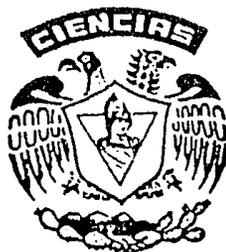


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



EFECTO DEL DIMETIL-SULFOXIDO
EN MACROFAGOS CULTIVADOS.
RECUPERACION DE LA ACTIVIDAD
CELULAR OBSERVADA EN CORTO
TIEMPO.

T E S I S
QUE PARA OPTAR AL TITULO DE
BIOLOGO

P R E S E N T A
RAMON MONTOYA SANCHEZ

MEXICO, D. F. 1969

1650



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTO.

Agradezco sinceramente a la Dirección del Instituto de Investigaciones Biomedicas de la U. N. A. M. las facilidades concedidas para la realización de este trabajo; muy especialmente al personal de la sección de Biología Celular por su valiosa colaboración.

Me es grato también agradecer la entusiasta y firme dirección del Dr. Jorge González Ramirez, así como la colaboración de la Sra. Biol. Angelina Nuñez G. cuyos valiosos consejos y enseñanzas nos llevaron a la culminación del presente trabajo.

Cabe hacer mención de la valiosa ayuda y facilidades prestadas por el C. Director del Instituto de Vacunas y Biológicos de la S. S. A. Dr. Salvador Martín Sosa, lo cual agradezco infinitamente.

Ramón M.S.

Con agradecimiento y cariño
a mis Padres y hermanos.

C O N T E N I D O

	PAG.
INTRODUCCION.....	1
CRIOPRESERVACION.....	3
OBJETO.....	7
DIMETIL - SULFOXIDO.....	7
MATERIALES Y METODOS.....	10
RESULTADOS.....	15
RESUMEN.....	18
CONCLUSION.....	20
BIBLIOGRAFIA.....	23

EFEECTO DEL DIMETIL - SULFOXIDO EN MACROFAGOS CULTIVADOS.
RECUPERACION DE LA ACTIVIDAD CELULAR OBSERVADA EN CORTO
TIEMPO.

INTRODUCCION.- En los últimos años, la Biología Celular y el cultivo de tejidos han abierto un nuevo y amplio campo a la investigación al desarrollar procedimientos que permiten la preservación de cultivos celulares por tiempo indefinido, a baja temperatura - - (3), sin que las células sufran lesiones irreversibles. La aplicación de técnicas de preservación, de congelación y de descongelación de materiales biológicos ha llevado a los investigadores a integrar esta nueva rama de la Biología que es la Criobiología.

Desde que el manejo de cultivos celulares fue en un recurso de uso rutinario en muchos laboratorios, de aplicación en muy diversas ramas de la Biología o de la medicina se presentó el problema de conservar material celular por periodos de tiempo relativamente largos.

Aunque ésto puede lograrse en algunos casos por el simple -- procedimiento de cambios frecuentes de medio nutritivo y, en algunos casos, también por medio de subcultivos que permiten renovar la población celular, todo ello implica un esfuerzo considerable, gasto continuo de soluciones y medios y, lo más importante: "no garantiza en forma alguna la supervivencia del material biológico", (31)
(35).

La preservación de células a temperaturas muy bajas permite contar con éstas células en condiciones de viabilidad por largo tiempo; aunque no es posible anticiparse a los hechos, pero los resultados obtenidos con células sometidas a estos procesos desde hace 10 años, hacen poco aventurado el afirmar que en muchos casos la supervivencia puede considerarse definida.

Saltan a la vista varias ventajas derivadas de la posibilidad de preservar células en tales condiciones:

- a) Homogeneidad de la población celular preservada.
- b) Conservación de las características biológicas fundamentales del material celular.
- c) Disponibilidad inmediata de material que se ajuste a lo indicado en a y en b.
- d) Disponibilidad ilimitada, puesto que es posible congelar al mismo tiempo todo el material celular, que se desee.
- e) Posibilidad de proporcionar células de características muy bien conocidas, a un determinado nivel de manipulación "in vitro", a cualquier laboratorio.
- f) Posibilidad de estudiar extensamente una población celular homogénea, a partir de condiciones experimentales semejantes en cada experimento.

La Criobiología enfoca, desde puntos de vista muy específicos, todos y cada uno de los fenómenos que ocurren en el interior de la célula al modificarse las condiciones del medio externo e interno, con el objeto de conocer los mecanismos que intervienen para

alterar la actividad celular durante los procesos de criopreservación, congelación y descongelación. (12) y (23).

Criopreservación.— Durante la década de 1940 a 1950 se realizaron los primeros experimentos sobre congelación celular, en -- células tales como espermatozoides, hongos, bacterias, levaduras y otras. Sometidas a temperaturas un poco superiores a 0°C esas células persistían viables por algún tiempo. (4) (13) (20) (32).

Sin embargo, al disminuir la temperatura también disminuía la viabilidad celular, por lo cual se consideró entonces que sería imposible la conservación de material biológico a temperaturas de congelación, debido a que las células sometidas a esas condiciones sufren lesiones irreversibles ocasionadas por cambios que ocurren durante procesos de congelación y de descongelación.

Pueden mencionarse varios mecanismos que producen lesión celular:

- a) La formación de cristales de hielo intracelulares y extracelulares, alrededor de la membrana (7) (25).
- b) La desnaturalización de gran cantidad de compuestos proteínicos celulares a consecuencia del aumento en la concentración de electrolitos en el interior de la célula-- lo cual también modifica la estructura secundaria y --- terciaria de compuestos proteínicos y moviliza lípidos-- de la membrana celular, (15) (24)
- c) La suspensión de reacciones bioquímicas que se llevan a cabo a una temperatura determinada y que son inhibidas--

al descender ésta. (5) (16)

- d) La suspensión de reacciones catalizadas por enzimas que son inactivadas o inhibidas a baja temperatura. (26) (37)

La lesión celular producida por la formación de cristales de hielo, se realiza tanto en áreas celulares intracitoplásmicas como al nivel de la membrana.

Cuando los cristales son intracelulares, el aumento en volúmen del agua intracitoplásmica causa rupturas en los sistemas membranosos que forman los organelos celulares como el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, las mitocondrias, etc. (36) (38), trayendo como consecuencia una alteración grave de la fisiología celular. También debido a la ruptura de la membrana celular la permeabilidad de ésta es alterada notablemente y se produce un marcado desequilibrio iónico; con ello aumenta la concentración de solutos en el interior de la célula y ocurre entonces la desnaturalización de importantes compuestos celulares así como desequilibrios metabólicos que provocan finalmente la muerte de la célula. (17) (22).

Estas observaciones llevaron a los investigadores a la búsqueda de alguna substancia cuyas características químicas ayudarían a impedir la formación de los cristales, es decir, a impedir que el agua celular y extracelular cambiara de la fase líquida a la fase sólida mediante un rearrreglo en su estructura molecular que la hacía cambiar de volúmen cuando la temperatura descendía notablemente.

En 1949 C. Polge y Smith (28), haciendo uso de algunos compuestos como el Glicerol, observaron que algunos tipos celulares --

podían sobrevivir después de ser sometidos a temperaturas bajo cero. En base a éstos experimentos fué realizada una serie de trabajos en los que el agente químico protector usado por Polge y Smith sirvió para conservar viables a baja temperatura, células de diversos tipos como: Células de médula ósea, eritrocitos, espermatozoides de "cuy", espermatozoides humanos, células de la piel, de córnea, amibas, bacterias, hongos y levaduras.

