

6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



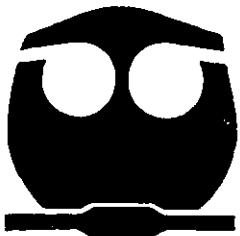
E. CAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

CRIOPRESERVACION. BASES FISICO-QUIMICAS,
DIFERENCIAS ENTRE CONGELACION RAPIDA Y
CONTROLADA, CONTROL DE CALIDAD.

208185

**TRABAJO ESCRITO VIA CURSOS
DE EDUCACION CONTINUA
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
SUSANA LETICIA ARIAS REYNADA**

ASESOR ACADEMICO: DR. ENRIQUE GOMEZ MORALES



MEXICO, D.F.

200



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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).

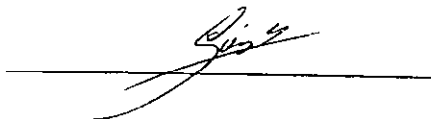
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO.

Presidente JOSE LUIS DOMINGUEZ TORIX.
Vocal EVA DELIA CALDERON GARCIDUEÑAS.
Secretario ENRIQUE GOMEZ MORALES.
1er Supervisor AMALIA GUADALUPE BRAVO LINDORO.
2do Supervisor ZOILA NIETO VILLALOBOS.

Sitio donde se desarrolló el tema: BIBLIOTECAS DEL SECTOR SALUD.

Nombre completo y firma del asesor del tema: Dr. ENRIQUE GOMEZ MORALES.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Enrique Gomez Morales", is written over a horizontal line.

Nombre completo y firma del sustentante: SUSANA LETICIA ARIAS REYNADA.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Susana Leticia Arias Reynada", is written over a horizontal line.

Agradecimientos

- *A la memoria de mis padres*
- *A mis hermanos Lourdes, Felicitas, Francisco,
Olivia, Mario*
- *A mi tía Martha*
- *A mi hija Marlene*
- *A mis amigos y compañeros*

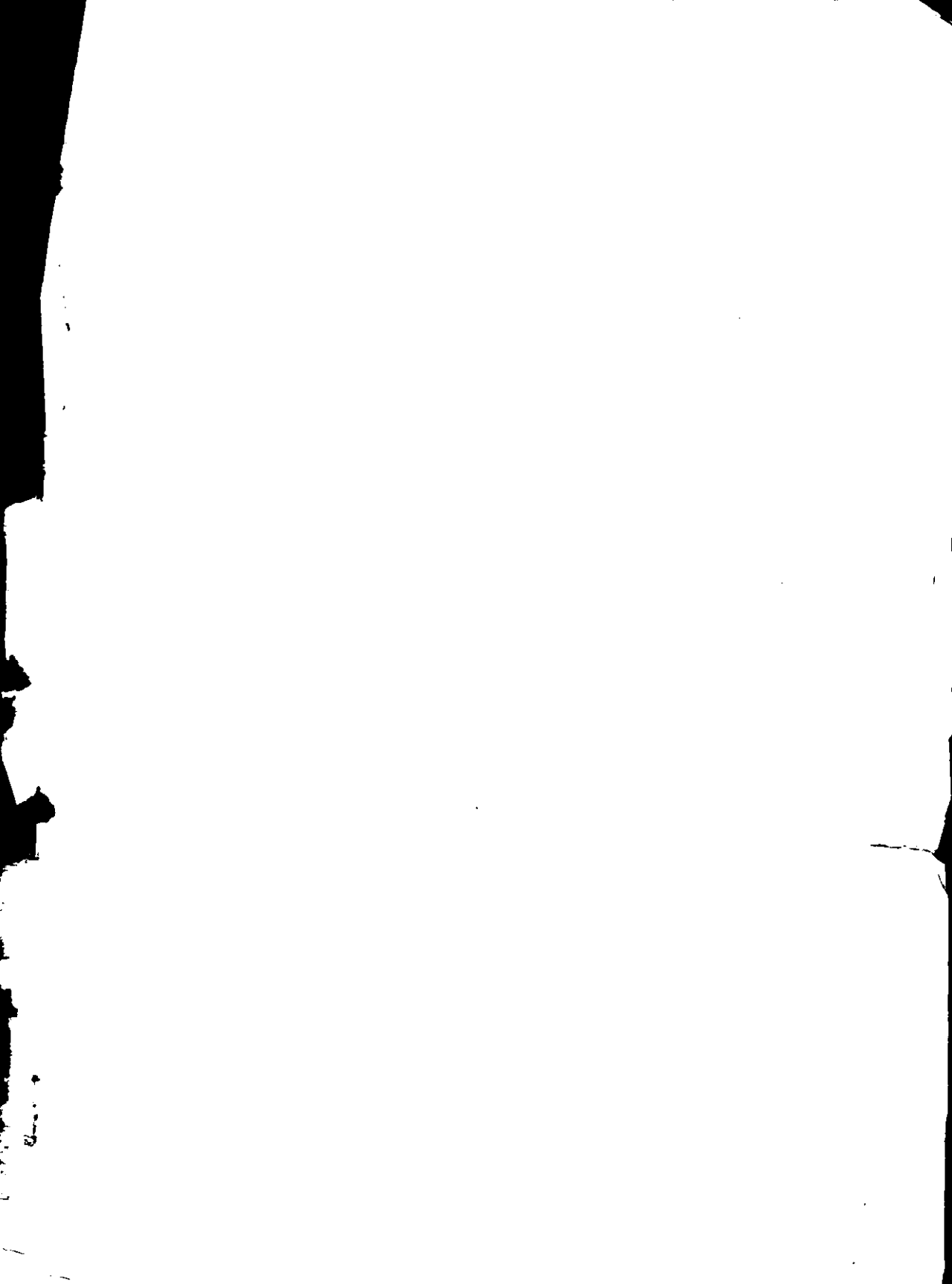
- . *Con agradecimiento especial a E. B. C. Eva D.*

