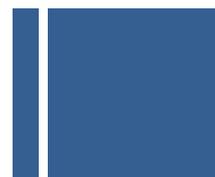


Modelado matemático e
implementación práctica de
sistema de vitrificación ultra-
rápida mediante radiación láser



CAPÍTULO I

GENERALIDADES DE LA CRIOPRESERVACIÓN



1. INTRODUCCIÓN A LA CRIOBIOLOGÍA

La Criobiología es la parte de la Biología que estudia los efectos producidos por las bajas temperaturas en células, tejidos, órganos y organismos vivos. En 1940 comenzó la era moderna de la Criobiología con la publicación de la obra de Luyent “Vida y muerte a bajas temperaturas”.

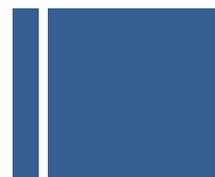
El frío tiene el poder de preservar así como el poder de destruir. Gracias a los avances científicos, se han podido extraer proteínas de mamuts con más de doce mil años de antigüedad [Prager et al., 1980] y su ADN [Jonson et al., 1985], tras más de cincuenta mil años de almacenamiento a bajas temperaturas. Estos hallazgos suponemos que posibilitarán en un futuro (cuestiones éticas aparte) la clonación y/o recuperación de numerosas especies extintas o en peligro de extinción. Hay que tener en cuenta, no obstante, que probablemente fue ese mismo frío la causa de su muerte.

Un problema aún sin solventar y de vital importancia en biología y todas las disciplinas que se basan en el uso de material biológico es su almacenamiento, jugando un papel especialmente relevante dentro de muchas parcelas de la actividad humana: agricultura (semillas) y ganadería (semen), trasplantes, etc. Dicho almacenamiento a largo plazo requiere de la utilización de muy bajas temperaturas, típicamente de entre -140°C y -180°C .

Está demostrado que existe una relación directa entre la temperatura de almacenamiento y el tiempo durante el que la muestra sigue siendo viable tras su criopreservación. Fue el premio nobel sueco Svante August Arrhenius quien en 1898 desarrolló la ecuación que establece la influencia del descenso de la temperatura en la evolución de las reacciones químicas.

A temperaturas inferiores a -140 grados centígrados, la actividad metabólica se detiene, pudiendo hablar entonces de preservación efectiva. Sin embargo, el enfriamiento tradicional de material biológico hasta estas temperaturas provoca indefectiblemente la formación de cristales de hielo, letales salvo en raras excepciones.

Desde que se iniciaran hace 50 años los primeros experimentos de preservación en frío se ha avanzado notablemente en el conocimiento de los procesos que tienen lugar cuando se enfría una muestra biológica consistente en un conjunto de células aisladas en suspensión (ni tejidos ni órganos), sobre todo en células reproductoras. En este caso, estas estrategias están basadas en la incorporación de agentes protectores frente al frío así como en la optimización de las velocidades de enfriamiento y recalentamiento, de tal forma que se eviten los diferentes fenómenos físicos y biológicos que puedan acarrear la muerte de la muestra.



El problema de la preservación de material biológico de mayores dimensiones, tales como tejidos u órganos, aún no ha podido ser resuelto satisfactoriamente mediante la utilización de agentes crioprotectores. El motivo principal son las concentraciones requeridas para una preservación efectiva, en torno a 8 molar (8 moles de agente crioprotector por cada litro de disolución). Dichas concentraciones resultan con bastante frecuencia tóxicas para los organismos a criopreservar. Existen además otros muchos problemas asociados a la criopreservación, tales como:

- Elección de la velocidad óptima de enfriamiento.
- Elección del tipo de crioprotector adecuado.
- Conductividad térmica finita del medio.
- Diversidad citológica, en el caso de organismos complejos.
- Lenta perfusión del crioprotector.
- Proceso de desvitrificación (formación de hielo durante el retorno a temperatura ambiente).

2. FUNDAMENTOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN

2.1. EL AGUA Y EL HIELO EN LA CÉLULA

“Es el agua con sus preciosas y raras características y no el ADN, la molécula fundamental de la vida” [Muldrew et al., 1997]. En células animales constituye alrededor del 80% de su volumen, en vegetales como la lechuga, el 95% mientras que en el otro extremo de la escala nos encontramos algunos tipos de esporas con un 5%; por debajo de este porcentaje los organismos se encuentran en un estado inanimado en el cual se detienen sus procesos bioquímicos.

Una célula es básicamente un pequeño saco que encierra una disolución de agua y sales. A este saco le rodea una membrana semipermeable, un tejido especial que solo permite el paso de agua a través de él pero no así las sales que tiene disueltas. Por ello, cuando a través de los diferentes procesos que veremos más adelante el agua entra o sale de la célula, la concentración de las sales disueltas aumenta o disminuye.

En los diferentes modelos y experimentos contemplados en este proyecto la muestra considerada siempre se modelará como si de agua pura se tratase, desde el punto de vista de sus constantes físicas, tales como conductividad térmica, difusividad, etc.

La molécula de agua está compuesta por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno, unidos por dos enlaces covalentes dispuestos de tal forma que el átomo de oxígeno se rodea de ocho electrones de valencia, la cual constituye una configuración más estable. Este hecho provoca que dicho átomo disponga de una carga neta negativa, mientras que los átomos de hidrógeno una carga neta positiva.

Como consecuencia de esta disposición atómica las moléculas de agua se atraen entre sí, con un enlace intermolecular conocido como puente de hidrógeno; dicho enlace se considera débil pero otorga al agua unas propiedades muy particulares, que juegan un papel esencial en el desarrollo de la vida orgánica.

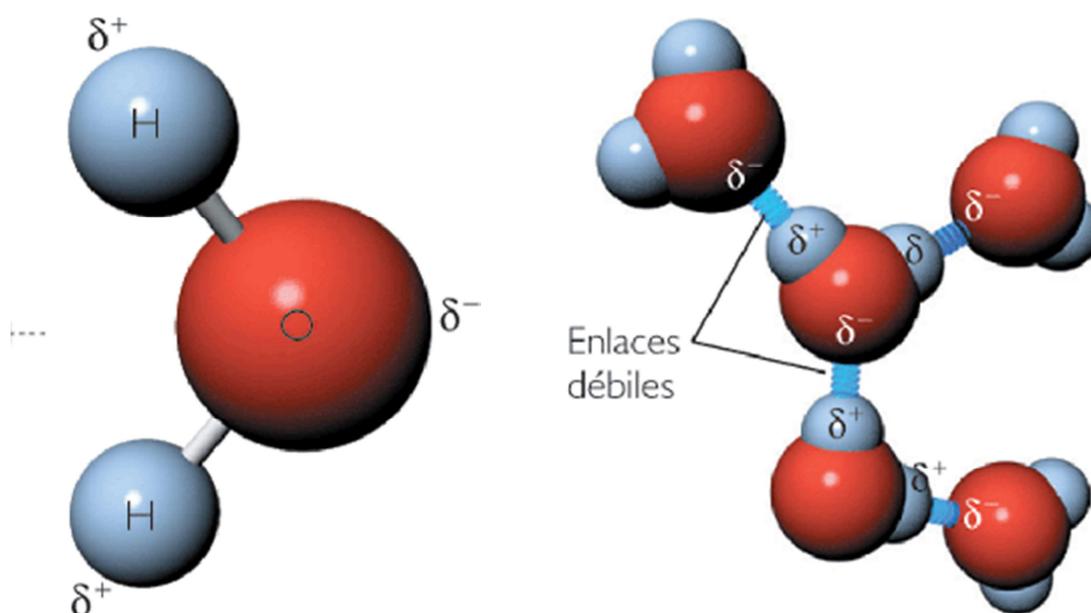
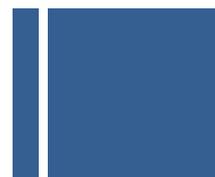


Figura 1. A la izquierda se muestra una representación de la disposición atómica de la molécula de agua. La derecha puentes de hidrógeno formando una estructura tetraédrica.