La efectividad del Glicerol como un agente crioprotector se relaciona con la propiedad que tiene para penetrar fácilmente a través de la membrana celular, y de captar a las moléculas de agua citoplásmica combinándose con ellas en proporción de tres a uno por medio de puentes de Hidrógeno, evitando así que el agua se congele por efecto de la baja temperatura. En esencia, el glicerol actúa -- por estas propiedades coligativas como si fuese un amortiguador. -- (10) (18) (28) (34).

Además del glicerol, existen otros compuestos cuyas características químicas les confieren cierto valor como crioprotectores. (Tabla #1).

TABLA # 1

COMPUESTO QUIMICO	EFICIENCIA COMO CRIOPROTECTOR
DIMETIL - SULFOXIDO	DEBIDO A SU ALTO PUNTO DE EBU- LLICION.
ETILEN GLICOL	OFRECEN LA MEJOR PROTECCION
DIETILEN GLICOL	CONTRA LA CONGELACION. (14)
GLICEROL	
PIRIDINA- N-OXIDO	
EXAMETILENO - TETRAMINA	
ACETAMIDA	
DIMETIL ACETAMIDA	
FORAMIDA	
DIMETIL FORAMIDA	
MONOACETINA	OFRECEN UNA PROTECCION MUCHO ME- NOR CONTRA LA LESION PRODUCIDA - POR LA CONGELACION.
D - MANOSA	
D - RIBOSA	
GLUCOSA	
D - MANITOL	
SORBITOL	
INOSITOL	
POLIVINIL PIRROLIDONA (PVP)	LA PROTECCION QUE OFRECEN A ALGUNOS TIPOS DE CELULAS ES MINIMA.
SUERO	

Objeto.- Conociendo la importancia que tienen para la Biología Celular todos los mecanismos de criopreservación, nos proponemos en éste trabajo estudiar algunos de los mecanismos por los cuales los agentes protectores conservan a las células en condiciones de viabilidad, después de haber sido sometidas a procesos de congelación y de descongelación, utilizando para ello uno de los mejores agentes químicos protectores contra la lesión celular, que es el Dimetil sulfóxido, usado en los últimos años por diversos investigadores para la conservación de diversos tipos celulares. (19) (2) (1) (27).

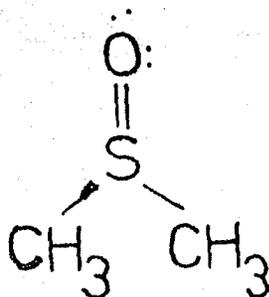
EL DIMETIL SULFOXIDO (DMSO).

El DMSO es un compuesto químico altamente polar, miscible en agua; es un líquido orgánico higroscópico, oloroso, cristalino y en concentraciones altas es un tanto tóxico en sistemas biológicos.

Es un poderoso solvente que podría disolver algunos hidrocarburos aromáticos no saturados como el benceno, así como compuestos orgánicos nitrogenados, compuestos sulfúricos y muchas sales inorgánicas.

Es miscible en algunos de los solventes orgánicos comunes como el alcohol, cetonas, éter y solventes clorados aromáticos. A temperaturas cercanas a su punto de ebullición (189°C), el DMSO es estable sólo en condiciones alcalinas o neutras; el grado de descomposición está en relación con el tiempo y la temperatura, y puede ser acelerado por la adición de ácidos, y retardado por la de bases. --

Su molécula está formada por un átomo central de azufre unido por medio de una doble ligadura, a un átomo de oxígeno que presenta una marcada electronegatividad, lo cual le confiere la propiedad de ser un aceptor de hidrógeno. Las valencias restantes del átomo de azufre están ocupadas por dos grupos metilo, según se observa en la siguiente fórmula.



LAS PROPIEDADES FISICAS DEL DIMETIL SULFOXIDO

TABLA # 2

PESO MOLECULAR.....	78.13
PUNTO DE EBULLICION A 760 mm de Hg.....	189°C (372°F).
PUNTO DE FUSION.....	18.55°C (65.4°F).
DENSIDAD ESPECIFICA A 20°C (68°F).....	1.1014 g/cm ³
INDICE DE REFRACCION.....	1.4786
VISCOSIDAD A 25°C (77°F).....	1.98 C. P.S.
CALOR ESPECIFICO A:	
29.4°C	0.47 ± 0.025 cal/g/°C
96.0°C	0.48 ± 0.02 " " "
149.0°C	0.52 ± 0.03 " " "
CALOR DE VAPORIZACION A 70°C.....	260 BTU/lb; y 11.3 K.Cal/Mol.
CALOR DE SOLUCION A 20°C.....	60 cal/g.
CALOR DE FUSION.....	44 cal/g.
CALOR DE COMBUSTION A 25°C.....	6050 cal/g.
PUNTO DE DESTELLO A 95°C.....	95°C (203°F).
TEMPERATURA DE AUTOIGNICION EN EL AIRE.....	300 a 302°C.
LIMITES DE INFIAMABILIDAD EN EL AIRE.....	Bajo 100°C de 3 a
	3.5%/Vol.
	Alto ente
	42 y 63%/Vol.
COEFICIENTE DE EXPANSION.....	0.06088/1°C.
CONSTANTE DIELECTRICA (8mc).....	48.9 (20°C)
	45.5 (40°C)
PARAMETRO DE SOLUBILIDAD.....	13
MOMENTO DIPLO.....	4.3 unidades Debye.
INDICE DE DILUCION EN TOLUENO.....	5.75
CONDUCTIBILIDAD A: 20°C.....	3x10 ⁻⁸ (Ohm ⁻¹ Cm ⁻¹).
80°C.....	7x10 ⁻⁸ (Ohm ⁻¹ Cm ⁻¹).

El DMSO actúa en una forma muy similar a la del Glicerol, - gracias a sus propiedades coligativas, evitando en cierta forma -- que las moléculas de agua celular modifiquen su configuración espa- cial y se produzca un aumento de volúmen al disminuir la tempera- tura a valores por abajo de cero grados centígrados; se evitan así todas las alteraciones que son la causa de la sensible baja en la- viabilidad celular durante la criopreservación. Sin embargo parece ser que este mecanismo de crioprotección no es el único atribuible al efecto de un protector químico, sino que al alterar en forma no- table la permeabilidad de la membrana celular, penetra rápidamente al interior de la célula y produce una condición de hipertonici- -dad, provoca la salida de líquido intracelular, y disminuyen así - las posibilidades de que se formen cristales de hielo. (8)

En este trabajo nos proponemos tratar de precisar si se tra- ta unicamente de un mecanismo fisico-químico que evita la lesión - celular durante los procesos de criopreservación, al observar el - efecto del DMSO sobre la actividad normal de células mantenidas en cultivo, en este caso macrófagos de bazo de ajolote.

MATERIALES Y METODOS.

La fase experimental de este trabajo se realizó en prepara- ciones de explantes de bazo de ajolote (Ambistoma mexicanum), obte- nidos en la forma que se describe a continuación:

Se extrae el bazo de un ajolote en condiciones de estricta- asepsia, e inmediatamente se coloca en una caja de petri contenien

do solución salina balanceada de Hanks estéril, donde se lavó para eliminar la mayor cantidad posible de sangre. Todas las soluciones, medios y material utilizados deben esterilizarse previamente en la forma mas apropiada, y en toda manipulación debe observarse una rigurosa técnica aséptica.