Calderon Garcidueñas por su apoyo brindado.

- *Dr. Ebrique Gomez Morales por su asesoría y*

apoyo brindado para la realización de este

trabajo



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
BASES FÍSICO-QUÍMICAS.....	3
CRIOPROTECTORES.....	5
METODOLOGÍA.....	9
CRIOPRESERVACIÓN.....	12
CONTROL DE CALIDAD.....	13
DISCUSIÓN.....	16
CONCLUSIONES.....	17
REFERENCIAS.....	18

OBJETIVOS

- 1.- Describir las técnicas para criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas y su control de calidad.**
- 2.- Conocer las bases fisico-químicas de la criopreservación.**
- 3.- Evaluar los diferentes tipos de crioprotectores.**

INTRODUCCIÓN.

Durante las últimas cinco décadas han ocurrido progresos significativos en el uso de la inmunobiología del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH), para el tratamiento de pacientes con ciertas enfermedades oncológicas y hematológicas. El resultado ha sido una mayor supervivencia de pacientes con enfermedades neoplásicas malignas, en particular de pacientes relativamente jóvenes con anemia aplásica y leucemia aguda, sometidos al trasplante alogénico de médula ósea.¹

La mielotoxicidad es uno de los principales factores limitantes en el tratamiento quimioterápico y radioterápico de las enfermedades oncohematológicas. El trasplante de médula ósea permite superar esta barrera al proporcionar las células progenitoras para la reconstitución hematopoyética, tras la aplicación de la terapia inhibidora de las células malignas.

La médula ósea puede obtenerse de un donante genotípicamente idéntico (trasplante singénico); de donante genotípicamente no idéntico, preferentemente con identidad para el sistema mayor de histocompatibilidad (trasplante alogénico); o bien del propio individuo (trasplante autólogo)².

El procesamiento de las células hematopoyéticas para trasplante ha permitido ampliar sus posibilidades de obtención en los últimos 10 años, así las células hematopoyéticas pueden ser obtenidas de la médula ósea, de sangre periférica mediante el procedimiento de aféresis de células mononucleares y de sangre de cordón placentario.^{3,4}

El trasplante de médula ósea autóloga se utiliza en pacientes que no disponen de un donante histocompatible. Por ello representa una primera opción frente al trasplante alogénico, especialmente si la contaminación con células tumorales es improbable o si se dispone de métodos de purga eficaces, porque se evita el riesgo de la enfermedad injerto contra huésped, que produce el trasplante alogénico, y esto reduce la movilidad del paciente.

