizing the membrane macromolecular components. Addition and removal of cryoprotectants should be done taking in account a dehydration and rehydration degree in such a level that no irreversible harm occurs in the cells. On defining the additive suitability it should be considered the peculiarity of each one regarding to toxicity and osmotic stress that cause to specific cellular type.

RESUMEN. En el presente trabajo se realiza una revisión bibliográfica sobre el papel de los crioprotectores en la crioconservación de materiales biológicos. Los crioprotectores se clasifican, de forma general, en penetrantes y no penetrantes según la capacidad que posean de atravesar o no la membrana celular. El mecanismo principal de acción de los aditivos intracelulares es de carácter coligativo al disminuir el punto de fusión del líquido citoplasmático, mientras que los extracelulares actúan estabilizando los componentes macromoleculares de la membrana. La adición y remoción de los crioprotectores debe efectuarse teniendo en cuenta un nivel de deshidratación, y posterior rehidratación, que no provoque afectaciones irreversibles a nivel celular.

INTRODUCCION

La crioconservación ha resultado la técnica idónea para la preservación prolongada de material biológico, desde suspensiones celulares hasta tejidos e incluso órganos.

A fines del siglo pasado, el desarrollo de técnicas para la licuefacción del aire y sus gases constituyentes, marcó potencialmente el inicio de la criogenia al permitir la obtención de temperaturas extremadamente bajas, pero no es hasta 1949 que se produce la primera contribución significativa a la crioconservación, cuando Polge y col.¹ demostraron las propiedades crioprotectoras del glicerol en la congelación de espermatozoides aviares.

La proposición del dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector,² con un espectro de aplicabilidad más amplio aún que el del glicerol, constituyó un paso fundamental en el desarrollo de la crioconservación en biología y medicina.

En general, después de algunos años en que los éxitos obtenidos empíricamente en la conservación de semen y glóbulos rojos a bajas temperaturas, llevaron a los investigadores a descuidar en cierta medida los estudios básicos en esta temática, se han realizado numerosos trabajos con el objetivo de conocer los fenómenos que se producen durante el proceso de congelación-descongelación de productos biológicos y los factores que provocan la muerte celular por hipotermia, de forma tal, que sea posible la proposición de diversos mecanismos dirigidos a evitar o disminuir el daño durante la crioconservación.

En los últimos años se han obtenido progresos considerables en la crioconservación de glóbulos rojos, plaquetas, leucocitos, médula ósea, microorganismos, insectos y suspensiones celulares en general. También se han obtenido algunos resultados positivos para piel, córnea, embriones, válvulas cardíacas y algunos tejidos fetales.^{3,4}

En este contexto reviste gran importancia el estudio de los crioprotectores, sus mecanismos de acción y sus métodos de adición y eliminación con el objetivo de obtener altos niveles en la viabilidad resultante minimizando los efectos negativos que estas sustancias puedan tener sobre un material dado.

DESARROLLO

Durante años se creyó que el daño celular durante los pretratamientos o la congelación, realizados con el fin de conservar ciertos materiales biológicos a bajas temperaturas, estaba relacionado fundamentalmente con concentraciones absolutas intra o extracelulares de los solutos involucrados. Sin embargo, actualmente se reconoce la hipótesis⁵ de que la afectación de la membrana producto de la reducción osmótica del volumen celular, representa la causa fundamental.

Con el objetivo de proteger los sistemas celulares durante el proceso de congelación, se han empleado diferentes sustancias denominadas crioprotectores, las cuales constituyen un grupo heterogéneo de compuestos que actúan mediante variados mecanis-

mos y que se han clasificado de forma muy general en penetrantes y no penetrantes en dependencia de su capacidad de atravesar o no la membrana celular, lo que implica diferencias sustanciales en la forma en que se lleva a cabo la protección a la célula del daño por frío.

Crioprotectores penetrantes

Artificialmente es posible la prevención del daño por frío mediante la adición de sustancias que disminuyen el punto de fusión y aumentan el grado de sub-enfriamiento (nucleación homogénea del hielo) de la solución elevando a su vez el punto de vitrificación lo cual reduce la cantidad de agua que puede extraerse de la solución para formar cristales de hielo a cualquier temperatura, evitando así que la deshidratación celular en respuesta al estrés osmótico lleve a la célula a un volumen letal durante el proceso de congelación.⁶ Este mecanismo protector es de tipo coligativo.