El agua pura se congela a presión atmosférica a 0 grados centígrados. Sus moléculas estructuradas de forma tetraédrica debido a los puentes de hidrógeno, se agrupan de manera compacta, por lo que la densidad de hielo será menor que la del agua.



2.2. PRINCIPIOS FÍSICO-QUÍMICOS DE LA PRESERVACIÓN EN FRÍO

Bastan dos principios físicos para explicar lo que tiene lugar en la célula mientras se produce el proceso de enfriamiento: el principio de descenso crioscópico y el principio de ósmosis.

DESCENSO CRIOSCÓPICO

El descenso crioscópico es una propiedad **coligativa**, es decir, depende únicamente de la concentración de soluto, y no de la naturaleza del mismo y establece que si se tiene agua pura y disolvemos sales en ella, entonces el agua no se congelará a 0°C, sino por debajo de esta temperatura, tanto más baja cuanto mayor es la cantidad de sal que se haya disuelto en ella.

Consiste pues, en la disminución del punto de fusión de la disolución con respecto al del disolvente puro, y es consecuencia directa de la disminución de la presión de vapor por parte del disolvente al agregarle un soluto. Esta propiedad explica la razón por la cual el agua disuelta con sales, en fase líquida, a temperaturas inferiores a 0 grados centígrados sigue encontrándose en una fase estable. El descenso crioscópico es directamente proporcional a la molalidad (número de moles de soluto por kg de disolvente) y para una solución ideal y diluida, dicho descenso en la temperatura de congelación se puede expresar como:

$$\Delta T \approx \frac{R(T_f)^2}{\Delta H_f} x_B$$

Donde ΔT es el descenso crioscópico, T_f es la temperatura de fusión, ΔH_f la entalpía de fusión y x_B la fracción molar del soluto presente.

En la figura siguiente se muestra el efecto del descenso crioscópico, ΔT , de tal forma que para una misma presión la temperatura del punto de fusión para una solución acuosa es menor que para el agua pura.

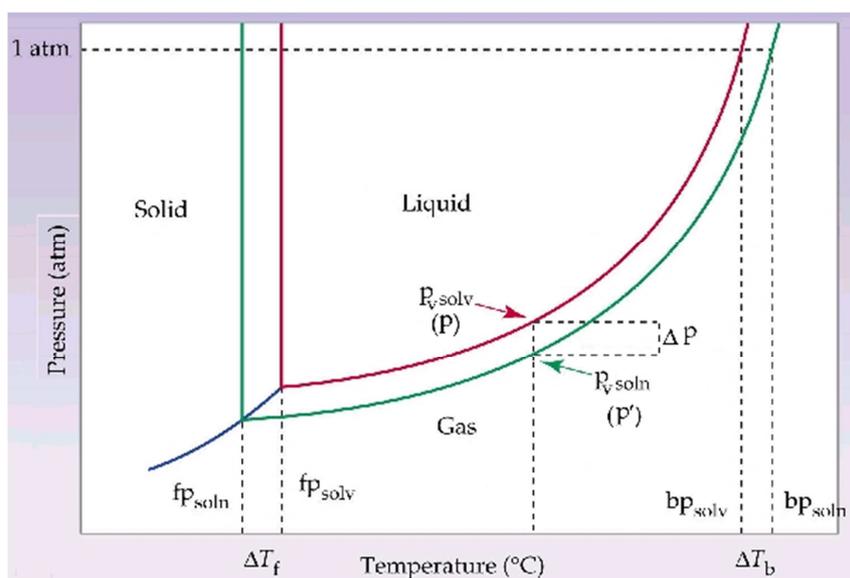


Figura 2. Diagrama P-T del agua. Descenso crioscópico

PRINCIPIO DE ÓSMOSIS

El principio de ósmosis establece que cuando se tiene una célula semipermeable sumergida en una disolución salina, entonces el agua empieza a fluir en un sentido tal que tiende a igualar las concentraciones de las disoluciones. Es decir, si se sumerge la célula en una disolución de sales más concentrada que el interior celular, entonces el agua (y sólo el agua) sale de la célula, a consecuencia de lo cual ésta se encoge y reduce su volumen. Si por el contrario, se sumerge la célula en una disolución más diluida que el interior celular, entonces empezará a entrar agua dentro de la célula intentando diluir la disolución salina de su interior; a consecuencia de esto la célula se hincha.

La ósmosis, en resumen, es una difusión pasiva a través de una membrana semipermeable, en la cual, las partículas de soluto se dirigen desde la solución más concentrada a la menos concentrada, con una determinada tasa, hasta alcanzar el equilibrio.

La presión osmótica es la diferencia de presiones que sufre una membrana semipermeable que separa dos sistemas con distintas concentraciones de soluto.

Las membranas biológicas se comportan como membranas semipermeables. La ósmosis se debe a que la membrana semipermeable impide el paso de soluto, del medio más concentrado al menos concentrado, por lo que en el caso de la célula, al introducirla en un medio con una concentración de sales superior al interior celular, medio hipertónico, la célula expulsará agua,

por lo que se encoge y consecuentemente se reduce su volumen. Por otra parte, en el interior de la célula, la concentración de sales será mayor, por lo que desciende el punto de congelación.

La figura siguiente muestra las variaciones de volumen que experimentan los glóbulos rojos debido al principio de ósmosis anteriormente descrito. Cuando se sumerge en un medio hipotónico, es decir, con una menor concentración de soluto extracelular, la célula incrementa su volumen al absorber disolvente procedente del medio exterior. En cambio, si la solución extracelular es hipertónica, la célula experimentará una retracción. En el caso de medio isotónico, no se produce difusión, puesto que se encuentra en equilibrio.

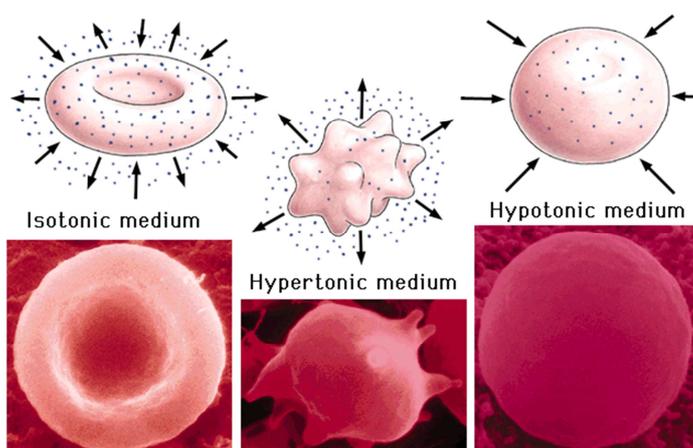
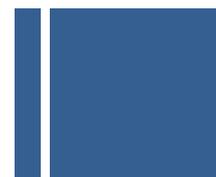


Figura 3. Consecuencia de la ósmosis en los glóbulos rojos
FUENTE: [Osmosis and redblood cells –www.NDP teachers.org]

Basándonos en estos dos principios la cadena de eventos que tiene lugar durante la criopreservación es la que se describe a continuación.

