

Criobiologia i hivernació

À. González i Sistal i Ll. Estrada i Garcia*

Departament de Ciències Fisiològiques, Humanes i de la Nutrició. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.
* Hospital de Tarragona Joan XXIII.

Introducció

La criobiologia, aplicació del fred als organismes vius i a d'altres components biològics, s'ha desenvolupat en els darrers anys de manera molt important. En l'actualitat s'utilitza en camps molt diversos: conservació d'aliments, tècniques de fecundació artificial, trasplantament d'òrgans, cirurgia cardíaca, hematologia¹⁻³, etc. El fred actua alentint o aturant les reaccions químiques i, consegüentment, els processos biològics. Un efecte del fred és, doncs, alentir o aturar el temps biològic. Algunes espècies animals pesenten durant l'hivern un estat d'hivernació natural, caracteritzat per una disminució de la seva temperatura corporal, que s'acompanya d'una forta disminució del metabolisme, de les necessitats energètiques i de totes les funcions de l'organisme; en el cas d'alguns amfibis arriba a l'arrest cardíac, circulatori i respiratori reversibles. Per analogia, el terme hivernació artificial s'aplica a les situacions de hipotèrmia induïda.

La velocitat del metabolisme i el temps biològic s'alentixen progressivament en disminuir la temperatura, i s'aturen a temperatures per sota dels -130°C . Això permet pensar que d'una forma artificial es pot reproduir aquesta situació en l'ésser humà, a fi d'aconseguir la detenció reversible del procés biològic el temps necessari per trobar solució a malalties i altres processos que suposen un perill.

Aquí es pretén descriure breument els efectes biològics de la congelació i les seves implicacions mèdiques.

Congelació

En la congelació es poden distingir tres fases: el procés de congelació, la permanència a baixes temperatures i el procés de descongelació.

Les cèl·lules o organismes vius a temperatures per sota dels -130°C poden mantenir-se estables durant milers d'anys; naturalment no existeix una comprovació experimental directa, però se sap que a aquestes temperatures no existeix aigua líquida. En conseqüència, la viscositat és molt alta (per sobre dels 10^{13} poises), i els fenòmens de difusió de les reaccions bioquímiques no es poden dur a terme⁴.

D'altra banda, a la temperatura del nitrogen líquid (-196°C), que és el refrigerant utilitzat habitualment, no hi ha suficient energia tèrmica per dur a terme les reaccions químiques.

Correspondència: Àngel González i Sistal.
C/Sardenya, 398. Pral. 2a, 08025 Barcelona.

Paraules clau:

Criobiologia. Hivernació. Hipotèrmia. Congelació. Crioprotectors.

Ann Med (Barc) 1990; 76:279-281.

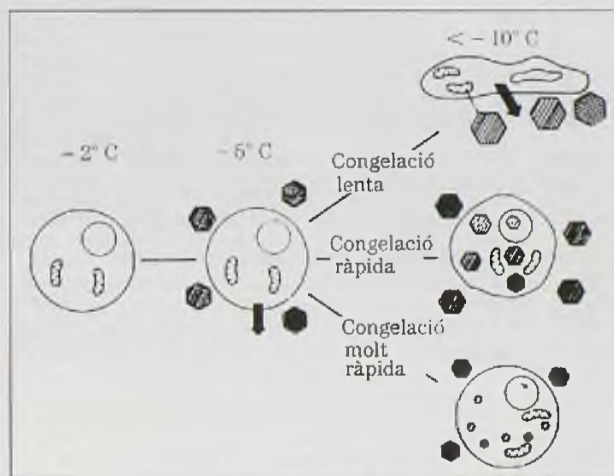


Fig. 1. Esquema de la fase de congelació a nivell cel·lular. Els hexàgons representen cristalls de gel. Font: P. Mazur¹⁰.

Les úniques reaccions que es poden donar a aquestes temperatures són les produïdes per radiacions ionitzants⁵. Els càlculs teòrics indiquen que si les radiacions ambientals de fons fossin igual de nocives en estat de congelació, podrien produir la mort de més de la meitat de les cèl·lules en un període de 2.000 a 4.000 anys⁶. Experiments fets sobre cèl·lules congelades a les quals s'han aplicat radiacions ionitzants, unes 100 vegades superiors a les ambientals usals, durant més de 5 anys, no han evidenciat morts cel·lulars atribuïbles a les radiacions⁷. En ser possible protegir els elements congelats de les radiacions, aquest efecte no és preocupant.