La médula ósea es recogida cuando la enfermedad está en remisión, momento idóneo durante la evolución de la enfermedad. Una vez que mediante el tratamiento quimioterápico se ha logrado la inhibición total de las células neoplásicas en la médula, el enfermo está en la situación ideal para recibir el trasplante medular. La conservación de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) durante este periodo de tiempo puede realizarse a temperatura de 4-10°C durante 54-56 horas en forma de médula total⁵, que es un método sencillo técnicamente, pero tiene el inconveniente de que no permite periodos largos de conservación.

La congelación de la médula ósea, previo fraccionamiento o concentración de la misma aunque técnicamente es más compleja, posibilita la adopción de cualquier método de acondicionamiento pretrasplante y su conservación durante años en nitrógeno líquido, lo que es importante especialmente en los casos en los que se realiza tratamiento para eliminar la enfermedad residual y se guarda una fracción de CPH para su rescate. Por ello la congelación de CPH es la técnica más utilizada por los diferentes grupos que realizan trasplante autólogo y se puede aplicar a CPH de cordón placentario.

En el año de 1955, Barnes y Loutit consiguieron demostrar que la medula ósea podía ser criopreservada correctamente utilizando la técnica empleada por Polge para espermatozoides en presencia de glicerol⁶

A partir de ese momento se comenzaron a desarrollar otras técnicas y se fueron estableciendo los principios generales de la criopreservación.

BASES FÍSICO-QUÍMICAS DE LA CRIOPRESERVACIÓN.

Al exponer las células a bajas temperaturas, se presentan daños provocados por la congelación, estos pueden categorizarse en dos tipos:

FÍSICOS: Por formación de hielo, debido a que el agua al pasar de líquido a sólido, cambia de configuración espacial, lo que provoca la ruptura de las estructuras celulares.

FÍSICO-QUÍMICOS: En los que se observa la desnaturalización de diversos componentes celulares, la suspensión de reacciones catalizadas por enzimas, cambios en el pH y la deshidratación celular.

Los primeros estudios sobre el daño por congelación, demostraron que el daño físico es producido por la formación de cristales de hielo. Las células están sujetas a una serie de eventos físico-químicos, asociados a la pérdida de agua y su conversión en hielo; cuando la temperatura desciende el volumen celular decrece y los solutos extra e intracelulares se concentran provocando cambios en el pH, además las células se colapsan por la diferencia de presión osmótica.

Respecto a dichos fenómenos se han propuesto varias teorías como la de Lovelock⁷ presenta un modelo sobre hematíes en el cual se postula que el daño

celular durante la congelación es consecuencia del aumento en la concentración de electrolitos dentro y fuera de la célula.

Posteriormente en 1963 Meryman^{8,9} propone que el daño de los hematíes no es el resultado directo de la concentración de solutos, sino que esta gran concentración de solutos extracelulares produce una reducción del volumen celular debido a la hiperosmolaridad extracelular por debajo de un volumen mínimo tolerable.

Más tarde Mazur^{10,11} presenta la teoría en la que asocian dos procesos independientes: el primero muestra daño por efectos de alta concentración de solutos en las congelaciones lentas y el segundo, con la formación de cristales intracelulares a las velocidades de congelación rápida. Esto determina que la velocidad de congelación es uno de los factores más importantes que incide en que las células viables puedan congelarse a temperaturas que permitan un almacenamiento indefinido.

Entre los -5°C y -15°C comienza a formarse hielo en el medio extracelular, ya sea de forma espontánea o provocada, hay que tener en cuenta que en toda solución existen centros de nucleación a partir de los cuales empieza a formarse los cristales de hielo. Sin embargo, el interior de las células permanece líquido, pues la probabilidad de que se formen dichos centros es mínima ya que la membrana celular actúa como una barrera, impidiendo el crecimiento del hielo dentro de la célula. En el momento de cambio de estado de líquido a sólido, se produce una liberación de calor, que es la diferencia entre las entalpías del líquido y el sólido.

A medida que se forman los cristales a expensas del agua, se excluyen los solutos, por lo que el medio extracelular experimenta un aumento de osmolaridad creciente. Al continuar el sobreenfriamiento, aumenta la formación de hielo. La concentración de los solutos en el líquido extracelular que permanece sin congelar, produce que la solución baje cada vez más la temperatura de congelación, debido a estos fenómenos se empezó a buscar la manera de proteger a las células a bajas temperaturas.^{3,13,14}

CRIOPROTECTORES. Los agentes crioprotectores modifican la tonicidad de las células haciendo posible el uso de velocidades lentas de enfriamiento, de esta manera se evita o minimiza la congelación intracelular^{15,16}

En 1971, Meryman clasifico a dichos agentes en dos grupos que son

1) Agentes penetrantes: los cuales a concentraciones altas protegen la vida celular contra el daño de una congelación lenta, entre ellos está el glicerol, descrito por Polge, Smith y Parke en 1949. Más tarde en 1959, Loveck. Bishop demostraron un mejor efecto al utilizar dimetilsulfóxido (DMSO). También existen otros compuestos tales como: etilenglicol, etanol, metanol, acetato de amonio y trimetilaminoacetato (TMAA).