Con el fin de lavar más el tejido y eliminar así una mayor cantidad de eritrocitos, se cortó un trozo del órgano, se colocó - en la excavación de un porta objetos de éste tipo conteniendo una pequeña cantidad de medio basal de Eagle sin suero de ternera, y se fragmentó con unas cuchillas finas hasta obtener trozos de aproximadamente 0.5 mm.

Estos fragmentos se pasan sucesivamente a otras excavaciones con medio para completar su lavado. Los explantes se colocan - sobre laminillas cubre-objetos de 1.3 por 5 cm, las cuales son cubiertas previamente con una capa de plasma de pollo, acomodandose de cinco a seis explantes a lo largo de cada laminilla. Enseguida se les agrega extracto embrionario y se les deja en reposo durante 20 minutos, con lo cuál se formó un coágulo y los trozos quedan fijos en la laminilla. Fig. 1.

Una vez logrado lo anterior, las laminillas con los explantes son colocadas en tubos de cultivo con 3 ml de medio basal de - Eagle (MBE) con 20% de suero de ternera, 500 000 U/I de penicilina, y 0.075 g. de L-Glutamina por litro.

Los tubos de cultivo perfectamente bién tapados se incubaron a temperatura ambiente de 20 a 30 días, periodo en el cual se efecu

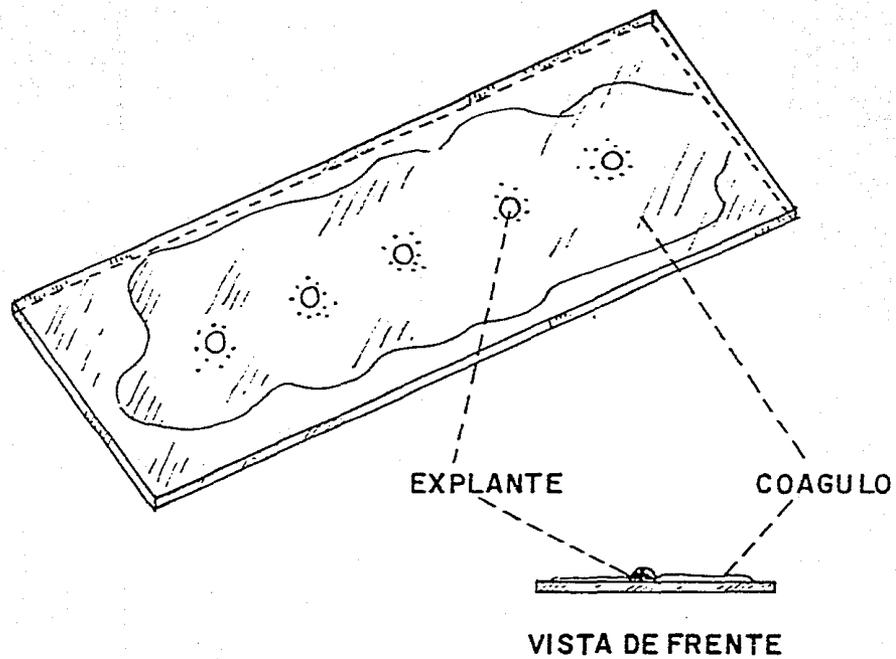
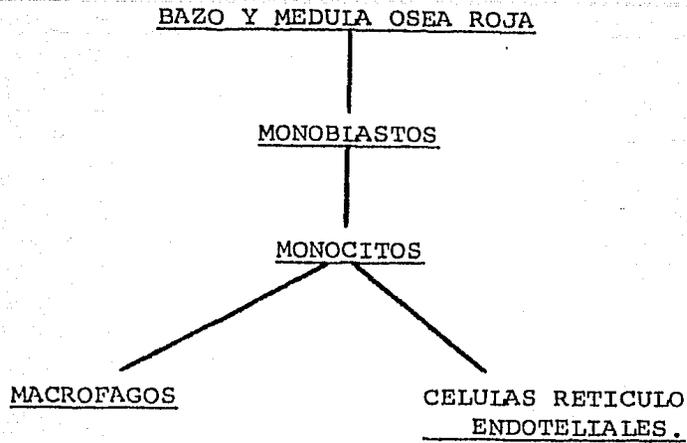


FIG. No. 1 LAMINILLA DE CULTIVO CON EXPLANTE.

tuaron de 5 a 6 cambios de medio, para evitar el daño a las células por acidificación excesiva del mismo. Durante el periodo de incubación, los tubos de cultivo fueron observados periódicamente a fin de llevar un control microscópico del desarrollo de los explantes y de localizar la presencia de zonas útiles para los fines de nuestro estudio, ó sea los espacios que se forman en la periferia de los explantes en donde los macrófagos han fagocitado grán parte del material que los rodea, con lo cuál las grandes células quedan aisladas y resulta entonces fácil su localización y la observación de su actividad como célula aislada.

Escogimos los macrófagos porque es fácil observarlos aislados, así como por su grán tamaño y su intensa actividad tanto fagocítica como pinocítica, ámbas indicadoras de una condición fisiológica dinámica, observable con facilidad en Contraste de fase o en cinematografía espaciada.

Los macrófagos probablemente proceden de la pulpa roja del bazo; también se les conoce como histiocitos, clasmatocitos, o células retículo endoteliales libres o fijas, siendo su aspecto distinto, dependiendo de el sitio en donde se localicen. Cuando son libres, su aspecto es ovoide, y suelen ser alargados y angulosos cuando se encuentran aprisionados entre capas de tejidos adyacentes. Parece ser que el antecesor inmediato es el monocito, según la línea siguiente:



Según (11).

También se cree que los macrófagos pueden originarse a partir de células preexistentes localizadas en zonas donde ocurre alguna reacción inflamatoria.

Una vez que se ha escogido una laminilla que presente zonas adecuadas para la experimentación, se extrae cuidadosamente del tubo procurando no lesionar ni desprender los explantes. Inmediatamente se coloca sobre un portaobjetos con dos bordes de cristal adheridos a uno y otro lado, de tal manera que dejen un espacio entre ambos, en el que se coloca una gota de medio (MBE + 20%ST) con un pH de 7.2. Ya que la laminilla se ha colocado sobre los bordes, con los explantes hacia abajo, se secan las orillas laterales y se sellan con parafina, dejando libres únicamente los extremos a manera de una cámara de cultivo. Fig. 2.

Después, se coloca la cámara de cultivo sobre la platina del microscopio de contraste de fases y se busca un campo en donde se pueda trabajar con células que estén aisladas, y se marcan las coordenadas para poder localizar fácilmente dicho campo. En seguida se tomaron secuencias fotográficas y de cinematografía espaciada de todos los eventos que se observaron en las células al modificar las condiciones experimentales como se describe a continuación:

Se observó la actividad normal de un grupo de 3 células distantes unas de otras, pero bien localizadas en el campo microscópico, tomándose durante varios minutos secuencias fotográficas y de cinematografía espaciada. Posteriormente, el medio de crecimiento (MBE+20 % ST. pH 7.2) fué reemplazado por un medio similar adicionado del agente crioprotector, es decir, el dimetil sulfóxido.