El glicerol y el DMSO son los dos crioprotectores penetrantes más utilizados y a los que se les atribuye una crioprotección coligativa. No obstante, se han acumulado experiencias^{7,8} que indican que la acción de ambos no puede ser explicada solamente por este mecanismo ya que se ha demostrado que el DMSO a concentraciones mucho más bajas que 2 mol/L mantiene un efecto crioprotector. Por ejemplo, en plaquetas se alcanza una buena protección con 0,7 mol/L e incluso con 0,3 mol/L de DMSO y estas concentraciones son muy bajas para que se pueda justificar su acción desde una base puramente coligativa.

Se ha demostrado que el glicerol mantiene su efecto preservante durante la congelación de eritrocitos impermeabilizados al glicerol por la adición de cobre.⁹ De lo anterior se desprende que estas sustancias ejercen indiscutiblemente un efecto estabilizador.

El carácter coligativo del efecto del glicerol se evidencia en el diagrama de fases¹⁰ de la figura 1 y en la curva correspondiente a este compuesto¹¹ en la figura 2.

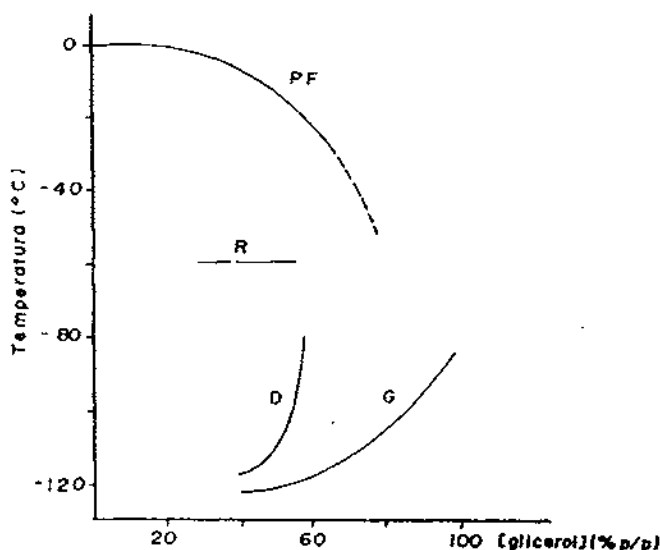


Fig. 1. Diagrama de fases del glicerol. PF: punto de fusión; R: recristalización; D: desvitrificación; G: transición vítrea

El glicerol puede actuar como un crioprotector penetrante si se añade a 37 °C y como no penetrante si se añade a 0 °C. Ha sido muy utilizado con probada efectividad en fracciones celulares sanguíneas,^{12,13} en espermatozoides humanos¹ y en suspensiones celulares obtenidas por cultivo de tejidos. En la mayoría de los casos resulta suficiente emplear concentraciones del 5 al 15 % para obtener una buena crioprotección.

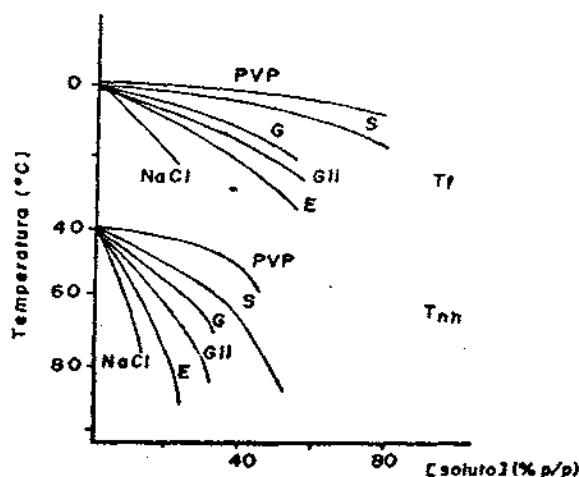


Fig. 2. Efecto de la adición de diferentes solutos sobre la disminución de los puntos de fusión (TF) y de nucleación homogénea del hielo (Tnh). PVP: polivinilpirrolidona; S: sacarosa; G: glucosa; GII: glicerol; E: etilenglicol