Cuando se tiene un conjunto de células que se quiere conservar en frío inicialmente las células se tienen sumergidas en el interior de un recipiente que contiene una solución salina isotónica, es decir, con la misma concentración que el interior celular. Basándonos en estos principios de descenso crioscópico y de ósmosis la cadena de eventos que tiene lugar durante el proceso de criopreservación es por tanto la que se refiere a continuación.

Cuando se empieza a enfriar el preparado celular, el frío alcanza antes la solución exterior que el interior celular. Esto trae como consecuencia que se empiece a formar hielo en el medio extracelular cuando no se ha formado aún hielo dentro de la célula. A medida que se forma el



hielo extracelular el agua líquida va desapareciendo. Al disminuir la cantidad de agua exterior, en base al principio de ósmosis antes enunciado, empezará a salir agua de la célula para compensar la posible diferencia entre las concentraciones intra y extracelulares.

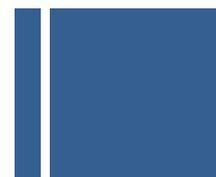
Al salir agua de la célula, la sal que estaba disuelta en su interior empezará a estar más concentrada: tanto más concentrada cuanto más agua se expulsa; es aquí cuando interviene el principio de descenso crioscópico dado que a pesar de estar más concentrada la disolución salina intracelular, la temperatura a la que se formará hielo desciende: será más difícil que el agua de dentro de la célula se congele y dañe sus estructuras. Así, mientras se enfríe poco a poco, el proceso continuará indefinidamente: crecerá el hielo extracelular, saldrá agua de la célula para compensar las concentraciones salidas dentro y fuera, se concentrará la sal dentro de la célula y descenderá aún más la temperatura necesaria para que se forme hielo dentro. Por ello, con una velocidad de enfriamiento suficientemente lenta podemos evitar por completo la formación del dañino hielo intracelular.

No obstante conviene mencionar que la no formación de hielo mediante este procedimiento no es sinónimo de supervivencia celular dado que aún cuando no llegue a formarse aparecen dos nuevos factores que pueden perjudicar gravemente a la célula. Por una parte está el hecho de que en cierto instante la concentración de sales dentro de la célula llega a ser tan alta que resulta muy tóxica. Por otra parte, al salir tanta agua de la célula su volumen disminuye peligrosamente, produciendo deformaciones estructurales irreversibles. Estos dos factores son tanto o más perjudiciales si cabe que la formación de hielo intracelular; es por ello que en los protocolos de preservación de células aisladas hay que enfriar a una velocidad que sea lo suficientemente lenta como para evitar en lo posible la formación de hielo intracelular, pero a su vez, lo suficientemente rápida como para no producir una deshidratación excesiva que conlleve una destrucción irreversible de la estructura celular.

2.3. AGENTES CRIOPROTECTORES (ACP)

Los agentes crioprotectores son sustancias hidrosolubles en agua capaces de modificar las propiedades fisicoquímicas de las soluciones acuosas presentes en la materia viva. La función de los crioprotectores variará dependiendo del tipo elegido. No obstante sus funciones principales son promover una rápida deshidratación celular, y amortiguar el efecto de la alta concentración de solutos en el interior de la célula u organismo a criopreservar. Tras añadir los agentes crioprotectores, se produce la cadena de eventos detallada anteriormente.

En resumen, al existir una diferencia de concentración, por el fenómeno de ósmosis, el agua fluye a través de la membrana semipermeable hasta el exterior celular, aumentando la concentración de sales en el interior. Como consecuencia, al estar más concentrada la



disolución salina intracelular, la temperatura a la que se formará hielo descende: será más difícil que el agua de dentro de la célula se congele y dañe sus estructuras. El problema reside en que las altas concentraciones requeridas para criopreservar de forma efectiva pueden resultar tóxicas para el organismo a criopreservar.

Bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de crioprotectores: los alcoholes, azúcares y el dimetilsulfóxido (DMSO). No obstante los crioprotectores se catalogan en base a diversos criterios, especialmente de acuerdo al grado de protección al cristal de agua, a la toxicidad química que pueden tener sobre las células y a la velocidad para penetrar los tejidos.

El grado de protección a las células está directamente vinculado al grado de asociación que tengan con el agua molecular. A mayor afinidad, menor el agua disponible para la cristalización dañina. Además, estos productos se utilizan en conjunto con los medios nutritivos líquidos que conforman las mezclas congelantes.

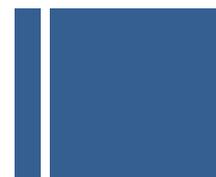
Las concentraciones crioprotectoras son lamentablemente tóxicas para el tejido a temperatura ambiente, por lo cual en el procedimiento de congelado se deben respetar ciertos tiempos de exposición del material a 4°C, para que el producto protector penetre el tejido sin alcanzar los niveles tóxicos referidos, antes del inicio del proceso de congelación propiamente dicho. En el mismo sentido, cuando se procede a la técnica de descongelado, previamente al uso del material, se le debe someter a un lavado minucioso con medios nutritivos a concentraciones decrecientes del crioprotector, para su total eliminación evitando de esta forma los efectos tóxicos.

A este respecto fue el profesor David Pegg de la Universidad de York, quien descubrió que los cambios bruscos en la concentración de una solución lleva aparejada una disminución de la supervivencia de las células suspendidas de tal forma que incluso bajas concentraciones a temperatura ambiente llegan a ser letales para el material biológico a criopreservar.

La recuperación de dicho material está estrictamente vinculada no sólo con la temperatura, sino también con el tiempo de exposición al crioprotector. La relación que muestra esta dependencia es exponencial y fue presentada por Gregory Fahy en 2005, a través de la expresión siguiente:

$$\text{recuperacion} = 100e^{-\beta t}$$

Donde t es el tiempo y β una constante que depende del crioprotector empleado y de la temperatura.



De acuerdo a la permeabilidad celular se pueden considerar dos tipos de crioprotectores:

- **Crioprotectores no penetrantes**

Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, caracterizadas por ejercer su acción protectora promoviendo la rápida deshidratación celular, por lo que suelen utilizarse asociados a los agentes penetrantes.

Los más utilizados son: sacarosa, dextrosa, glucosa, polivinilpirrolidona (PVP), dextranso y polietilenglicol.

- **Crioprotectores penetrantes**

Son sustancias de bajo peso molecular que penetran en el interior de la célula y actúan deshidratando la célula por sustitución del agua intracelular, amortiguando el incremento de concentración de solutos en el medio extracelular, impidiendo la formación de cristales en el interior y evitando el estrés osmótico. Los más empleados son el 1-2 propanodiol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol y glicerol.