El cambio de medio de crecimiento de la cámara de cultivo se hizo por medio de micropipetas y de papel filtro; dicha manipula--

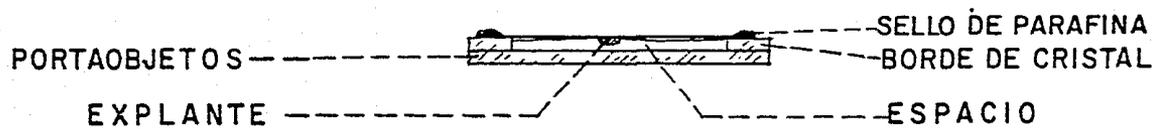
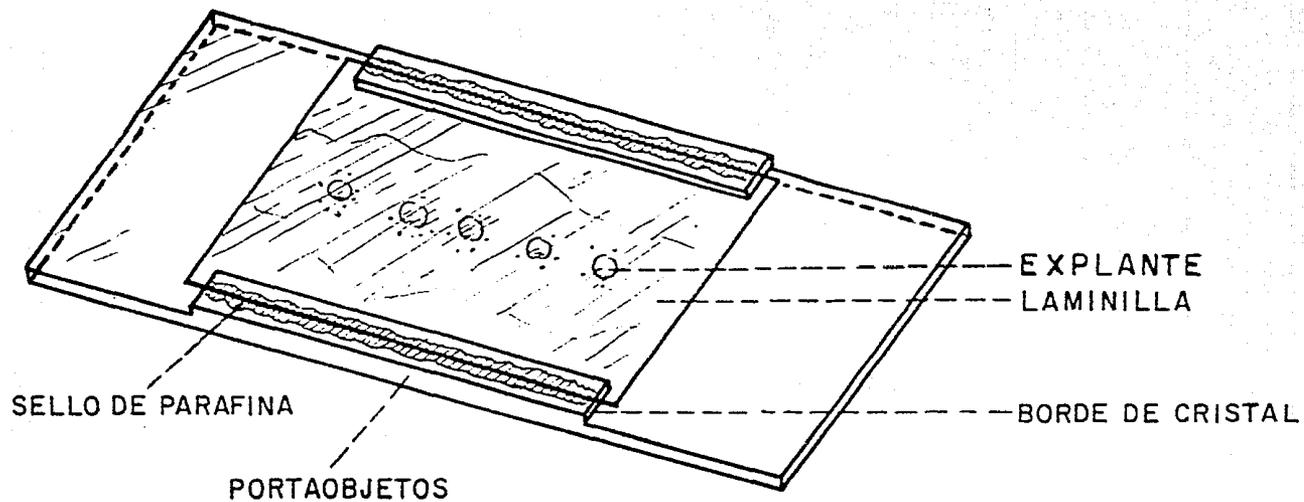


FIG. No.2 CAMARA DE CULTIVO

ción se hizo lentamente, para que al formarse la corriente las células no fuesen arrastradas.

De inmediato fueron tomadas secuencias fotográficas y cinematográficas a tiempos variables para observar "in situ" el efecto de este compuesto químico sobre la actividad de nuestra célula.

Después de un tiempo determinado, de la misma manera en que se hizo el cambio de medio de crecimiento normal por medio con 5% de DMSO, se reemplazó a éste último por medio de crecimiento fresco exento de DMSO, previo lavado de la cámara de cultivo haciendo pasar lentamente corrientes de MBE a través de ella, para extraer la mayor cantidad de DMSO posible de las células.

Cuando las células se encontraron de nuevo en medio fresco, se hicieron tomas fotográficas y cinematográficas a tiempos variables para observar el efecto que producía en la actividad celular el retorno a las condiciones de experimentación iniciales.

RESULTADOS.— Las secuencias fotográficas fueron tomadas de diferentes explantes de bazo a partir de las laminillas preparadas para tal caso. La fotografía se hizo en un aparato Ultrafoto II -- Zeiss mod. 61581. Fig. 3, usándose película Agepe FF de Agfa.

Durante la primera secuencia fotográfica, fué tomada la actividad de una célula en estado normal; la cámara de cultivo contenía MBE normal. Dicha célula presentaba una marcada actividad tanto fagocítica como pinocítica, con marcados movimientos citoplásmicos.— Esta actividad fué registrada desde los 2 hasta los 5 y 10 minutos de haberse preparado la cámara de cultivo, y puede observarse en--

Description

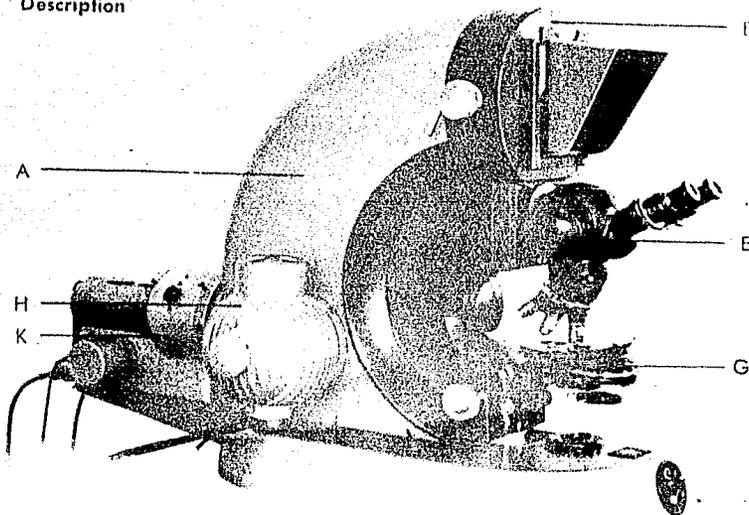
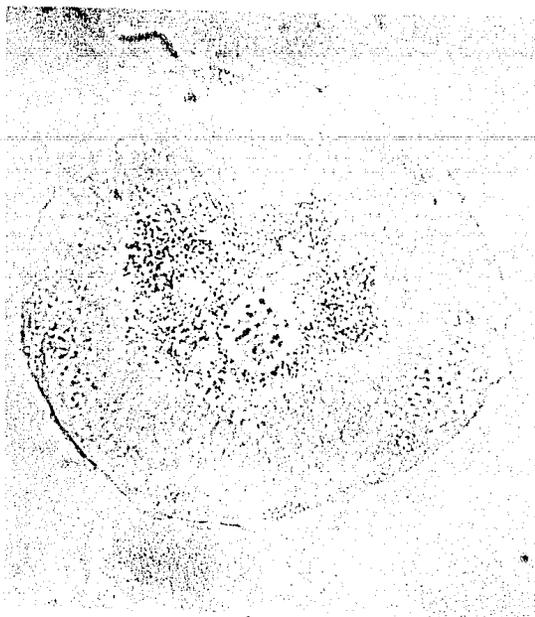


FIG. Nº 3 .- APARATO ULTRAFOTO II ZEISS MOD. 61581 USADO PARA TOMAR EN CONTRASTE DE FASE LAS SECUENCIAS FOTOGRAFICAS DEL EXPERIMENTO.