El DMSO se caracteriza por su rápida penetración a través de las membranas biológicas y por su extraordinaria afinidad con el agua. Actúa como anticongelante a concentraciones del 20 % o menores¹⁴ a causa de que sus enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua interfieren con la tendencia de éstas a formar matrices cristalinas^{15,16} a lo cual se atribuye fundamentalmente su efecto protector. En segundo lugar, el DMSO es capaz de atrapar los radicales que se liberan y dañan la membrana celular durante el proceso de descongelación.¹⁷

El DMSO ha sido usado con éxito en la crioprotección de espermatozoides,^{2,18} embriones,^{19,20} plaquetas,^{21,22} diversas fracciones sanguíneas,² células tumorales²³ y suspensiones celulares obtenidas por cultivo de tejidos.²⁴⁻²⁶ Numerosos autores lo consideran superior al glicerol de la crioconservación de materiales biológicos.^{2,26,28}

En la figura 3 se muestra²⁷ el efecto de la concentración de DMSO sobre la cantidad de hielo formado a una temperatura dada en un sistema modelo DMSO-NaCl-H₂O.

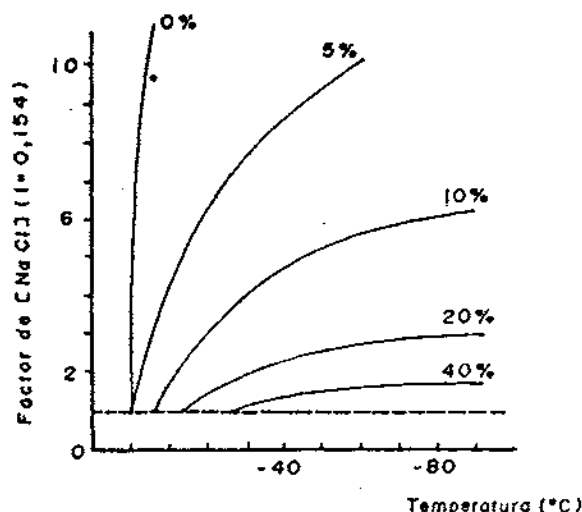


Fig. 3. Efecto de la concentración de DMSO sobre la concentración de NaCl en la solución remanente a medida que se produce la formación del hielo en un sistema modelo NaCl-DMSO-H₂O. La concentración inicial de NaCl es de 0,15 mol/L

Crioprotectores no penetrantes

La crioprotección penetrante, como se explicó anteriormente, se dirige a evitar sobrepasar el volumen mínimo crítico y, por supuesto, previene el daño por estrés hipertónico. Es también posible otro mecanismo protector que consiste en prevenir o revertir esta afectación por hipertonicidad y esta es, probablemente la función de los crioprotectores extracelulares.⁵

Esta clasificación incluye aquellos compuestos que no son capaces de atravesar la membrana celular tales como polímeros, azúcares, alcoholes de azúcares, etcétera. Entre los más empleados se encuentran la polivinilpirrolidona²⁸ (PVP), el almidón hidroxietílico²⁹ (HES), el polietilenglicol³⁰ (PEG), el etilenglicol,³⁰ la dextrana, la sacarosa y otros, que han resultado extraordinariamente efectivos en la crioprotección a concentraciones muy bajas, a diferencia de los agentes esencialmente coligativos. No obstante lo anterior es necesario señalar que, aunque no como mecanismo principal, estos compuestos también disminuyen las temperaturas de fusión y de nucleación homogénea del hielo (Fig. 2).

Estos compuestos ejercen presumiblemente un efecto beneficioso en la superficie de la membrana celular.³¹ Meryman⁵ plantea que el daño primario por congelación tiene lugar en, o sobre, la membrana celular y sostiene el criterio de que el estrés osmótico, posiblemente mediante el desarrollo de un gradiente de presión a través de la membrana, conlleva un cambio abrupto en su permeabilidad durante la congelación que permite un influjo de soluto extracelular y simultáneamente causa la pérdida o alteración de los constituyentes superficiales, provocando la pérdida de la conformación nativa de las macromoléculas de la membrana y todo esto permite eventos degradativos adicionales que implican cambios irreversibles. La inhibición, retardo o revertimiento de la desnaturación de los componentes macromoleculares de la membrana es, posiblemente, el mecanismo más importante en la crioprotección extracelular.^{32,33}

Una de las características de los crioprotectores extracelulares es que, para ser efectivos, se deben utilizar a velocidades de congelación y descongelación relativamente rápidas ya que esto, presumiblemente, sirve para minimizar el daño por los denominados "efectos de solución" mediante la limitación del tiempo disponible para el desarrollo de este fenómeno.