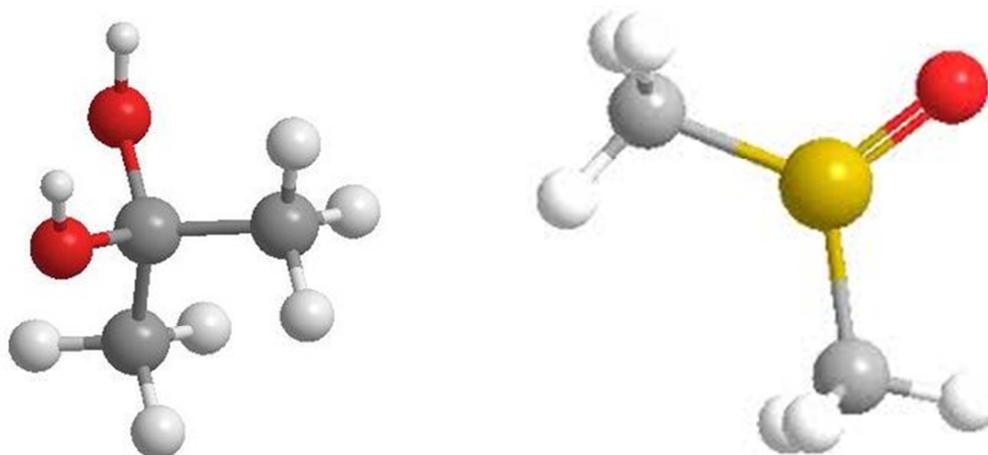


Figura 4. A la izquierda se muestra una representación tridimensional del propanodiol. A la derecha se representa modelo tridimensional del Dimetilsulfóxido (DMSO).

Los crioprotectores que penetran la célula reemplazan el agua, es decir, entra el agente crioprotector y sale el agua. El no penetrante, en cambio, evita el arrugamiento excesivo de la membrana plasmática, que ocurre cuando entra crioprotector y sale agua, ya que las velocidades son diferentes (sale más rápido el agua). Por lo tanto, en criopreservación, se utiliza una mezcla de crioprotectores penetrantes y no penetrantes.

Numerosos estudios ponen de manifiesto la dependencia de la velocidad de enfriamiento de algunos crioprotectores, como el 1-2 propanodiol, con la concentración de crioprotector, demostrándose que éste aumenta de forma logarítmica al disminuir la cantidad de crioprotector. Esto supone que podremos disminuir la cantidad de crioprotector necesaria hasta unas concentraciones que no resulten tóxicas para el organismo a criopreservar, aumentando la velocidad de enfriamiento. En la siguiente gráfica podemos observar como disminuye la cantidad de hielo formado al aumentar la cantidad de crioprotector, en este caso, dimetilsulfóxido (DMSO). [Fuller et al., 2004].

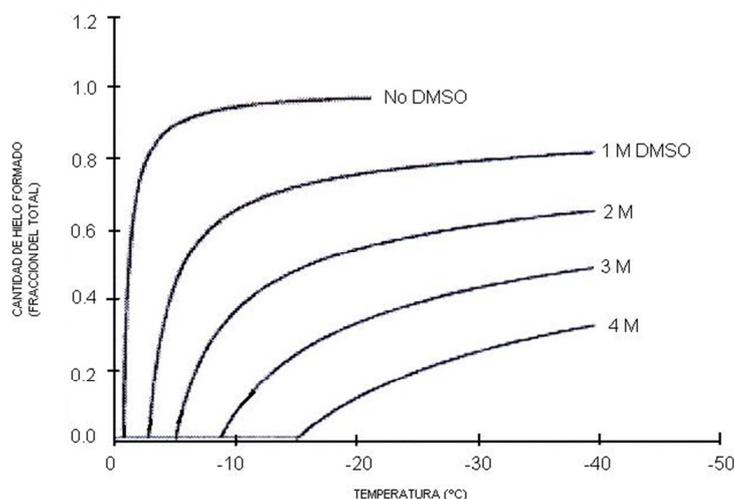
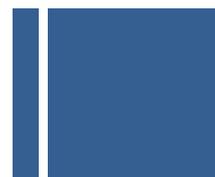


Figura 5. Cantidad de hielo formado en una solución 0.5M de NaCl con diferentes concentraciones de DMSO.
Fuente: Fuller et al, 2004

2.4. AGENTE CRIOGÉNICO

Tradicionalmente se han empleado como contenedores de muestras a criopreservar pajuelas de 0.25 ml de capacidad. Para conseguir un descenso rápido de la temperatura, la técnica más utilizada es la inmersión de dicha pajuela en nitrógeno líquido (-196 °C). Es un error pensar que las temperaturas alcanzadas con este procedimiento, son siempre capaces de vitrificar las muestras [Risco et al, 2007]. La transferencia de calor en las mismas presenta numerosos problemas, entre ellos el efecto Leidenfrost, que consiste en la formación de una capa de vapor alrededor de la muestra durante la inmersión en el líquido criogénico desde temperatura ambiente. Si disminuye este efecto, se reduce la capa de vapor aislante y conseguimos un incremento en la tasa de enfriamiento.



Con objeto de solventar este problema durante la ejecución de los experimentos se plantearon dos opciones:

- Emplear como agente criogénico nitrógeno slush es decir nitrógeno líquido subenfriado (-210°C) con partículas sólidas en él, que es una mezcla bifásica entre sólido y líquido cuya principal ventaja no solo reside en la diferencia de temperatura con respecto al nitrógeno líquido sino en la reducción del efecto Leidenfrost.

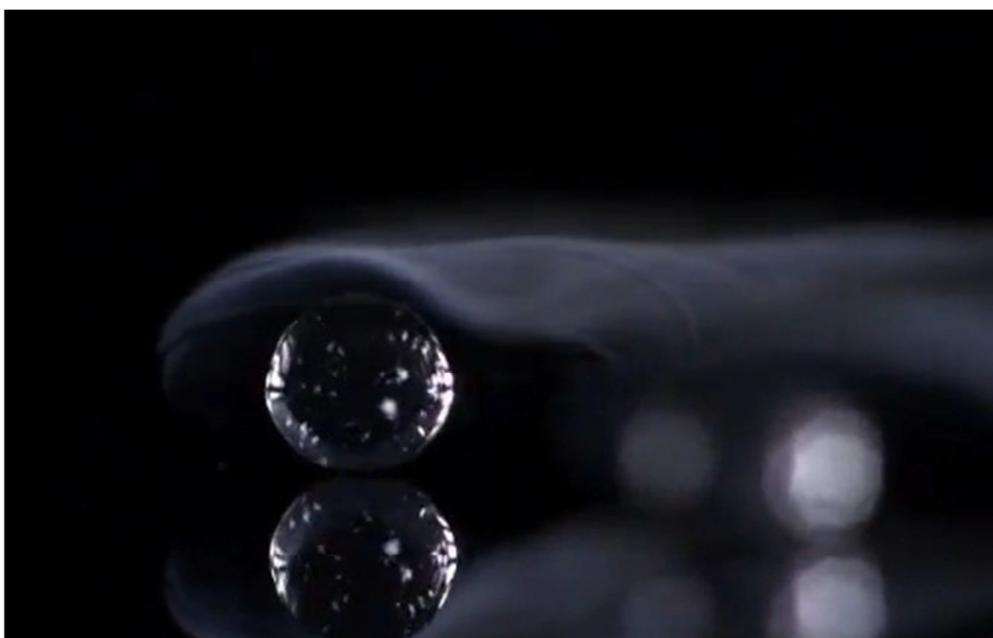


Figura 6. Efecto Leidenfrost.
Fuente: The modernist cuisine

- Utilizar nitrógeno gaseoso como método para actuar sobre la muestra. Para ello se parte del nitrógeno gaseoso almacenado en condiciones adecuadas de presión y temperatura en su recipiente contenedor. A través de una unión T en los conductos de salida, ésta se bifurca ofreciendo dos caminos para el gas, uno de los cuales se hará pasar por un serpentín inmerso en nitrógeno líquido, logrando un descenso de temperatura notable del propio gas. Los trayectos seguidos por el gas a diferentes temperaturas terminan cada uno de ellos en una electroválvula gestionada por el sistema de control que permite obtener una mezcla a la salida con una temperatura controlada de forma que se puede implementar una rampa de descenso de temperatura acorde con el funcionamiento del láser con objeto de lograr una temperatura estable de 37°C en la muestra de una forma suave mientras que el