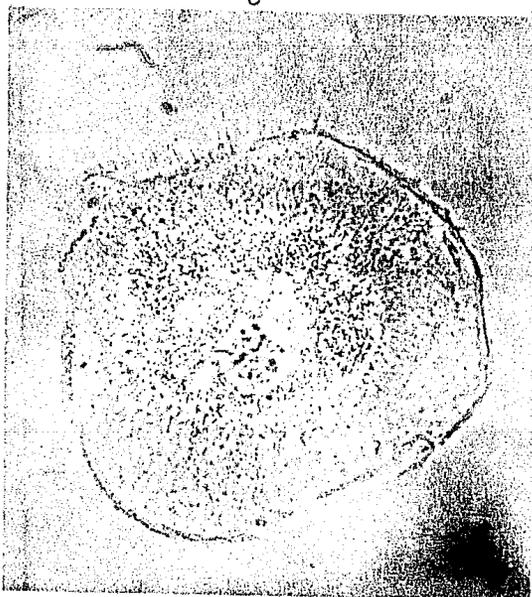
4



5



6



7

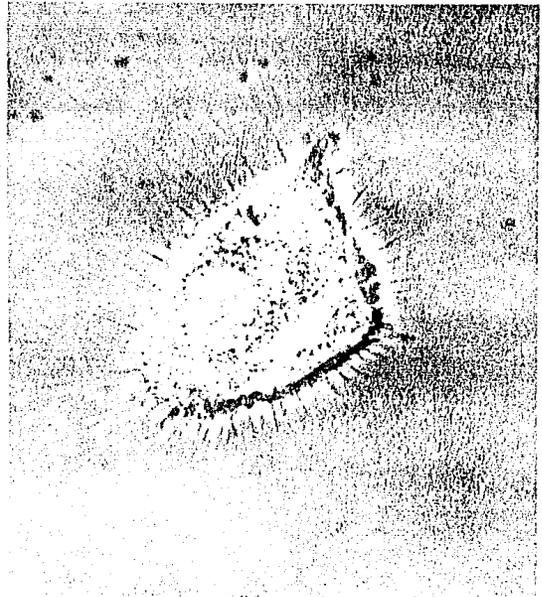
Fig. 4 y 5.- Mácrofago en medio de cultivo normal (MBE). Nótese una actividad celular normal con ondulaciones en el borde de la célula, y numerosas vacuolas de pinocitosis. 250X.

Fig. 6.- Se observa el comienzo de la retracción celular dos minutos después de que se colocó el MBE+5% de DMSO.

Fig. 7.- A los cinco minutos se observa la misma célula cuya permeabilidad está siendo alterada por la presencia del DMSO. Nótese la retracción.



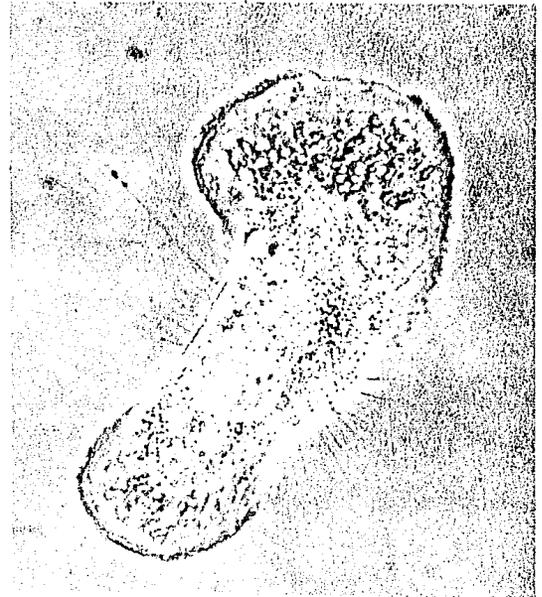
8



9



10



11

Fig. 8 y 9.- Nos muestran el efecto del DMSO en la misma célula a los 7 y 10 minutos respectivamente. Nótese la casi completa retracción de la célula, debido a una salida importante de líquido celular.

Fig. 10 y 11. Nos muestra a la misma célula en el periodo de recuperación, a los 5 y a los 30 min. después de cambiar el MBE con 5% DMSO por medio fresco. Nótese que se empiezan a formar velos citoplasmicos por ondulación de la membrana, debido a la pinocitosis.



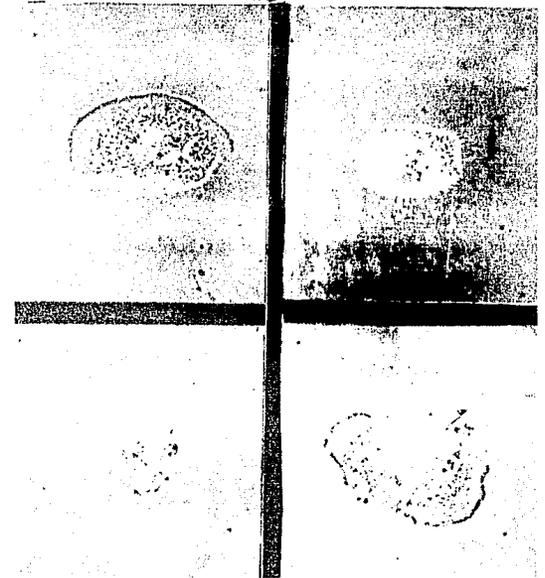
12



13



14



15

Fig. 12 - 13 y 14.- En esta secuencia se puede apreciar cómo se va realizando la recuperación de la actividad de la célula después de ser cambiado el MBE con DMSO 5% después de los 60, 80 y 120 min. Nótese la gran actividad pinocítica en ambos extremos de la célula, así como la formación de gran cantidad de vacuolas de pinocitosis.

Fig. 15.- Secuencia seriada de otra célula en la que se puede ver el efecto Retracción - Recuperación, en tiempos similares al caso anterior.

las figuras 4 y 5 de la lámina I.

Las siguientes tomas fotográficas de la misma célula se llevaron a cabo después de que el MBE+20% ST. y pH 7.2 (normal) que contenía la cámara de cultivo, fué cambiado por MBE normal con el 5% de DMSO, según el método antes descrito, a los 2, 5 y 10 minutos del cambio de medio. A los dos minutos de haberse cambiado el medio, la célula empezaba a retraerse.

A los cinco minutos se empezó a notar una evidente pérdida de líquido celular, formándose prolongaciones citoplásmicas filamentosas. Cuando se consideró que la retracción citoplásmica había llegado al máximo (10 min), se procedió a cambiar de nuevo el medio de crecimiento a la cámara de cultivo, extrayéndose el MBE que contenía el 5 % de DMSO, y reemplazándolo por MBE normal fresco. Figs. 6 y 7 de la lámina I, y fig. 8 de la lámina II.

Cuando la cámara de cultivo contenía nuevamente MBE fresco, se observó que la célula empezaba a recobrar su actividad desde los dos minutos después del cambio, y que a los cinco minutos se formaban velos citoplásmicos; probablemente la célula empezaba a recuperar agua por medio de una intensa actividad pinocítica, de tal manera que a los 20 minutos la recuperación de la actividad celular era muy evidente. Figs. 9, 10 y 11 de la lámina II.

Fueron tomadas fotografías de ésta recuperación, en tiempos variables (30, 60, 80, y 120 minutos), según nos muestran las figs. 12, 13 y 14 de la lámina III. La observación de la recuperación se realizó después de 3.15 horas, apreciándose ligeros cambios en el -

contorno de la célula, debidos a la actividad que presentaba la membrana.