El mecanismo por el cual un agente protector penetra previniendo el daño celular es debido a sus propiedades coligativas, de formar puentes de hidrógeno y esto tal vez, nos indique la capacidad del agente protector, para ligar o sustituir el agua. Los factores que se deben considerar para que un agente crioprotector sea conveniente son: baja toxicidad, alta solubilidad en agua y capacidad de enlace con ella, además de su facilidad de penetración por las membranas celulares^{17,1}

II) Agentes no penetrantes: protegen efectivamente a una baja concentración molar y generalmente requieren de una mayor rapidez de enfriamiento, entre estos agentes tenemos compuestos de macromoléculas como la polivinilpirrolidona, algunos azúcares como sacarosa, lactosa, y glucosa y alcoholes de azúcares como manitol, sorbitol y polímeros de almidón.

El mecanismo por el cual otorga protección no ha sido establecido, pero se ha propuesto uno a nivel extracelular, la presencia de estos agentes altera la permeabilidad de la membrana, en donde una salida irreversible de solutos puede ocurrir bajo la presencia de un cambio osmótico. El cambio hipertónico es disminuido durante el congelamiento por la entrada de solutos extracelulares y la lisis hipotónica es impedida durante el descongelamiento por la salida de solutos¹⁸.

Es importante mencionar que el dimetilsulfóxido es uno de los agentes crioprotectores más comúnmente utilizado en la recuperación de granulocitos después de su congelación, ya que dicho agente penetra rápidamente en las células y evita el congelamiento intracelular, previniendo un substancial aumento en la presión osmótica externa y reduciendo la formación de cristales de hielo, por dichas razones es preferentemente utilizado en la criopreservación de células de médula ósea.^{3,19,21}

Por otra parte, su uso condiciona a la vez ciertas desventajas, ya que dentro de las concentraciones aceptadas, no están exentos de efectos tóxicos, temperatura tiempo-dependientes²². Las repercusiones del agravio osmótico así como la abolición de algunas de las funciones celulares y bioquímicas son reversibles en los primeros 30 min. del proceso de congelación²³. Sin embargo, la incorporación del agente crioprotector deberá realizarse lentamente para evitar los efectos

indeseables²³. La temperatura a la que se realiza la mezcla con la médula ósea es de gran trascendencia, cuanto menor sea esta, menor cantidad de sustancia crioprotectora penetrará en la célula. A 4°C podemos asegurar casi la ausencia de toxicidad y alteraciones osmóticas letales sobre las células hematopoyéticas²⁵. Otros investigadores han usado con éxito una combinación de dimetilsulfóxido al 5% como crioprotector intracelular e hidroxietil almidón al 6% como crioprotector extracelular, esta mezcla evita la formación de microagregados y la lisis con la liberación de nucleoproteínas, enzimas lisosomales y la formación de gel.²⁶⁻²⁷

VELOCIDAD DE CONGELACION. El factor principal de riesgo en un proceso de criopreservación es la velocidad de enfriamiento, debido a esto se ha sugerido al inicio de la congelación, de un descenso térmico de 1-2°C/min., hasta llegar a -20° o -30°C.

Si la velocidad de congelación es lo suficientemente lenta, la progresiva pérdida de agua deshidratará a la célula, pero esta no se congelará. Si el descenso de temperatura continúa, la deshidratación excesiva dañará a la membrana celular y a sus estructuras internas, que contribuirán a la destrucción celular por un mecanismo no del todo claro, pero en el que la deshidratación y la reducción del volumen celular son críticos. Si, por el contrario, la velocidad de congelación es rápida, se evitará la salida del agua del interior de la célula al medio extracelular, pero su interior se sobre enfriará lo suficiente para provocar que la formación de hielo sea muy elevada, y consecuentemente se producirá la destrucción de las estructuras internas y de la membrana celular por cambios mecánicos.