Modelado matemático e
implementación práctica de
sistema de vitrificación ultra-
rápida mediante radiación láser

entorno de la misma puede alcanzar los -150°C . **Este sistema fue el que finalmente se utilizó dado que ofrece un mayor control del enfriamiento del entorno de la muestra.**

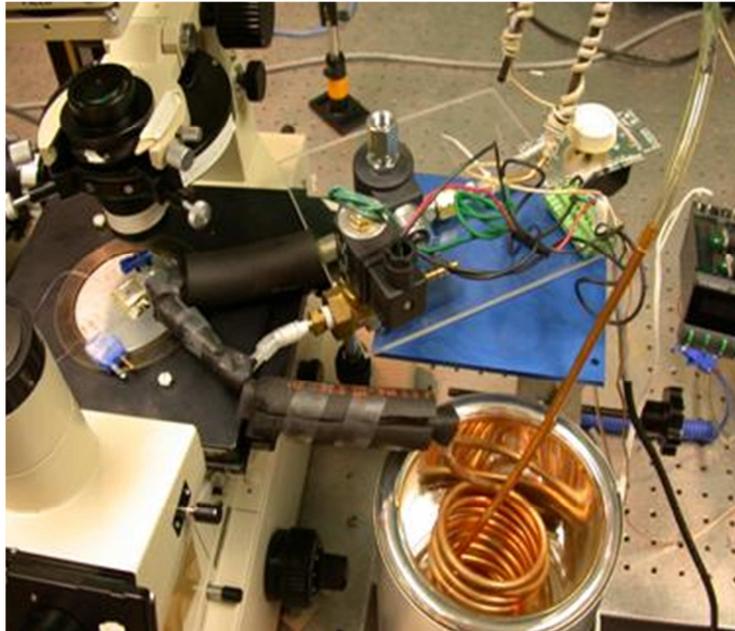


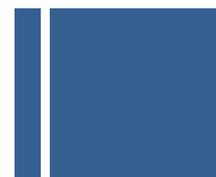
Figura 7. Montaje sistema actuación agente criogénico
Fuente: Grupo Cryobiotech.

2.5. MECANISMOS DE DAÑO BIOLÓGICO

Citando al profesor M. Kasai, sobre los daños durante el proceso de criopreservación, [Kasai et al., 1996]:

“Típicamente podemos encontrarnos seis tipos de daños durante el proceso de criopreservación:

- *Hielo intracelular*
- *Excesiva toxicidad del crioprotector*
- *Incremento de la presión osmótica*
- *Reducción de la presión osmótica*
- *Daño de fractura*
- *Hielo extracelular*



Durante la vitrificación es fundamental controlar las condiciones de manipulación del embrión, ya que una leve diferencia en la misma puede suponer una gran disminución de la tasa de supervivencia obtenida tras la criopreservación, [Kasai et al, 2002]. Además la concentración de la solución de vitrificación que rodea cada embrión variará dependiendo de la manipulación al usar los diferentes instrumentos, como por ejemplo la pipeta.

Para encontrar las condiciones óptimas en la criopreservación de un embrión, es fundamental identificar el mecanismo por el cual se produce el daño en cada protocolo o procedimiento.

Los embriones corren el riesgo de sufrir varios tipos de daño durante la criopreservación. Los principales daños son el hielo intracelular y los relativos a un exceso en la concentración de soluto, dada su elevada toxicidad. La velocidad de enfriamiento, nos determinará a qué tipo de daño estamos más expuestos. Por ejemplo, si criopreservamos embriones mediante slow freezing, la principal causa de daño es el hielo intracelular, esto es consecuencia del proceso de ósmosis y el principio del descenso del punto de congelación, [Wittingham et al, 1972]. Por otra parte en vitrificación el efecto de la toxicidad en una alta concentración de crioprotector es el mayor obstáculo [Rall and Fahy, 1985]. Por otro lado, es importante considerar que la estrategia para disminuir estos daños, es completamente distinta según el tipo de daño.

La introducción del crioprotector en la célula puede producir un tercer tipo de daño, el aumento de la presión osmótica. Durante el proceso de recalentamiento, en el proceso de extracción del crioprotector, el agua entra más rápidamente de lo que sale el crioprotector. Para prevenir esto, empleamos una solución decreciente con sacarosa, junto con soluciones decrecientes de crioprotector [Kasai et al, 1980; Leibo, 1983]. No obstante una solución con demasiada sacarosa, puede producir una reducción de la presión osmótica [Pedro et al, 1997].

Además las células corren el riesgo de sufrir hielo extracelular y fractura plana.

El daño de fractura es la disección física de los embriones, el cual se produce por un cambio no uniforme en el volumen del medio, originado durante un cambio rápido de fase [Kroener and Luyet, 1996; Rall and Meyer, 1989]. Las células pueden sufrir daños físicos extracelulares, si durante el proceso de descongelación, existe una parte localizada, que posee una temperatura muy inferior al resto [Schneider and Mazur, 1987].”

La formación de hielo comienza en el exterior celular (de -2°C a -5°C). Tras este hecho, dependiendo de la velocidad de enfriamiento, se producirán distintas consecuencias.

- Si el proceso de enfriamiento es suficientemente lento, entonces no se forma hielo intercelular. Si embargo, una excesiva pérdida de agua por parte de la misma puede resultar letal, ya que da lugar a una reducción de volumen, que en algunos casos resulta irreversible y a un aumento del hielo extracelular.
- Si se enfría a una velocidad intermedia entonces sí se produce hielo intracelular y extracelular, ya que la célula no se deshidrata suficientemente y por tanto el descenso del punto de congelación no llega a ser el necesario para conseguir un resultado óptimo.
- Cuando se enfría a velocidades muy altas se produce vitrificación, evitando la formación de hielo intracelular y disminuyendo el hielo extracelular.