En la fig. 15 de la lámina III, podemos apreciar una secuencia fotográfica de el efecto retracción-recuperación de la actividad celular, visto en otra célula tratada con las mismas condiciones experimentales que la anteriormente descrita.

En la fig. 16, tenemos la curva que nos indica el porcentaje aproximado de retracción celular debido al efecto de el agente químico DMSO; así como el tiempo de recuperación de la actividad celular en ausencia de dicho agente crioprotector.

La experimentación llevada a cabo usando el aparato de cinematografía espaciada, (Fig. 17) fué exactamente igual a la antes -- descrita; se modificó el tiempo de exposición de las células al agente químico DMSO, y el tiempo de observación de la recuperación celular, a fin de obtener un número de exposiciones lo suficientemente grande para que pudiera ser proyectable, y de ese modo hacer posible una observación mas objetiva y dinámica de los eventos que se realizaron durante el experimento.

Primero se tomaron 320 exposiciones (a razón de cuatro cuadros por minuto) de la actividad normal de un macrófago, el cuál -- presentaba típicos movimientos de pinocitosis y de fagocitosis.

Después de observar durante los 80 minutos la actividad normal, se hizo el cambio de medio de crecimiento MBE normal, substituyendolo por MBE que contenía un 5% de DMSO, usando la técnica antes descrita y sin separar la cámara de cultivo de la platina del micros

EFFECTO DEL DIMETIL -SULFOXIDO (D.M.S.O.) SOBRE LA ACTIVIDAD CELULAR

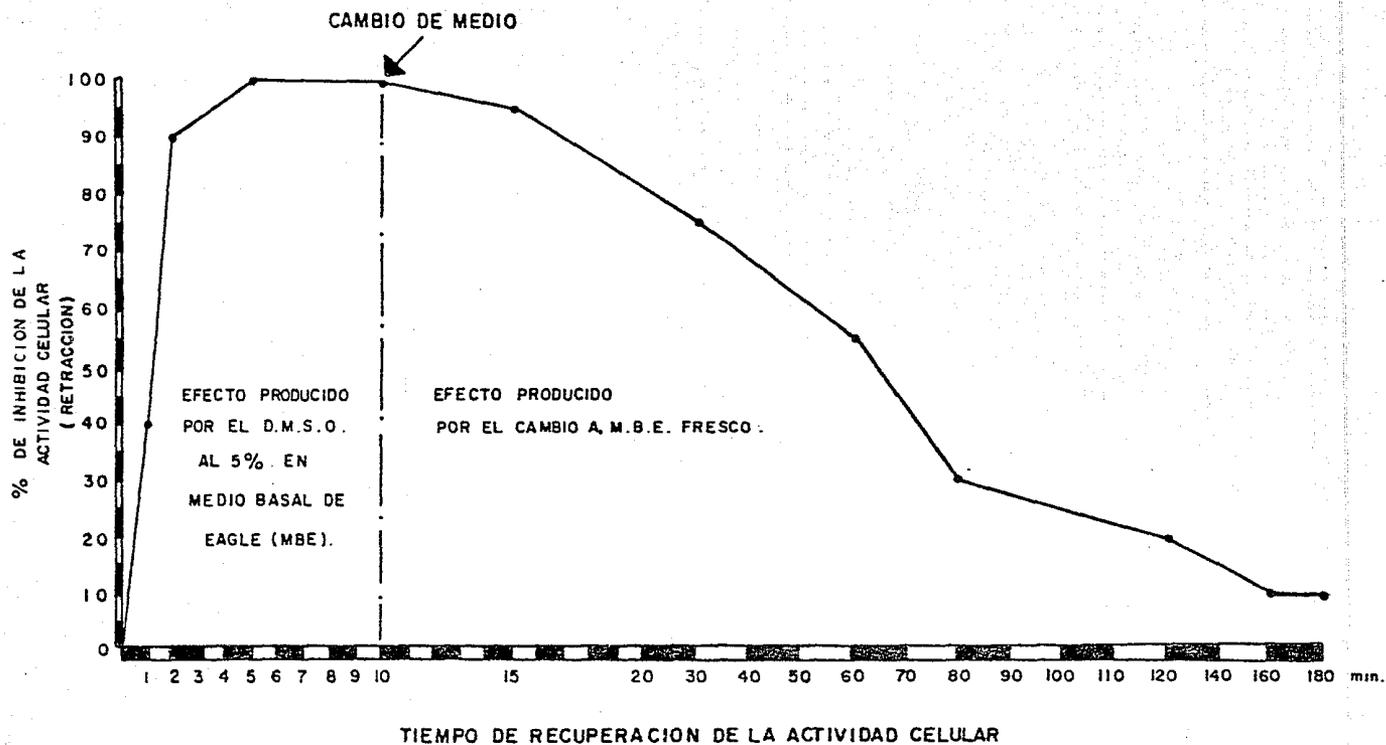


Fig. No. 16

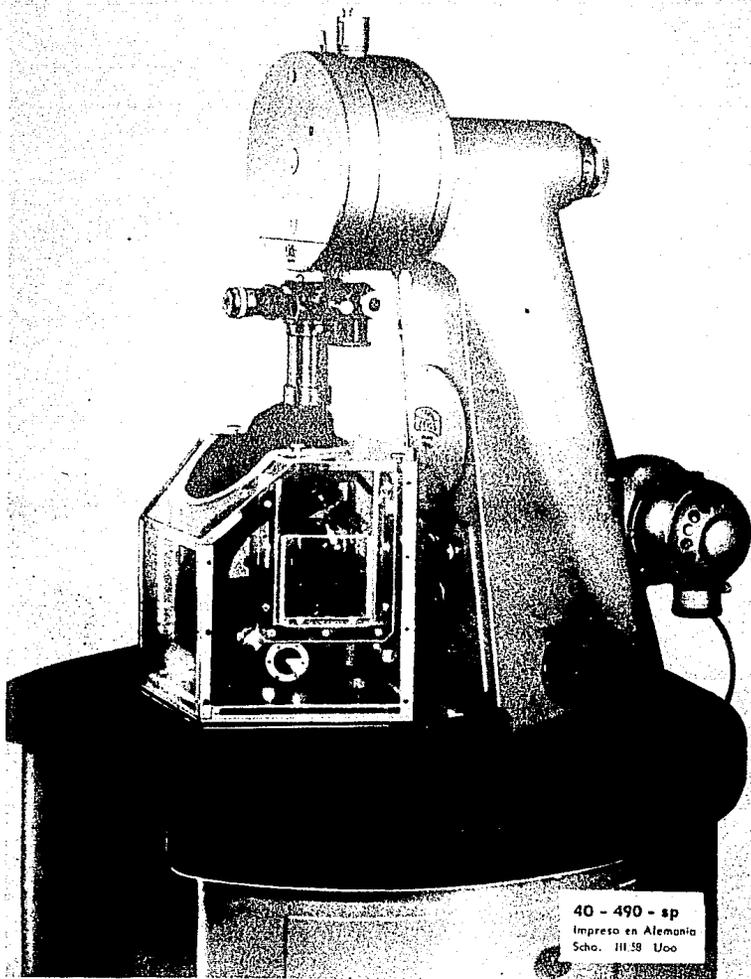


FIG. Nº 17.- APARATO DE CINEMATOGRAFIA ESPACIADA ZEISS
MOD. h10-450 SP. USADO DURANTE LA EXPERIMENTACION.

copio, para que de inmediato fuese tomada la secuencia correspondiente al efecto del DMSO sobre la actividad de la célula observada.