Independientemente de la velocidad de congelación, se debe de llegar a la temperatura de $-40^{\circ}\text{C}^{2,3,28}$, esta es la llamada temperatura eutéctica del sistema, a partir de la cual se produce una congelación homogénea con la formación de un sólido amorfo, es decir sin una estructura cristalina, en la que la formación de sólidos no daña las estructuras celulares. A partir de esta temperatura, la muestra permanece inalterada y puede almacenarse a temperaturas más bajas.

Para que estos fenómenos ocurran es necesario que el agua este "libre", es decir, no este ligada a otras moléculas, o lo que es lo mismo "congelable".

Es justamente modificando el comportamiento del agua en lo que se basa la acción de las sustancias llamadas "crioprotectoras". Estas, unidas a una velocidad de congelación óptima, logran las máximas recuperaciones de viabilidad tras los procesos de congelación y descongelación²⁸

Los métodos de congelación se dividen en:

1.- Congelación Lenta: es el método más común y consiste en bajar la temperatura gradualmente, esto provoca un flujo de agua intracelular hacia el exterior, donde se congela y forma un pequeño número de cristales de hielo. De manera similar las tasas de enfriamiento que se manejan están entre 0.5 y $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sin embargo se han reportado tasas del orden de 0.1 a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

2.- Congelación Rápida: consiste en la inmersión directa de las células en nitrógeno líquido, este método provoca la formación de un gran número de cristales de hielo, distribuidos en los tejidos con uniformidad.

3.- Congelación por Pasos: Este método consiste en congelar las células en etapas y temperaturas predeterminadas. Cuando la muestra alcanza una

temperatura entre los -35°C a -40°C y el agua congelable de la célula ha salido para convertirse en hielo externo, pasándose directamente al nitrógeno líquido.

Varios autores coinciden en que el mejor método de criopreservación de células hematopoyéticas obtenidas de medula ósea es la conservación en nitrógeno líquido, bien sea a corto o largo plazo, aún cuando estos no requieran de un control de temperatura.

El método con el que se ha obtenido mayor viabilidad celular cuando se ha llevado en forma controlada ha sido el de enfriamiento lento, con la siguiente desventaja de que se requiere de un complejo y costoso proceso²⁹. Otros autores han tenido buenos resultados sin utilizar una temperatura controlada,³⁰ resultando un proceso más simple en el que se abaten los costos y pudiéndose almacenar en congelador a -80°C

Malinin y colaboradores reportan que la criopreservación de células de medula ósea a -196°C produce mejores resultados que cuando se conservan a -79°C , temperatura que se considera efectiva en la producción de sistemas celulares de reconstitución hematopoyética después de ser irradiadas³¹.

METODOLOGÍA.

La criopreservación de medula ósea esta suficientemente estandarizada en sus aspectos metodológicos. Aunque recientemente se ha sugerido el empleo de técnicas distintas^{26,27,29,30,31}, la mayoría de los grupos realizan el mismo procedimiento que se describe a continuación.

Los fundamentos criobiológicos sustentan la necesidad de una congelación programada, controlada con una descongelación rápida. Sin embargo, la

obtención y procesamiento de la médula ósea son los pasos fundamentales, donde una manipulación adecuada de la muestra es necesaria para facilitar su criopreservación posterior y garantizar el resultado final del procedimiento.

OBTENCIÓN DE LA MEDULA ÓSEA.

Esta se realiza en quirófano bajo anestesia general, mediante múltiples aspiraciones en crestas ilíacas posteriores y anteriores. El trócar que se usa es una modificación de la aguja de Jamshidi que posee un cabezal con una adaptación más cómoda para la mano, lo cual permite puncionar repetidas veces una superficie dura como es la cortical del hueso. La médula ósea aspirada se transfiere directamente a una bolsa estéril con suero salino (100 cc) o medio de cultivo (100 cc) y heparina libre de preservantes (15000 u a 20000 u.) Es importante agitar la bolsa cada vez que se deposita médula ósea para asegurar una mezcla lo más rápida posible con la solución anticoagulante. Puesto que el producto que se obtenga va a ser sometido a un proceso de separación celular por centrifugación,

No es necesario filtrar la médula extraída en quirófano. Normalmente en donantes adultos, se extraen de 600 a 1,000 ml de médula (10-15 ml / Kg. de peso) la cual debe de tener una concentración celular entre 20 y 30 $\times 10^9$ /L. Teniendo en cuenta las pérdidas durante el fraccionamiento y congelación, es necesario obtener la cifra de células nucleadas que asegure una recuperación hematopoyética completa tras la infusión de la médula descongelada. Esta cifra depende fundamentalmente del método de concentración que se utilice, procurando en

cualquier caso disponer un mínimo de 0.2×10^9 /Kg células mononucleares / Kg del receptor en el momento de la criopreservación.