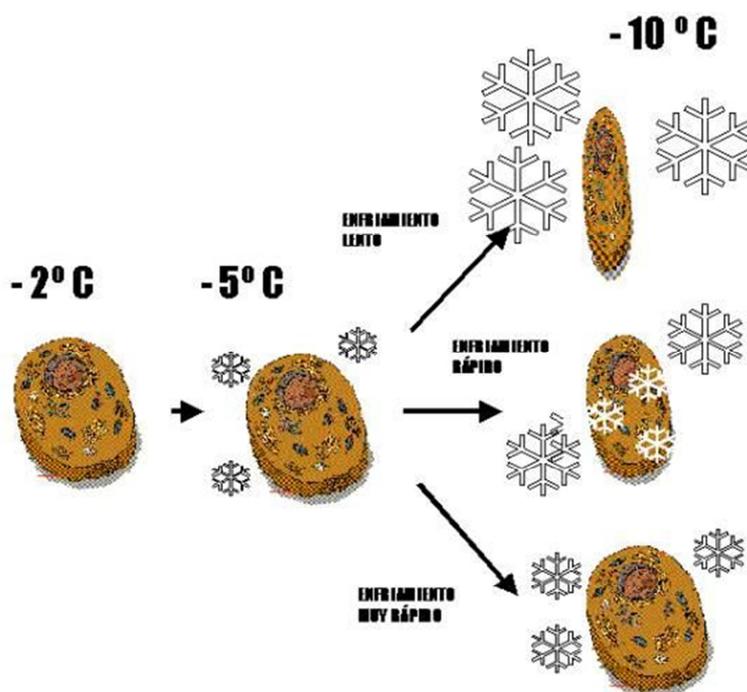
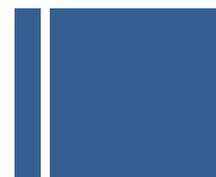


Figura 8. Esquema de los sucesos físicos que ocurren durante el enfriamiento
Fuente: Grupo Cryobiotech.



3. PROTOCOLOS CONVECIONALES DE CRIOPRESERVACIÓN

Hay dos enfoques tradicionales para la criopreservación de material biológico: el slow freezing y la vitrificación siendo esta última la más extendida. Se clasifican según la velocidad de enfriamiento empleada.

3.1. ENFRIAMIENTO LENTO O “SLOW FREEZING”

Para emplear este método de criopreservación se emplean velocidades de enfriamiento bajas y consiste en someter al organismo biológico a un descenso de temperatura programado, controlando las velocidades de enfriamiento, las cuales variarán entre $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y $-50^{\circ}\text{C}/\text{min}$. De esta forma, se consigue una nucleación controlada formándose hielo extracelular, pero evitando la formación de hielo intracelular que resulta letal para el organismo.

DAÑOS POR ENFRIAMIENTO LENTO (SLOW FREEZING)

Durante el slow freezing la temperatura disminuye lentamente. El agua intracelular abandona la célula evitando la formación de hielo intracelular, pero obteniéndose como consecuencia el aumento del hielo extracelular. La célula se deshidrata, por lo que disminuye su volumen bruscamente; esto puede provocar deformaciones críticas en la muestra biológica.

Otra consecuencia de la disminución de agua en el medio intracelular, es el aumento de la concentración de soluto, especialmente de electrolitos Na^+ , K^+ , Ca^+ , Cl^+ , etc, tóxicos para nuestro organismo. Lovelock propuso en la década de 1950 que son precisamente estos electrolitos los responsables de los daños en las células. También expuso que los crioprotectores al encontrarse disueltos en el interior celular, disminuían la concentración de los electrolitos, protegiendo al material biológico de la toxicidad de los mismos.

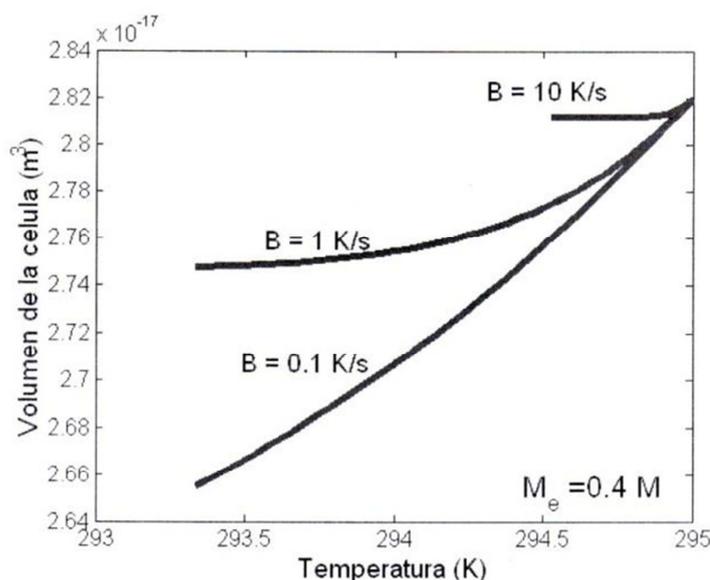


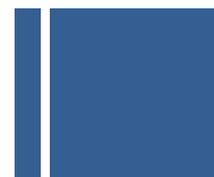
Figura 9. Deshidratación de un espermatozoide humano a distintas velocidades de enfriamiento. Según la ecuación de Arrhenius la conductividad decrece con la temperatura, por lo que la deshidratación es mucho menos acusada con el incremento de la velocidad de enfriamiento [Mazur et al, 1996]

3.2. VITRIFICACIÓN

La vitrificación es la solidificación amorfa debido a un enfriamiento ultrarrápido de la muestra evitando la formación tanto de hielo intracelular como extracelular. Esta técnica fue descubierta hace 50 años por C. Polge [Polge et al, 1949] y J. Lovelock [Lovelock, 1953].

La no formación de hielo mediante este procedimiento no es sinónimo de supervivencia celular, ya que a pesar de no formarse hielo, existen otros factores que perjudican gravemente la célula. Por una parte está el hecho de que en cierto instante la concentración de sales dentro de la célula llega a ser tan alta que resulta muy tóxica. Por otra parte, al salir tanta agua de la célula su volumen disminuye peligrosamente, produciendo deformaciones estructurales irreversibles.

Existen diferentes estrategias para lograr la vitrificación, pasando todas ellas por la utilización de una alta concentración de agentes crioprotectores (etilenglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO) o 1,2 propanodiol), hasta 8 M en algunos casos [Kasai et al, 2002]. Además, para conseguir una adecuada vitrificación se necesitan generalmente velocidades de enfriamiento muy elevadas, del orden de decenas de miles de grados por minuto.



Generalmente se emplea nitrógeno líquido como solución criogénica. Las modificaciones en dicha solución también incrementan de forma notable la tasa de enfriamiento. Como alternativa al nitrógeno líquido, se ha explotado también el uso de propano como solución criogénica [Steponkus et al, 1990], sin embargo, la permeabilidad de las células a esta molécula limita su utilización. Otra posibilidad es el uso de mezclas criogénicas como slush (nitrógeno líquido subenfriado procedente del cambio de fase de nitrógeno líquido) o slurry (mezla de nitrógeno líquido con diferentes partículas como cobre en polvo o cloruro de sodio, dependiendo de las características de la muestra a criopreservar). La utilización del nitrógeno slush reduce el efecto Leidenfrost, es decir disminuye la formación de la capa de vapor que se forma alrededor de la muestra e impide una transferencia de calor eficiente [Mazur et al, 2004].

La gráfica siguiente muestra la dependencia de la tasa de supervivencia con la velocidad de enfriamiento. No obstante, la forma de las curvas, el nivel de supervivencia y la velocidad de enfriamiento para la cual la criopreservación es efectiva depende del tipo celular empleado.