RESULTADOS.- Como puede verse en la película, la retracción celular ocurrió aproximadamente a los cinco minutos de haberse realizado el cambio de medio, homologandose el tiempo de retracción total con el tiempo obtenido trabajando con contraste de fases, o sea 10 minutos aproximadamente. La célula permaneció retraída en presencia del agente químico durante 80 minutos. En ocasiones subsecuentes, fueron tomadas únicamente 40 exposiciones (10 min.), tiempo en el cual se estuvo trabajando con el microscopio de contraste de fases, y que fué suficiente para observar la retracción celular completa.

Inmediatamente después se hizo el cambio de medio con DMSO por MBE normal, previo lavado de la cámara de cultivo en tres ocasiones tal y como se indicó anteriormente.

En la secuencia que se tomó de la recuperación celular, pudieron apreciarse indicios de la misma desde los 30-35 minutos, y la recuperación casi completa a los 80-120 minutos después del cambio.

RESUMEN: Los datos obtenidos durante el desarrollo de éste trabajo, son el resultado de experimentos realizados en varias ocasiones a partir de explantes de bazo preparados siguiendo una técnica modificada de cultivo de tejidos en laminillas. Las células seleccionadas para el estudio fueron macrófagos cultivados durante 30 días.

En general, el comportamiento de las células fué muy similar en las diferentes condiciones experimentales tanto en presencia de -

MBE normal, como con medio adicionado con el agente crioprotector-DMSO. Por lo tanto parece cierto que durante los procesos de crio-preservación, la acción de los agentes protectores no solamente se realiza gracias a sus propiedades coligativas, sino también gracias al efecto de hipertonicidad que confieren al medio que rodea a la célula, provocando así una importante salida de líquidos intracelulares, lo que reduce enormemente la posibilidad de la transformación del agua intracelular en cristales de hielo.

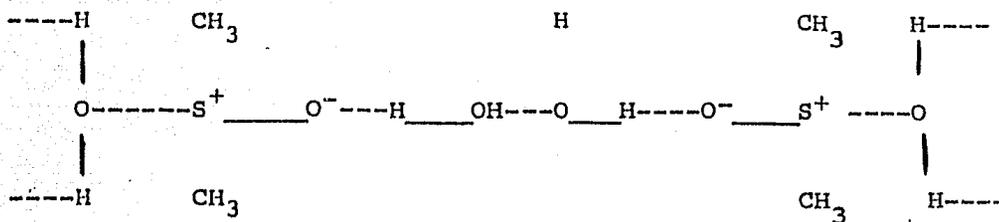
C O N C L U S I O N

De acuerdo con los resultados obtenidos durante el desarrollo de éste trabajo, podemos concluir que la acción de el agente químico crioprotecto DMSO, se realiza fundamentalmente gracias a que puede captar los hidrógenos de las moléculas de agua actuando como-aceptor; en esa forma evita que la configuración espacial de la molécula de agua cambie al pasar de la fase líquida a la fase sólida, impidiendo así el aumento de volúmen del contenido celular, cuando la célula es sometida a bajas temperaturas. Por consiguiente se evita la formación de cristales de hielo que como sabemos, es una de las causas más importantes de que aparezcan lesiones irreversibles-que alteran en forma notable la fisiología celular.

Así mismo, no podemos perder de vista otro fenómeno de gran-importancia en el mecanismo de la criopreservación, y que es el que pudimos observar durante nuestro experimento, o sea: el papel que juega el agente químico como deshidratador de la célula provocando una importante salida de líquidos celulares y reduciendo con ello la posibilidad de formación de cristales de hielo intracitoplásmicos. (29)

En resumen podemos decir que al poner a nuestra célula en contacto con el agente crioprotector, la permeabilidad de la membrana es alterada por la rápida acción del DMSO; penetra éste al interior de la célula, se une (probablemente) con moléculas de agua citoplás

mica formando un complejo Agua-DMSO por medio de uniones hidrógeno, según se muestra en la siguiente fórmula.



(29) (9)

Como otra consecuencia de la alteración de la permeabilidad de la membrana celular, sale líquido intracelular que también se une probablemente con el DMSO extracelular evitando la formación de cristales en el medio externo durante la congelación. Esta deshidratación parcial provocada por los agentes crioprotectores fué observada y descrita por diversos autores desde 1940, al usar diferentes agentes químicos crioprotectores. (21) (9).

En nuestros experimentos observamos que la célula fué retrayéndose y disminuyendo su actividad fisiológica. Es muy probable que esta actividad celular reducida a un mínimo sea mantenida gracias a que la célula conserva suficiente cantidad de agua para mantener un equilibrio adecuado de sus solutos, cuya concentración elevada alteraría la estructura secundaria de compuestos de naturaleza proteica (enzimas) y lipoproteica (sistemas membranosos); con los consiguientes disturbios metabólicos celulares.

La reversibilidad de la actividad celular va a depender entonces de la facilidad con que el agente protector en concentraciones-

específicas no tóxicas, pase al interior de la célula y capte el agua que ésta necesita para mantener un adecuado equilibrio de los solutos, y también de la disminución de la posibilidad de que se formen cristales de hielo intracitoplásmicos durante la congelación, gracias a la deshidratación parcial ocasionada por el DMSO en la célula.

Después de que el DMSO ha sido excluido del medio que rodea a la célula, y ha salido el que se mantenía dentro de ella mediante un recambio constante de líquido a través de la membrana, ésta readquiere su permeabilidad selectiva normal. La presencia de compuestos proteicos en el medio de cultivo produce una estimulación química sobre la membrana celular para que se formen gran cantidad de vacuolas de pinocitosis que introducen líquido al interior de la célula en forma lenta pero efectiva. (30) Así mismo el agua penetra al interior de la célula mediante procesos fisiológicos normales de la membrana, tales como el transporte activo y los procesos puramente físicos relacionados con la permeabilidad celular, con lo cual se evitan choques osmóticos que podrían ser de graves consecuencias para la célula.

Lo expuesto anteriormente nos permite postular la posibilidad tal vez no remota, de resolver el problema de la criopreservación organizada de tejidos y órganos, con la finalidad de reemplazar tejidos u órganos enfermos por otros sanos que han sido mantenidos en cultivo a bajas temperaturas y en condiciones de absoluta viabilidad.

B I B L I O G R A F I A.