Així doncs, les dificultats de la congelació no deriven de la permanència a temperatures molt baixes, sinó dels processos de congelació i descongelació, que són molt crítics. Especialment en la banda de temperatures entre -10°C i -50°C .

Processos de congelació i descongelació

L'existència de criomicroscopis ha permès verificar i visualitzar els esdeveniments que es produeixen durant la congelació^{8,9}.

És conegut que l'existència de soluts a l'aigua produeix un descens del punt de congelació, i que la cristallització de l'aigua pot no iniciar-se en el mateix punt de congelació, sinó a temperatures més baixes (sobrefredament).

D'altra banda, l'aigua en estat sòlid pot estar cristallitzada amb cristalls de diferent format o pot no estar-ho (gel no cristallitzat).

En el procés de congelació cel·lular tenen lloc una sèrie d'esdeveniments esquematitzats a la figura 1. Per so-

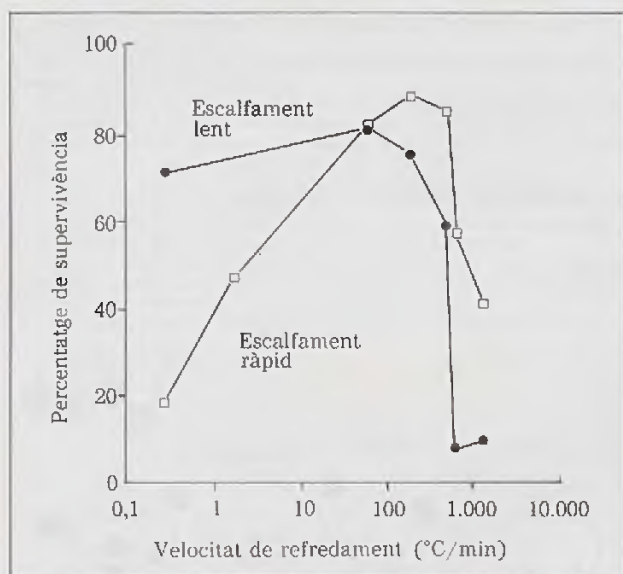


Fig. 2. Supervivència dels hematies en una solució de 2 M de glicerol, en relació a diferents velocitats de refredament i escalfament. En tots els casos s'ha arribat als -196°C . Font: R.H. Miller et al²¹.

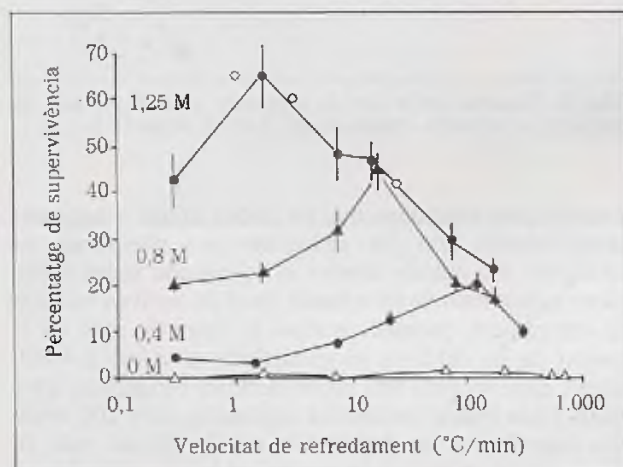


Fig. 3. Supervivència de cèl·lules de medul·la òssia de ratolí, per diferents concentracions de glicerol, en funció de la velocitat de refredament. Font: C.P. Leibo et al²².

bre dels -5°C , les cèl·lules i el medi extracel·lular es mantenen sense congelar. Entre -5°C i aproximadament -10°C té lloc la formació de cristalls en el medi extracel·lular, però no dins de la cèl·lula, possiblement a causa de la barrera que ofereix la membrana cel·lular. La formació de cristalls en el medi extracel·lular produeix una disminució de la proporció d'aigua extracel·lular en estat líquid que provoca la sortida d'aigua intracel·lular; aquesta tendeix a equilibrar el procés i, consegüentment, el potencial químic¹⁰. L'evolució posterior depèn de la velocitat de refredament.

