

## Criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas

Graciela Cruz-Rico,\* Jorge Cruz-Rico\*\*

En los últimos 45 años se han desarrollado técnicas de criobiología y de control de calidad, que permiten la utilización de un método estandarizado para la criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas. Desde 1955, Barnes y Loutit, demostraron la capacidad de mantener la viabilidad de precursores hematopoyéticos de médula ósea, con la misma técnica utilizada por Palge y col, en 1949, para la criopreservación de espermatozoides con glicerol como crioprotector. Además, el desarrollo de técnicas de cultivo de precursores granulocito-macrófago han permitido el control *in vitro* de los fenómenos de recuperación de médula ósea y células hematopoyéticas periféricas criopreservadas, éstas técnicas han sobresalido con buen éxito en la aplicación clínica de los trasplantes.

El fin esencial de la congelación celular, ya sea de la médula ósea o de las células hematopoyéticas germinales de sangre periférica, implica primordialmente un cambio de fase: de un sistema líquido en sólido, por medio del frío a fin de bloquear de una manera homogénea y total todos los sistemas enzimáticos celulares. Esto se realiza de una manera controlada para preservar la viabilidad celular. Sin embargo en este proceso puede ocurrir daño celular irreversible, ya sea por deshidratación osmótica o por la formación de cristales de hielo intracelulares.

Al congelar una suspensión celular, la formación de hielo comienza en líquido extracelular, debido a que ahí existe un mayor intercambio de calor con el medio circundante y alcanza más rápidamente el equilibrio térmico en la cámara de congelación. Así, la concentración de solutos extracelulares aumenta paulatinamente, originando un gradiente osmótico que provoca la salida de agua de la célula, con su consecuente deshidrata-

ción, lesión de la membrana y lisis celular. Esto sucede preferentemente cuando el ritmo de enfriamiento es muy lento. Afortunadamente los linfocitos, los precursores hematopoyéticos y los monocitos se encuentran entre las células de mayor tolerancia osmótica, a diferencia de glóbulos rojos y granulocitos. Por otro lado, si el proceso de enfriamiento ocurre rápidamente, no hay tiempo para que el agua intracelular difunda hacia el exterior, por lo que el sistema se alejara del equilibrio, quedando el medio intracelular menos concentrado que el extracelular. Esto da lugar a la formación de cristales de hielo en el interior de la célula con la consecuente lesión mecánica de ella.

Generalmente la muestra biológica de células hematopoyéticas es mezclada con un agente crioprotector y colocada en una bolsa de criopreservación. El crioprotector más utilizado es el dimetilsulfóxido (DMSO) en diferentes concentraciones (2.2-10%); otros que también se han utilizado son el glicerol, el hidroxietilalmidón (HES), polivinilpirrolidona (PVP), etc. El crioprotector al penetrar a la célula aumenta la concentración del medio intracelular evitando la formación de cristales y así la pérdida de viabilidad. De este modo, la adición de una sustancia crioprotectora permite que durante el enfriamiento no se pierda tanto líquido intracelular y mantiene al mismo tiempo suficiente concentración de solutos para disminuir la aparición de cristales intracelulares.

La mayoría de los centros de trasplante de médula ósea usa programas que incluyen un descenso profundo y sincronizado de la temperatura de la cámara para contrarrestar la liberación del calor de fusión. La característica programable del controlador permite este mecanismo para el control de congelación uniforme de la muestra a un

\*Unidad de Trasplante de Médula Ósea, Instituto Nacional de Cancerología.

\*\*Jefe del Servicio de Hematología del Hospital Juárez de México.

margen programado, hasta que ésta ha sido congelada. En este punto, la temperatura puede ser rápidamente disminuida sin afectar la estabilidad de la muestra. Una vez iniciado el cambio de estado, el ritmo de enfriamiento debe mantenerse constante, entre 1° y 2°C/minuto como forma más aconsejada para evitar un posible sobreenfriamiento de la célula. Sin embargo, se han descrito recuperaciones adecuadas a descensos más abruptos (-5° a -7° C/min.).

La criopreservación a baja temperatura (-196° C), tiene por objeto bloquear de una forma total los sistemas enzimáticos celulares permitiendo, teóricamente, su conservación indefinida. Siempre que el almacenamiento se mantenga a una temperatura estable, no interfiere en la viabilidad de las células, más si ésta es a -196°C en nitrógeno líquido.

En la etapa de descongelación la supervivencia celular, puede comprometerse por lisis osmótica, recristalización intracelular o por efectos tóxicos del crioprotector. Leibo y cols. en 1970, demostraron que la recuperación de células hematopoyética, era superior si la velocidad de descongelación era rápida, a 100°C/minuto, disminuyendo los riesgos de cristalización intracelular y choque hipotérmico.