- 1.- ASHWOOD. M. J., SMITH.
Radioprotective and Crioprotective propieties of Dimethyl-Sulfoxide in cellular systems.
Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 141, Secc. II Biological Action of D.M.S.O. Pag. 45-62. March-April 1967.
- 2.- BOURONCLE BERTHA A.
Preservation of Human normal and leukemic cells with Dimethyl sulfoxide at - 80°C.
Cryobiology. Vol. 3, No. 6, 1967.
- 3.- BRUCE L. BROWN, STANLEY C. NAGLE Jr.
Preservation of mammalian cells in a chemically defined medium and Dimethyl sulfoxide.
Science, Vol. 149, No. 3689 Pag. 1266-67. Sep. 10-1965.
- 4.- CERNY M., BAUDYSOVA M., and HOLECKOVA E.
Adaptation of mammalian cells to cold.
II.- Cold induced endoreduplication and polyploidy.
Exptl. Cell, Res. Vol. 40, No. 396 March-26-1965.
- 5.- CHILSON OSCAR P., COSTELOO LOUISA A., and KAPLAN NATHAN O.
Effects of freezing on enzymes.
Fed. Proc. Vol. 24 No. 2 Part. III Supp. 15, Pag. 55
March-April/1965.
- 6.- DIMETHYL SULFOXIDE TECHNICAL BULLETIN.
Crown Zellerbach Corporation.
Chemical Products Division, Camas Washington U.S.A.
98607, August-1966.
- 7.- FARRANT J.
Mechanisms of cell damage during freezing and thawing,
and its prevention.
Nature London, Vol. 1205:1284., 1965.
- 8.- FRANZ T. J. and VAN BRUGGEN J. T.
A possible mechanism of action of Dimethyl sulfoxide.
Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 141 Biological actions of DMSO.
Pag. 302-309. March. 1967.
- 9.- GENENIO, P. M., and LUYET, B. J.
Biodynamica. 6:141, 1947.

- 10.- GREENER ARTHUR, E., SILVER RUTH K., KRUG M., and LEWIS L. CORRIEL.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 166: 462 (1964)
- 11.- HAM ARTHUR W. MD.
Tratado de Histologia. 5a. Edición, Edit. Interamericana, S. A. MEXICO, 1965. Pag. 214-215.
- 12.- HAROLD T. MERYMAN.
CRYOBIOLOGY. Academic Press. London and New York 1966.
- 13.- HOLECKOVA E., M. BAUDYSOVA and O CINNEROVA.
ADAPTATION OF MAMMALIAN CELLS TO COLD.
Resistance to cold and multiplication of L-Detroit and He.
La cells adapted to low temperature.
Exptl. Cell Res. Vol. 40, No. 396. March.23-1965.
- 14.- HUGGINS CHARLES E.
Preservation of organized tissue by freezing.
Fed. Proc. Vol. 24, No. 2 Part. III, Supp. 15, Pag. 190-195. March-April 1965.
- 15.- JENCKS WILLIAM P.
Water structure and protein denaturation.
Fed. Proc. Vol. 24, No. 2, Part. III Supp. 15 Pag. 50.
March-April 1965.
- 16.- LEHMANN H.
Changes in enzymat at low temperature, long-term preservation of blood.
Fed. Proc. Vol. 24, No. 2, Part. III, Supp. 15 Pag. 66-69
March-April 1965.
- 17.- LOVELOCK, J. E.
Proc. Roy. Soc. B., 147, 427, (1957).
- 18.- LOVELOCK, J. E.
The mechanism of the protective action of Glycerol against haemolysis by freezing and thawin.
Biophys. and Biochem. Acta - II: 28-36, 1953.
- 19.- LOVELOCK, J. E. and BISHOP, M. W. H.
Prevention of freezing damage to living cells by Dimethyl sulfoxide.
Nature. 183: 1394 (1959).
- 20.- LUYET B. J.
Ultra rapid freezing as a possible method of Blood preservation. Amer. Red. Cross. Washington D. C. 1949. Pag. 141-146.

- 21.- LUYET B. J. and HARTUNG, M. C.
Biodynamica. 6:141-1947.
- 22.- MAC. FARIANE, A. S.
Nature, London, 149:439 - 1942.
- 23.- MAZUR PETER.
Basic Problems in Cryobiology.
Paper presented at the 1963 Cryogenic Engineering.
conference, Boulder Colorado. August 19, 1966. Pag. 28-37.
- 24.- MAZUR PETER.
Physical and Chemical basis of injury in singled-celled -
microorganisms subjet to freezing and thawing.
CRYOBIOLOGY. Edited by: H. T. Meryman. Academic Press. --
London and New York. 1965. Pag. 214.
- 25.- MERYMAN H. T. and W. T. PLATT.
The distribution of growth Ice Cristals in frozen
mammalian tissue.
Naval Medical Res. Inst. Res. Rept. Proj. NN.000 O18.
Junio 3, 1963.
- 26.- MERYMAN H. T. MD.
Freezing of living cells: Biophysical considerations.
Paper presented at the Syverton Memorial Symposium on
Analitical Cell Culture. Detroit, Mich. Jun. 6-7, 1961.
NATIONAL CANCER INSTITUTE, Monograph. No. 7.
- 27.- MERYMAN H. T. and E. KAFIG.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 90:587-1955.
- 28.- POLGE C. and A. U. SMITH, AND A. S. PARKES.
Revival of spermatozoa after vitrificic and dehydration
at low temperature.
Nature, London 164:666, 1949-1950.
- 29.- RAMLER DAVID, H. and A. ZAFFARONI.
Biological Implications of Dimethyl sulfoxide based
on a review of its chemicals propieties.
Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 141, Art. 1. Pag. 13-14.
Biological actions of DMSO. March. 1967.
- 30.- RUSTAD R. C.
Scient. Amer. Vol. 204, Pag. 120-130, April-1961.
- 31.- SCHERER WILLIAM S.
Practical applications in problems of low temperature and
preservation, technics for cultured animal cells.
Fed. Proc. Vol. 24, No. 2. Part. III, Supp. 15.
Pag. 304-305. March-April 1965.

- 32.- SHETTLES L. B.
The respiration of human spermatozoa and their response
to various gases and low temperatures.
Amer. J. Physiol. 128: 408-415, 1940.
- 33.- SCHERGA H. A.
THE PROTEINS. Edited by: H. Neurath. N. Y. Acad. Sci. Vol.
2 Pag. 478. 1963.
- 34.- SMITH A. U., C. POLGE and J. SMILES.
J. Roy. Microsc.Soc. 71:186, 1951.
- 35.- STULBERG. C. S., and W. D. PATERSON Jr.
The quaterly review of Biology. Vol. 141 No. 2, Pag. 124-
130. Jun. 1966.
- 36.- STOWELL ROBERT E., DOUGLAS E. YOUNG, EUGENE A. ARNOLD,
and BENJAMIN F. TRUMP.
Structural, chemical, physical and functional alterations
in mammalian nucleus following different conditions of
freezing, storage and thawing.
Fed. Proc. Vol. 24 No. 2 Part. III, Suppl. 15 Pag. 115-143.
March-April. 1965.
- 37.- TAPPEL A. L.
CRYOBIOLOGY. Edited by: H. T. Meryman, Academic Press London
London and New York. Cap. IV, Pag. 163 - 1966.
Effects of low temperature and freezing on Enzymes and En-
zyme Systems.
- 38.- TRUMP BENJAMIN F., DOUGLAS E. YOUNG, EUGENE A. ARNOLD,
and ROBERT E. STOWELL.
Fed. Proc. Vol. 24 No. 2, Part. III, Suppl. 15.
Pag. 144-168. March-April, 1965.
Effects of freezing and thawing on the structure, chemical,
constitution, and function of cytoplasmic structures.
- 39.- VOS O. and M. C. A. KAALEN.
Prevention of freezing damage to proliferating cells in
tissue culture.
"A quantitative study of a number of agents."
CRYOBIOLOGY. Vol. 1, No. 4, Pag. 249-260, 1965.
- 40.- WARREN S. MAC. GREGOR.
The chemical and physical properties of the Dimethyl sul-
foxide Ann. N. Y. Acad. Sci. Vol. 141, Pag. 3. Biological-
actions of DMSO. March 15, 1967.