Si el refredament és suficientment lent, la cèl·lula va perdent aigua de manera que s'incrementa la concentració intracel·lular de soluts i el potencial químic de l'aigua intracel·lular s'equilibra amb el de l'aigua extracel·lular. Així la cèl·lula es deshidrata, però no es produeix cristallització intracel·lular. Si el refredament és ràpid, la cèl·lula no aconsegueix perdre aigua suficient per assolir l'equilibri i es produeix un sobrefredament

que porta a la cristallització de l'aigua dins la cèl·lula. La grandària dels cristalls intracel·lulars creats dependrà de la velocitat de refredament. A més velocitat, els cristalls seran més petits¹¹. Aquests esdeveniments han estat quantificats de manera teòrica per P. Mazur¹², que va proposar un conjunt d'expressions quantitatives. Aquestes expressions permeten calcular el grau de sobrefredament i determinar si es produirà cristallització intracel·lular en funció de la velocitat de refredament, la permeabilitat de la cèl·lula per l'aigua, el coeficient de variació de la permeabilitat amb la temperatura, els osmols inicials de solut a la cèl·lula i la relació entre la superfície i el volum cel·lular. En el procés de descongelació, la velocitat d'escalfament també juga un paper clau, especialment en els casos en què el procés de congelació ha estat ràpid (cristalls de petit format)^{13,14}. Si la descongelació és lenta, els cristalls s'agrupen i augmenten el format, i es produeix el fenomen conegut com a recristallització. Si la descongelació és suficientment ràpida, s'evita o es disminueix la recristallització^{10,15}.

Supervivència cel·lular i crioprotectors

La supervivència cel·lular després d'un procés de congelació i descongelació a molt baixes temperatures (-196°C) depèn primordialment de la velocitat de congelació, de la velocitat de descongelació, de la concentració de crioprotectors i del tipus de cèl·lula¹⁶.

Per a velocitats de congelació lentes, la supervivència és molt petita; en augmentar la velocitat la supervivència augmenta fins a arribar a una velocitat de congelació òptima. Després la supervivència torna a disminuir i es fa, finalment, molt petita. La velocitat òptima de congelació és diferent per als diferents tipus cel·lulars¹⁷; així, als limfòcits humans, amb crioprotecció, és de l'ordre dels $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, mentre que per als hematies humans amb la mateixa crioprotecció és d'uns $1.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ¹⁸⁻²⁰.

En utilitzar una velocitat de congelació inferior a l'òptima, la supervivència és millor per a velocitats de descongelació lentes. Quan la velocitat de congelació és superior a l'òptima, la supervivència és millor per a velocitats de descongelació ràpides. Per a velocitats de congelació properes a l'òptima, s'obté una supervivència elevada, relativament independent de la velocitat de descongelació²¹ (fig. 2).

Els crioprotectors milloren la supervivència per a velocitats de congelació lentes i no varien sensiblement per a velocitats ràpides. En augmentar la concentració de crioprotectors, s'assoleixen nivells més alts de supervivència i esdevenen òptimes velocitats de congelació més lentes²² (fig. 3).

Per explicar els fets anteriors, s'ha proposat l'existència de dos factors o tipus de lesió que afecten la supervivència cel·lular. Un que predominaria en les velocitats de congelació ràpides i que s'identifica amb la cristallització intracel·lular, i l'altre que predominaria en les velocitats de congelació lentes i que estaria influït per la concentració de crioprotectors²³. Així, el percentatge total de cèl·lules lesionades correspondria aproximadament a la suma del percentatge de cèl·lules afectades per cadascun d'aquests factors.

Això explicaria l'existència d'una velocitat òptima de congelació i també les variacions de supervivència pro-

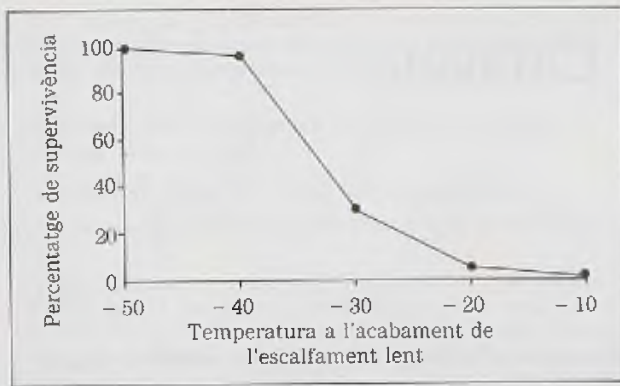


Fig. 4. Efecte de la recristal·lització en la supervivència. Microorganismes de llevat, escalfats lentament des de -196°C fins a la temperatura indicada i, a partir d'aquí, ràpidament. Font: P. Mazur¹⁰.

duïdes pels crioprotectors. En augmentar la concentració de crioprotectors, disminueix l'efecte letal de la congelació lenta i augmenta el percentatge màxim de supervivència, si és possible. Un cop obtingut un percentatge de supervivència proper al 100 %, el punt òptim de congelació es transforma en un interval òptim que inclou velocitats de congelació cada vegada més baixes²⁴.