Para concentrar la medula ósea, es conveniente reducir el volumen total extraído retirando hematíes y plasma, pero conservando las células pluripotenciales hematopoyéticas. La optimización del proceso de concentración medular es importante por varias razones³² ya que permite en primer lugar, reducir el espacio de almacenamiento y el volumen de crioprotector utilizado (DMSO.) Por otro lado, la eliminación de la mayor parte de los hematíes antes de la criopreservación disminuye la cantidad de hemoglobina libre transfundida con la medula descongelada. Los polimorfonucleares son células muy sensibles al daño crioinducido y son fuente de enzimas lisosomales y ADN que favorece la formación de agregados celulares tras la descongelación. Su presencia contribuye a aumentar la pérdida celular y por lo tanto, aunque no es un requisito indispensable, es deseable disminuir el número de granulocitos durante el procesamiento de la medula.

El método óptimo de purificación de células mononucleadas (CMN) es la centrifugación en gradiente de Ficoll, esta técnica ha sido reproducida de manera automatizada. Con ello, no solamente se consigue simplificar el procedimiento sino también se evita una manipulación abierta de la medula ósea. Otras técnicas alternativas de separación celular son la doble centrifugación y la concentración de medula ósea en un procesador celular, con mayor o menor purificación de células mononucleadas dependiendo del programa a utilizar. El resultado final en todas ellas es un concentrado de células mononucleares de medula ósea (CMN), con

la ventaja de una mayor sencillez y rapidez del procedimiento y una menor manipulación.

CRIOPRESERVACIÓN.

Para que la criopreservación se lleve a cabo en forma adecuada deben estar viables más del 90% de las CMN, la medula ósea concentrada se distribuye en bolsas de ultracongelación y a cada una de ellas se añade lentamente en un periodo de 10 a 15 minutos en total, un volumen equivalente de solución crioprotectora enfriada (plasma o medio de cultivo (Tc 199) 80%/DMSO 20% volumen a volumen), preparado, con anterioridad de este modo la concentración final de DMSO es del 10%. Antes de añadir el crioprotector, hay que determinar el número de bolsas y la concentración celular final de la mezcla (tiene que estar entre 10 y 50×10^9 /L). Para que el volumen y la concentración de células en cada bolsa sean óptimas, este proceso preferente se lleva a cabo a 4°C, con agitación frecuente para evitar la toxicidad del crioprotector, y en campana de flujo laminar, para evitar contaminación microbiana; rápidamente, se disponen tres criotubos para control con 1.8 ml de la mezcla, se sellan las bolsas y se colocan entre dos placas de aluminio para lograr una fina capa homogénea y se inicia el proceso de congelación propiamente dicho.

Este es efectuado en un congelador biológico programado por microprocesadores (Cryoson BV-6, BV-10 o Cryomed) a una velocidad de enfriamiento aproximada de 1 a 2°C/min.. Tanto la temperatura de cámara como la muestra deben ser registrados por medio de dos termopares. Durante la primera parte del proceso al llegar a la temperatura aproximada de -6°C, se induce la congelación de la

muestra por medio de un descenso brusco de la temperatura de la cámara, que debe ser suficiente para contrarrestar el calor de fusión pero no excesivo para evitar enfriamientos superiores a 3°C/min. Una vez finalizado el programa las bolsas se almacenan en nitrógeno líquido a -196°C, donde todas las reacciones metabólicas se detienen y las muestras pueden mantenerse viables durante periodos muy prolongados.^{29,33}

La descongelación de las bolsas se realiza de manera rápida a baño maría con una temperatura de 37° a 40°, durante 1 o 2 minutos para evitar el fenómeno de conglomerados.

CONTROL DE CALIDAD DEL PRODUCTO CRIOPRESERVADO

Dentro del control de calidad, los parámetros que se miden son:

1.- Eficacia del producto: El ensayo más común para las células progenitoras es la prueba de la exclusión por colorante. Las células viables expuestas a azul de tripano excluyen el colorante, pero las células no viables permiten el ingreso del colorante y se tiñen de azul.