En estudios realizados en glóbulos rojos enfriados rápidamente³⁴ se demostró que la presencia de PVP inmediatamente después de la descongelación mejora el recobrado de células intactas mientras que su presencia durante todo el proceso de congelación-descongelación resultaba en una viabilidad resultante aún mayor. Esto coincide con los mecanismos propuestos anteriormente para explicar la crioprotección penetrante.

Se ha comprobado que el empleo de mezclas de crioprotectores penetrantes y no penetrantes, al combinar ambos efectos, resulta más efectivo que el empleo de estos aditivos por separado.

En la crioconservación de plaquetas existe el problema que las bajas concentraciones de aditivos permeantes que soportan no son suficientes para proteger del daño hipotérmico,³⁵ por tanto, se emplean mezclas de crioprotectores penetrantes y no penetrantes como glucosa, dextrana, manitol, glicerol y DMSO³⁶⁻³⁸ lo que ha resultado en un efecto protector superior.^{39,40}

Efectos negativos de la adición de crioprotectores

Generalmente se acepta que tanto la congelación como la adición de crioprotectores afectan la estabilidad de las estructuras biológicas. Por tanto, para la crioconservación, es tan importante el estudio de los efectos negativos de los crioprotectores como su capacidad crioprotectora.

La presencia de un crioprotector, similarmente a la formación de hielo, induce en cierta forma la deshidratación celular⁴¹⁻⁴³ lo cual hace necesario definir, para cada tipo de material a conservar, las concentraciones de aditivos protectores que son toleradas en cada caso, teniendo en cuenta además que, al irse formando el hielo

durante el proceso de congelación, la concentración irá en aumento.⁴⁴

El DMSO inhibe marcadamente la actividad catalasa y peroxidasa con el consiguiente efecto dañino sobre la membrana celular.^{45,46} Por otra parte, los crioprotectores participan también en el incremento de la permeabilidad de membrana durante la congelación lo que provoca filtración de soluto hacia la célula y el estrés osmótico hipertónico⁴¹ correspondiente.

Fahy y MacFarlane⁴³ presentan la relación entre la cantidad de hielo formada y la concentración de glicerol (Fig. 4) asumiendo que el daño mecánico aparece para un 40 % del volumen original convertido en hielo y que la toxicidad se torna un factor letal a partir de una concentración de glicerol en la solución extracelular de aproximadamente 45 %.

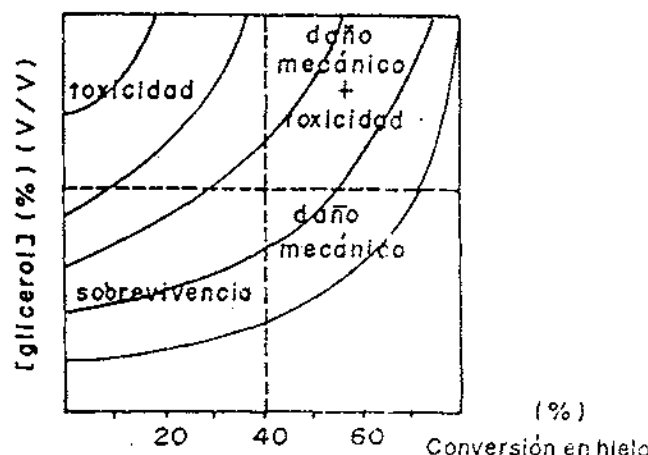


Fig. 4. Efecto de la concentración de glicerol remanente en la fase líquida sobre la formación de hielo. La línea vertical correspondiente a un 40 % de conversión de hielo representa el umbral para el daño mecánico aceptado en general. La línea horizontal a 45 % v/v de glicerol representa la concentración hipotéticamente letal.

Es conocido también que los crioprotectores alteran la polaridad del entorno celular⁴¹ lo que, bajo ciertas condiciones, podría inducir la desaparición de la membrana y provocar en consecuencia la muerte de la célula.⁴⁷

Dado que, aunque existen hipótesis sobre los mecanismos de protección y daño de los crioprotectores durante el proceso de congelación-descongelación de materiales biológicos, no se han obtenido evidencias experimentales concluyentes al respecto, es necesario continuar las investigaciones sobre el tema, de forma tal, que se pueda distinguir entre el daño osmótico y la toxicidad inherente a las sustancias crioprotectoras.