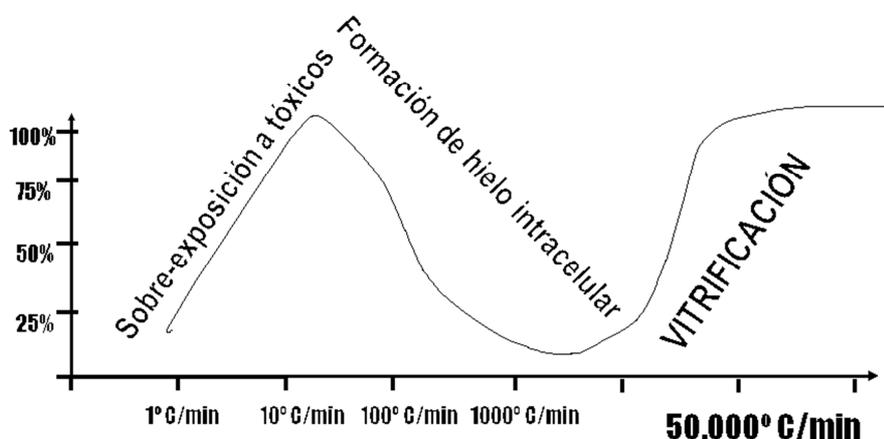
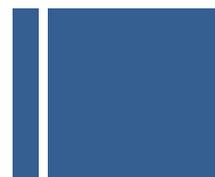


Figura 10. Velocidad de enfriamiento frente a porcentaje de supervivencia
Fuente: Grupo Cryobiotech.

Son tres los parámetros biológicos que tiene especial influencia en la posición y forma de las curvas de supervivencia: la energía de activación, la permeabilidad del agua y el tamaño de la célula, o más concretamente la relación volumen/área [Mazur et al, 1996]. Un incremento en la permeabilidad del agua tiene un efecto comparable a un decremento de la velocidad de enfriamiento. El efecto que produce el tamaño de la célula es contrario, es decir un incremento en el ratio volumen-área, reduce la velocidad de enfriamiento requerida para producir hielo intracelular con la misma probabilidad. Las gráficas siguientes muestran la tasa de supervivencia de diferentes organismos a distintas velocidades de enfriamiento, observándose



en ellos un comportamiento en forma de U invertida, característico en este tipo de representaciones:

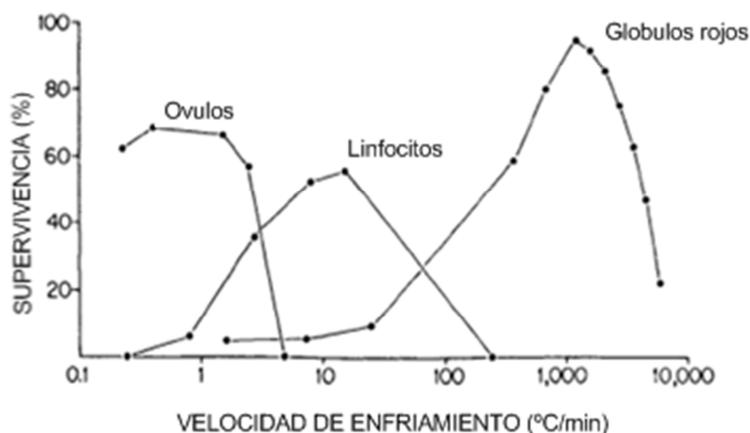


Figura 11. Tasa de supervivencia frente a la velocidad de enfriamiento, para óvulos, linfocitos y glóbulos rojos, a -196°C, en 0.7 a 1 M de Dimetilsulfóxido. [Leibo et al, 1981].

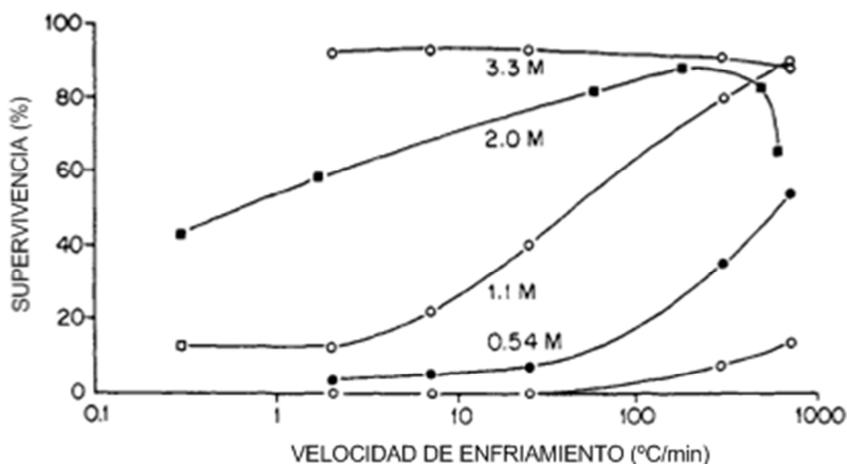
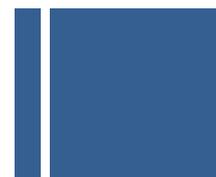


Figura 12. Supervivencia en función de la velocidad de enfriamiento para glóbulos rojos humanos suspendidos en una solución salina que contiene las concentraciones indicadas de glicerol, enfriadas hasta -196°C y recalentadas rápidamente. Datos de Morris y Farrant (1972), Mazur y Miller (1976). Figura modificada de Souzu y Mazur (1978).



Los mejores resultados se han obtenido mediante el uso de técnicas de vitrificación; no obstante los mecanismos clásicos de vitrificación requieren del uso de altas concentraciones de crioprotector, resultando a menudo tóxicas para el organismo a vitrificar.

Existen tipos celulares que no pueden ser criopreservados con facilidad mediante las técnicas convencionales, como por ejemplo los oocitos humanos, ciertas líneas tumorales, etc. En estos casos los mejores resultados se han obtenido mediante el uso de técnicas de vitrificación; no obstante 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 alcanzada por la inmersión directa de la muestra en nitrógeno líquido (varios miles de grados por segundo), y suficiente para vitrificar incluso agua pura.

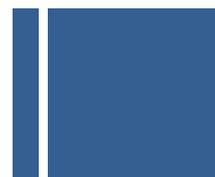
El método aquí expuesto consistiría en la aplicación de una radiación láser infrarroja sobre una célula o conjunto de células mediante el objetivo del microscopio de tal forma que se mantenga la temperatura de la muestra permanentemente a 37°C, aún cuando todo el medio extracelular se va enfriando hasta alcanzar -150°C. Llegados a este punto, se desconecta súbitamente el láser y la célula vitrifica.

La muestra se sitúa en un capilar de policarbonato (técnica novedosa diseñada por D. Ramón Risco) que mejoran la transmisión de calor, la velocidad de enfriamiento y reducen la cantidad de crioprotector necesaria para una vitrificación óptima.

El control de la acción del láser requiere de la medición de la temperatura de la muestra en cada momento mediante algún procedimiento no invasivo, barajándose el uso de Rodamina B, el aprovechamiento del efecto Raman y el uso de un termopar.