Las células se cuentan en un hemocitometro y se calculan los porcentajes de células viables, y para un mayor margen de seguridad en el trasplante, la medición se hace por citometria de flujo que cuantifica las líneas celulares, con anticuerpos monoclonales para el antígeno CD34 +.

2. -Eficacia del producto criopreservado: Los ensayos de células progenitoras se basan en la capacidad para producir colonias en gel blando, preparado de agar o metil celulosa. Las células clonogénicas, denominadas unidades formadoras de colonias se definen por el tipo de progenie madura que

desarrollan. Las células de baja densidad están suspendidas en un gel blando que contiene un medio de cultivo nutritivo, suero o plasma y los correspondientes factores estimuladores de colonias (CSF); los cultivos se incuban a 37° C en aire humidificado que contiene CO₂ del 5% al 10%, después de siete a catorce días de cultivo las células progenitoras proliferan y se diferencian para formar colonias celulares que son visibles en un microscopio invertido.

3. - SEGURIDAD DEL PRODUCTO: Los procesos implicados en la extracción, procesamiento y manipulación de CPH plantean el riesgo de contaminación microbiana. La forma más común de contaminación es bacteriana. Los estándares de la AABB (American Asociation OF Blood Bank), requieren que todos los métodos de extracción usen técnicas asépticas conocidas, para producir una aceptable viabilidad y recolección de CPH . Se les solicita a los servicios de extracción o procesamiento que tomen una muestra representativa de cada colección de CPH y se investiguen eventuales contaminaciones bacterianas y micóticas, una vez completada la extracción y procesamiento. Los procedimientos de control del proceso deben incluir cultivos periódicos de los reactivos que se requieran en el procesamiento de las CPH en especial si están preparadas en el laboratorio local. Los baños acuosos usados para el descongelamiento deben mantenerse limpios y periódicamente hay que realizar cultivo microbiológico de las muestras.

Diversos estudios han sugerido que el almacenaje en nitrógeno líquido puede ser una fuente de contaminación para las CPH. Algunos de los microorganismos

DISCUSIÓN.

Aunque existen mecanismos no bien conocidos de las lesiones crioaducidas y de la acción de los agentes crioprotectores sobre la CPH, la criopreservación actualmente es un proceso que garantiza la reconstitución de la hematopoyesis, la cual podemos apreciar en cultivos "in vitro" de las CPH, después de un tiempo de criopreservadas.

Los factores que se deben tomar en cuenta para una exitosa criopreservación son: el número de células recolectada que debe ser mayor de 2×10^8 células mononucleares / Kg del receptor, el tipo de crioprotector, su toxicidad y la temperatura de aplicación entre los cuales se ha usado el DMSO al 10% y a 4°C ó bien la mezcla de HES al 6% y DMSO al 5% dando mejores resultados al prevenir la formación de microagregados y evitar la lisis de granulocitos .

Así mismo se han hecho estudios sobre la congelación lenta y la rápida, siendo esta última menos complicada y costosa.

Por lo anterior se puede concluir que la criopreservación de CPH es un proceso estandarizado y reproducible.

CONCLUSIONES

La criopreservación es el método más comúnmente utilizado para la preservación a largo plazo de medula ósea, siempre y cuando se controlen parámetros tales como: la temperatura de congelación, el agente crioprotector, la velocidad de enfriamiento, con lo cual se logra conservar muestras hasta por más de 10 años. El éxito de un implante de células (stem-cell) depende de una adecuada obtención, cantidad, preservación y almacenaje de las células. La congelación rápida ofrece los mismos resultados, y su principal inconveniente es que el tiempo de almacenamiento es menor a 3 meses, lo cual limita su utilidad.

REFERENCIAS.