En este sentido, es necesario el análisis de los problemas asociados a la adición y extracción de los crioprotectores.

A excepción de compuestos que penetran extremadamente rápido a la célula, como es el caso del DMSO, la adición de un crioprotector penetrante causa inicialmente la deshidratación celular y, en dependencia de la naturaleza de la sustancia y de la temperatura de adición, la célula irá disminuyendo su tamaño a medida que el crioprotector penetre invirtiéndose el proceso durante su extracción.⁶

Si la concentración de aditivo requerida para la crioconservación es alta, estos cambios de volumen pueden resultar especialmente dañinos por lo que se acepta, de forma general, la conveniencia de añadir el crioprotector por etapas y extraerlo también de forma paulatina.

En la literatura, algunos autores plantean^{48,49} que el estrés por dilución es usualmente el más severo y se propone que es posible reducirlo incorporando al medio de dilución un compuesto no penetrante que prevendrá a la célula del aumento desproporcionado

nado de volumen mientras se produce la difusión del crioprotector hacia el exterior.

La posibilidad de que el empleo de crioprotector provoque cambios genéticos en el material, ha sido objeto de estudios. A partir de experiencias en la crioconservación de suspensiones celulares de ovarios de hamster chino, Ashwood-Smith⁵⁰ plantea que ni el glicerol ni el DMSO usados a bajas concentraciones durante la incubación del cultivo provocaban cambios genéticos. El proceso de congelación-descongelación por sí solo tampoco provocó variabilidad genética y el empleo de estas sustancias crioprotectoras al 10 % durante la crioconservación del material no indujo cambios cromosómicos detectables por lo que, a partir de aquí se concluye que la crioconservación bajo estas condiciones es genéticamente segura.

No obstante, aunque el DMSO ha demostrado su extraordinaria efectividad y siendo de hecho el crioprotector por excelencia de la mayoría de los tejidos y sistemas celulares,^{31,51-53} existen algunas referencias⁵⁴⁻⁵⁶ sobre los efectos de activación de genes que posee esta sustancia en algunos materiales biológicos por lo que debe ser usado con precaución en la crioconservación de embriones humanos.

Es evidente que la importancia que ha adquirido la crioconservación en la preservación prolongada de materiales biológicos conllevará a la realización de estudios profundos sobre los mecanismos de acción de los crioprotectores conocidos y a la proposición de otras sustancias para este fin lo que amplía así las perspectivas y posibilidades de aplicación de esta técnica a la biología y la medicina en un futuro cercano.

BIBLIOGRAFIA

1. Polge C., Smith A.V. and Parkers A.S. *Nature*, 164, 666, 1949.
2. Lovelock J.E. and Bishop M.W.H. *Nature*, 183, 1394, 1959.
3. Ashwood-Smith M.J. In: *Low temperature preservation in medicine and biology*, Ashwood-Smith and Farrant editors, 19-44, University Park Press, USA, 1980.
4. Ashwood-Smith M.J. and Farrant J. In: *Low temperature preservation in medicine and biology*, Ashwood-Smith and Farrant editors, 323, University Park Press, USA, 1980.
5. Meryman H.T. In: *Cryobiology*, Meryman ed., 1-113, Academic Press, USA, 1966.
6. James E. In: *Plant Biotechnology*, S.H. Mantell & H. Smith editors, 163-185, Cambridge Univ. Press, Reino Unido, 1983.
7. Handin R.I. and Valeri C.R. *Blood*, 40, 509, 1972.
8. Baldini M. Comunicación personal.
9. Mazur P., Leibo S.P. and Miller R.H. *Cryobiology*, 8, 489, 1971.
10. Luyet B. and Rassmussen D. *Biodynamica*, 10, 167, 1968.
11. Mackenzie A.P. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 278, 167, 1977.
12. Brodthagen V.A. and Armitage W.J. and Parmar N. *Cryobiology*, 22, 1, 1985.
13. Smith A.V. *Lancet*, II, 910, 1950.