Otros factores que influyen en la viabilidad de los progenitores hematopoyéticos son:

a).-Toxicidad del DMSO como crioprotector penetrante y con efecto tóxico termodependiente.

b).-Presencia de proteínas en el medio de congelación, a una concentración de 5-10%, ejerciendo efecto protector durante la congelación. Sin embargo, también se obtienen buenos resultados de viabilidad celular y recuperación de CFU-GM con concentraciones de 40-80%.

c).- Concentración celular, aconsejando concentraciones no excesivamente elevadas (60-100 x 10<sup>6</sup> células nucleadas por ml) pero en absoluto tan bajas como las descritas por Gorin en 1986., con el fin de evitar la lisis celular y la formación de agregados postcongelación.

d).- Las bolsas para congelación de plástico no lipófilo.

Por lo tanto, es deseable que la conservación de precursores hematopoyéticos deba asegurar:

A). Fase de congelación.-

- Velocidad de congelación entre -1° a -5° C/minuto.

- Concentración final de DMSO, de 5 a 10%.

- Utilización de bolsas especiales con espesor de 2-3 mm, que garanticen un intercambio térmico uniforme.

B). Almacenamiento.-

- Evitar oscilaciones de la temperatura.

- Preferentemente almacenar entre -80° a -196°C.

C). Descongelación.-

- Descongelación e infusión rápida en un tiempo inferior a 15 minutos.

Sin embargo, este método estándar de criopreservación, representa un elevado costo económico, además de ser un proceso de larga duración y que limita su utilización a sólo unos centros para la práctica de trasplantes de médula ósea, células progenitoras hematopoyéticas y células de cordón umbilical. Debido a esto ultimamente, los métodos de congelación y almacenamiento de progenitores hematopoyéticos se encuentran en una etapa de simplificación. Desde 1987 Stiff y col. demostraron que la congelación a -80°C resultaba eficaz sin el uso de congelador programado. Así en muchos centros en el mundo este método se ha utilizado con más o menos variaciones; en el Hospital Juárez de México hemos utilizado DMSO al 10%, añadiendo a la solución plasma autólogo y ACD con excelentes resultados y viabilidad por encima de 80%. Incluso es ampliamente conocido el éxito en algunos trasplantes autólogos con médula ósea conservada a sólo 4°C. De esta forma como mencionan Bargay y Besalduch en su editorial de Sangre en 1994 estamos en momentos que invitan a la reflexión para simplificar al máximo el trabajo, facilitar la labor cotidiana y reducir los gastos. Pero lo más importante, hacer accesible a más centros hospitalarios con pocos recursos económicos, métodos de criopreservación para llevar a cabo mayor número de trasplantes en el mundo.

## Referencias

1. **Polge C, Smith AU, Parkes AS.** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949;164: 666.
2. **Barnes DWH, Loutit JF.** The radiation recovery factor: preservation by the palge-smith-parkes technique. *J Natl Cancer Inst* 1955;15:901- 906.
3. **Gorin NC.** Collection, manipulation and freezing of haemopoietic stem cell. In: *Clin Haematol* 1986;15:19-48.

4. **Stiff PJ, Koester AR, Weidner MK, Dvorak K, Fisher R.** Autologous Bone Marrow transplantation using unfractionated cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing. *Blood* 1987;70:974-78.
5. **Leibo SP et al.** Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: interacciones of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose or glycerol. *Criobiology* 1970;6:315- 332.
2. **Soler MA, Carpio N, Carbonell F, Ródenas T, Pardo R.** Técnicas para la criopreservación e infusión de células hematopoyéticas circulantes. *Sangre* 1991, Vol.36;Suppl. 3:185- 188.
6. **Pérez de Oteyza J, et al.** "Criopreservación de precursores hematopoyéticos" en "Obtención y manipulación de precursores hematopoyéticos" (manual de Técnicas 1994). Grupo de criobiología y biología del TMO. Asociación Española de Hematología y Hemoterapia.
7. **Lakota J. Fuchsberger P.** Autologous stem cell transplantation with stem cells preserved in the presence of 4.5 and 2.2% DMSO. *Bone Marrow Transplantation* 1996;18:262-263.
8. **Galmés A, et al.** Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide at -80°C without rate-controlled freezing. *Transfusion* 1996;36:794-797.
9. **Hernández Navarro et al.** Hematopoietic cell transplantation using plasma and DMSO without HES, with non-programmed freezing by immersion in a methanol bath: results in 213 cases. *Bone Marrow Transplantation* 1998;21:511-517.
10. **Delgado MD, et al.** Protocolo de Congelación de Células Hematopoyéticas a -80°C. Hosp. Juárez de México. Memorias de la Jornada anual C-101. Trabajo presentado en la XL Jornada Anual de la AMEH en Tuxtla Gtz, Chis: 1999.
11. **Balint B, Ivanović Z, Petakov M, Taseski J, Joveić G, Stojanović N, Milenković.** The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of marrow repopulating ability. *Bone Marrow Transplantation* 1999;23:613-619.