DAÑOS ASOCIADOS A LA VITRIFICACIÓN

Durante la vitrificación se alcanzan velocidades de enfriamiento muy elevadas. La célula pierde agua más lentamente, solventándose de esta forma el problema de la alta concentración de soluto en el interior celular. No obstante, al producirse la congelación del medio extracelular, se forma una capa de cristales que rodean la célula. Los Aquaporins son canales proteínicos que permiten la circulación de moléculas de agua. Estos cristales formados en el exterior de la célula entran a través de los aquaporins generándose hielo intracelular que puede resultar letal para la muestra. La estructura dendrítica de los mismos rasga y araña los orgánulos internos e incluso podría llegar a romper la membrana celular. El problema del hielo



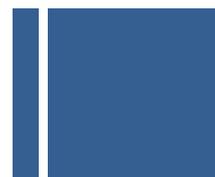
intracelular ha sido analizado en numerosos estudios en el campo de la alimentación, ya que dichos cristales reducen la calidad de los alimentos, suponiendo importantes pérdidas. En el caso de óvulos o células madre, estos cristales pueden suponer la muerte celular.

Por otra parte la vitrificación permite mayor flexibilización en su aplicación que el slow freezing, se efectúa rápidamente, en pocos minutos y elimina la necesidad de mantenimiento de equipos caros [Liebermann et al, 2004]. Su éxito depende básicamente del tiempo de exposición al crioprotector, y de la obtención de una técnica depurada y estandarizada, por lo que se hace imprescindible un personal entrenado adecuadamente.

TIPOS DE CONTENEDORES EMPLEADOS EN LA INMERSIÓN EN NITRÓGENO LÍQUIDO

Para conseguir las velocidades de enfriamiento requeridas para la vitrificación, la técnica más utilizada es la inmersión de las muestras en nitrógeno líquido. Se han desarrollado diversos sistemas, la mayoría de ellos busca el diseño de un contenedor que consiga una transferencia de calor óptima.

- **Rejilla de cobre de microscopía electrónica:** sobre las que se disponen las gotas de la suspensión de células. Posteriormente son sumergidas en nitrógeno líquido [Martino et al, 1996b].
- **“Open Pulled Straws (OPS)” [Vatja et al, 1997] y “Closed Pulled Straws”.** Este contenedor es el más utilizado. Son pajuelas de 0.25 ml de PVC abiertas y cerradas, respectivamente. Se cargan con la suspensión de material biológico y se sumergen en nitrógeno líquido. Este método elimina los problemas de contaminación por contacto directo con el nitrógeno líquido pero reduce la tasa de enfriamiento, dado el gran volumen de la pajuela. Asimismo las altas concentraciones necesarias para cubrir dicho volumen pueden resultar tóxicas para el organismo a vitrificar. [Kuwayama et al, 2007].
- **Crioloops,** este contenedor se caracteriza por su forma, basada en espirales de nylon que se impregnan de la solución de vitrificación donde se encuentra la muestra a criopreservar, en suspensión. Una vez cargado, el anillo se sumerge en nitrógeno líquido [Lane et al, 1997].
- **“Solid-Surface Vitrification (SSV)”**, consiste en lanzar las microgotas de la suspensión de células sobre una superficie metálica enfriada con nitrógeno líquido. [Dinnyes et al, 2000].



- **Cryotop [Hochi et al, 2004; Kuwayama et al, 2005]**. Las muestras son cargadas en un capilar de plástico con un volumen inferior a 0,1 μl y de paredes muy finas. Después se sumerge en nitrógeno líquido. Con este método se consigue minimizar el volumen de la muestra y maximizar la velocidad de enfriamiento, permitiendo disminuir la concentración de crioprotectores.
- **Cryotip [Kuwayama et al, 2005 y 2005b]**, es una modificación del Cryotop. El capilar se encuentra sellado por ambos extremos para evitar la contaminación por contacto directo con el nitrógeno líquido. Se ha visto que la probabilidad de contaminación es baja, por lo que la eficiencia obtenida en ambos casos (Cryotop y Cryotip) es la misma.
- **Cryostage**, sistema en el que se coloca la muestra que se desea criopreservar. Dispone de una ventana transparente a la radiación infrarroja pues como método de calentamiento de la muestra se utilizaría 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. El sistema dispone de una serie de entradas y salidas que se conectarán al sistema de enfriamiento y que internamente se prolonga a una serie de conductos por los que circulará el refrigerante y proporcionará el entorno frío que precisa el mecanismo de vitrificación. Esta fue la primera opción que se barajó como contenedor criogénico y que se propuso en la memoria de solicitud del proyecto de investigación al instituto de salud "Carlos III" (concedido en 2005).
- **Los capilares de policarbonato (PC)**, tiene un diámetro exterior de 0.200 mm y un espesor de 0.016 mm. En la figura siguiente observamos la diferencia de volumen entre el capilar y un OPS con un diámetro de 0.800 mm y espesor de pared de 0.075 mm. En el caso del Cryotop, el diámetro es 0.400 mm y 0.100 mm de espesor. La reducción de volumen que supone el capilar respecto a los otros contenedores, se traduce en una eficiente transferencia de calor, unas 20 veces [Risco et al, 2007]. **Para albergar la muestra se optó por el uso de este tipo de capilares.**

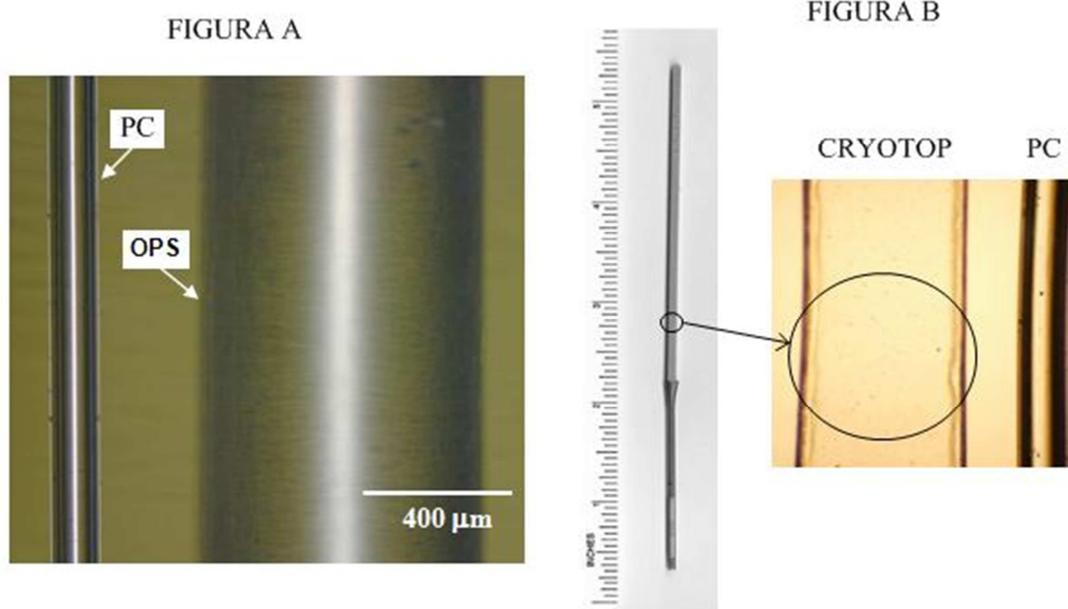
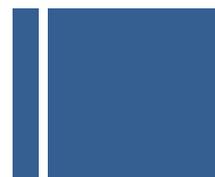


Figura 13. Comparación entre el capilar de policarbonato y otros contenedores utilizados para criopreservar.