14. Flagg-Brayton C. *Commell. Vet.*, 76, 61, 1986.
15. Leake C.D. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 141, 1, 1967.
16. Wood D.C. and Wood J. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 243, 7, 1975.
17. Slafer M. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 411, 170, 1983.
18. Zimmerman S.J., Maude M.B. and Moldauer M. *Fert. Steril.*, 15, 505, 1964.
19. Franks B.C., Coley S.L., Beherbul B. and Page R.D. *Theriogenology*, 23, 194, 1985.
20. Tervill H.R. and Gold P.G. *Theriogenology*, 21, 268, 1984.
21. Baldini M.J. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 243, 306, 1975.
22. Shiffer C.A., Aisner J. and Dutcher J.P. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 411, 161, 1983.
23. Graham W.P. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 243, 317, 1975.
24. Ashwood-Smith M.J. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 141, 54, 1967.
25. Dougherty R.M. *Nature*, 193, 550, 1962.
26. Porterfield J.S. and Ashwood-Smith M.J. *Nature*, 193, 548, 1962.
27. Farrant J. *Nature*, 205, 1284, 1965.
28. Doebbler G.F., Rose A.W., Rinfret A.P. In: *Cryobiology* H.T. Meryman ed., 775, Reino Unido, 1966.
29. Knorpp C.T., Starkweather W.H., Spencer H.H. and Weatherbee L. *Cryobiology*, 8, 511, 1971.
30. Karow A.M. *J. Pharm. Pharmacol.*, 21, 209, 1969.
31. Robinson A.M. *Cryobiology*, 8, 384, 1971.
32. Klats I.M. *Fed. Proc.*, 515, 524, 1965.
33. VonHippel P.H. and Wong K.Y. *Science*, 145, 577, 1964.
34. Meryman H.T. and Hornblower M. *Cryobiology*, 9, 262, 1972.
35. Mazur P. In: *The freezing of mammalian embryos*, K. Elliot & J. Whelan editors, 19-42, Holanda, 1977.
36. Dayan G. and Rowe A.W. *Cryobiology*, 13, 1, 1976.
37. Djerassi I., Farber S., Roy A. and Cavins J. *Transfusion*, 6, 572, 1966.
38. Herve P., Potron G. and Droule C. *Transfusion*, 21, 384, 1981.
39. Wybran J. and Stacques C. *Transfusion*, 12, 413, 1972.
40. Murphy S. and Saylor S.N. *Transfusion*, 14, 139, 1974.
41. Arnold K. and Pratsch L. *Biochim. Biophys. Acta*, 728, 121, 1983.
42. Conover T.E. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 243, 24, 1975.
43. Fahy G.M. and MacFarlane D.R. *Cryobiology*, 21, 407, 1984.
44. Lee D. *Biochim. Biophys. Acta*, 233, 619, 1971.
45. Rammler D.H. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 141, 1967.
46. Mattles G. and Hackensellner H.A. *Cryo-letter*, 2, 241, 1981.
47. Dughness N. *Cryobiology*, 21, 695, 1984.
48. Lovelock J.E. *Lancet*, II, 1238, 1952.
49. Mutetwa S., Ustun A.J. and Last C. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74, 116, 1980.
50. Ashwood-Smith M.J. *Cryobiology*, 22, 427, 1985.
51. Ashwood-Smith M.J. *Nature*, 190, 1204, 1961.
52. Ashwood-Smith M.J. *Blood*, 23, 494, 1964.
53. Walker P.J. and Ashwood-Smith M.J. *Ann. Trop. Med. Parist.*, 55, 93, 1961.
54. Higgins P.J. and O'Donnell P.V. *Oncology*, 39, 325, 1982.
55. Rutland P.S., Twiston-Davies A. and Warburton M.J. *J. Natl. Cancer Inst.*, 69, 1083, 1982.
56. Warburton M.J., Head L.P., Ferns S.A. and Rutland P.S. *Eur. J. Biochem.*, 133, 707, 1983.

Mediante el uso de este sistema, puede obtenerse agua potable de gran calidad sin introducirle ningún olor o sabor indeseable y con la posibilidad de que se puede realizar su tratamiento prácticamente en el momento del consumo.

DATOS TECNICOS

- Voltaje: 110 V
- Frecuencia: 60 Hz
- Potencia: 30 W

OZONIZADOR DOMESTICO

Centro Nacional de Investigaciones Científicas

Avenida 25 y calle 158, Cubanacán, Playa
Ciudad de La Habana, Cuba
Apartados Postales: 6880 y 6990
Teléfono: 21-8066 Télex: 51-1582 CNIC CU