- 1.- Areman EM, Sacher RA, Deeg HJ. Processing and storage of human bone marrow: a survey of current practices in North America. *Bone Marrow Transplantation*. 1990; 6: 203-209
- 2.- Lamana M L. Criopreservación de médula ósea. *Sangre* 1990 35 (6) 451-458:
- 3.- Hubel A. Parameters of cell Freezing: Implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfusion Medicine reviews*, Vol 11, No. 3. 1977: 224-233
- 4.-Guide to the preparation use and quality assurance of blood componentsd 6th edición
- 5.- Burnett AK, Watkinns R, Maharaj D. et. al. Transplantation of unpurged autologous bone marrow in acute myeloid leukemia in first remission. *Lancet II*: 1984; 1068-70
- 6.- Polge C, Smith A, Parkes A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164: 666-676
- 7.- Lovelock J. Haemolysis by thermal shock. *Br. J. Haematol* 1955; 1: 117-129
- 8.- Meryman HT. Mechanism of freezing in living cells and tissues science. 1956; 124: 515-521
- 9.- Meryman HT. Principles of cryopreservation. En Glassman A.B. y Umlas J. Eds: *Cryopreservation of tissue and solid organs for trasplantation*. Arlington: Am Assoc of Blood Banks 1983; 1-12
- 10.- Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology*. 1966(2) 181-192.

- 11.- Mazur . P .The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates *Cryobiology* 1977,14,251-272
- 12.- Meryman HT. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology*. 1971; 8: 489-98
- 13-Sherman J.K Relation of ice formation to ultrastructural cryoinjury and cryoprotection of rough endoplasmic reticulum *Cryobiology*, 1976, 13, 599-608
- 14- Effects of the temperature, the duration of frozen storage and the freezing container on in vitro measurements in human peripheral blood mononuclear cells
- 16.- Meryman HT. Cryoprotective agents. *Cryobiology*. 1971; 8: 137-183
- 17.- Lovelock JE. The mechanism o the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Bioch Biophys Acta* 1953; 11: 28-36
- 18.- McGann LE. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Cryobiology*. 1978; 8: 489-98
- 19 -Hill RS, Mackinder S. Recovery of functional capacity of human granulocytes after freeze-preservation with Dimethyl Sulphoxide. *Cryobiology*. 1979; 46: 105-11
- 20- Ronal E. Barnnet The effects of Dimethylsulfoxide an Glycerol on Na+ K+ ATP ase and menbrane structure *Cryobiology* 1978 ,15,227-229
- 21.- M. Bock . M. Schueuning Cryopreservation of human platelets with Dimethyl sulfoxide: changes in biochemistry and cell funtion *Transfusión* ,1995 ,35,921-924
- 22-Neurological events associated with the infusion of cryopreserved bone marrow and / or peripheral blood progenitor cells *Bone marrow transplantation* 2000 ,25,(12),285-287
- 23.- Douay L, Gorin NC, David R. et. al. Study of granulocyte macrophage

progenitor preservation after slow freezing on bone marrow in the gas phase of liquid nitrogen. *Exp. Hematol.* 1982; 10: 360-366

24.- Fahyh GM. Cryoprotectant toxicity: Biochemical or osmotic. *Cryo-Sett.* 1984; 5: 79-90

25.- Ashwood Smith MJ. Current concepts concerning radioprotective and cryoprotective properties of Dimethyl sulfoxide in cellular systems. *Ann N Y Acad Sci.* 1975; 246-255.

26.-Patrick J. Stiff Unfractionated human marrow cell cryopreservation using Dimethylsulfoxide an Hydroxyethyl starch *Cryobiology* 1983,20,(17)

27.- Patrick J. Stiff Alan autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in Dimethylsulfoxide and Hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing *Blood* ,1987 ,70,(4),974-978

28.- Stephen J Forman ,Karl G. Blume E. Donnall Thomas – Bone Marrow Transplantation . Blackwell Scientific Publication 1994.

29.- R.S . Hill V. Carrinton A new controlled-rate cooling apparatus for freezing hematopoietic cell for storage at -196°C *Cryobiology* 1973,10.1-8

30.- J Clark .A. Pati Succesful cryopreservation of human bone marrow does not require a controlled-rate freezer *Bone marrow transplantation* 1991,7,121-125

31.- S. Markino M Harada A simplified method for cryopreservation of peripheral blood Stem cells at -80°C without rate-controlled freezing *Bone marrow transplantation* 1991,8, 239-244

32.- Gorin NC. Collection, manipulation and freezing of haemopoietic stem cells. *Clin. Haematol.* 1986; 15: 19-48

33.- M Grande Morphological, cytochemical and culture study of normal human bone marrow frozen at -196°C
34.- Fontain .D.Ralston .M Higgins .N. Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic Stem cell components. Transfusion 1997 .37,585-59