S'ha trobat que la letalitat per a velocitats de congelació ràpida està directament relacionada amb la cristallització intracel·lular. Això ha estat quantificat i s'han proposat diferents expressions analítiques i models matemàtics que expliquen els fets experimentals²⁵.

Sembla clar que l'efecte nociu de la cristallització intracel·lular depèn del format dels cristalls. Així, els cristalls molt petits no serien nocius per a la cèl·lula i per tant es podria aconseguir un alt nivell de supervivència si els processos de congelació i descongelació fossin prou ràpids^{13, 14, 21, 22, 26, 27}.

Sembla, doncs, que en el cas de les velocitats de congelació molt ràpides l'etapa que disminuiria la supervivència seria principalment el procés de descongelació, en el qual augmenta la grandària dels cristalls en el fenomen de recristal·lització descrit abans^{28, 29} (fig. 4).

En la descongelació lenta no estan clarament identificats els mecanismes pels quals es produeix l'efecte nociu. S'han considerat implicats la deshidratació cel·lular, la fracció d'aigua extracel·lular no cristallitzada i l'actuació mecànica dels cristalls extracel·lulars³⁰⁻³².

Els treballs experimentals mostren una millor relació entre la fracció d'aigua extracel·lular no cristallitzada i la supervivència que entre aquesta i la hiperconcentració intracel·lular de soluts.

Així mateix, treballs de microscòpia han mostrat que els cristalls extracel·lulars deixen les cèl·lules confinades en petits canals. S'ha proposat com a possible explicació que el dany produït sigui degut a la compressió provocada pels cristalls extracel·lulars sobre unes cèl·lules probablement molt poc deformables.

El fet que els organismes pluricel·lulars estiguin constituïts per diferents tipus cel·lulars, amb diferents comportaments envers la congelació, implica una dificultat més gran per aconseguir que la congelació sigui adequada a les diferents cèl·lules que els formen.

Els crioprotectors fan possible l'ampliació de l'interval òptim de congelació i ajuden a aconseguir una velocitat de congelació adequada als diferents tipus cel·lulars.

S'ha aconseguit la congelació reversible d'embrions humans i les possibilitats que obren futurs avenços creen grans expectatives.

BIBLIOGRAFIA

- Alexi-Meskishvili VV, Nikoljuk AP, Churkin VM, Abdurachimov ZZ. Deep hypothermia with reduced flow rates for correction of ventricular septal defects in infants. *Thorac Cardiovasc Surgeon* 1985; 33:157-161.
- Mohri H, Dillard D. Hypothermia for cardiovascular surgery. Tokyo-Nova York, Igaku-Shoin, 1981.
- Offerijns FG, Freud GE, Krijnen HW. Reanimation of myocardial cells preserved in the frozen state. *Nature Londres* 1969; 222:1.174-1.175.
- McGee HA, Martin WJ. Cryochemistry. *Cryogenics* 1962; 2:1-11.
- Rice FO. History of radical trapping. A: Bass AM, Broida HP, eds. Formation and trapping of free radicals. Nova York, Academic, 1960:7.
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanism and implications. *Am J Physiol* 1984; 247:125-142.
- Lyon MF, Glenister P, Whittingham DG. Longterm viability of embryos stored under irradiation. A: Zeilmaker GH, ed. Frozen storage of laboratory animals. Stuttgart. Fischer Verlag, 1981; 139-147.
- Diller KR, Cravalho EG. A cryomicroscope for the study of freezing and thawing processes in biological cells. *Cryobiology* 1970; 7:191-199.
- Leibo SP, McGrath JJ, Cravalho EG. Microscopic observation of intracellular ice formation in mouse ova as a function cooling rate. *Cryobiology* 1978; 15:257-271.
- Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 1977; 14:251-272.
- Nei T. Structure and function of frozen cells: freezing patterns and post-thaw survival. *J Microsc Oxford* 1978; 112:197-204.
- Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the like-lihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963; 47:347-369.
- Mazur P. Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing. Meryman Ht Ed *Cryobiology*. Londres, Academic, 1966; 213-315.
- Mazur P. Survival of fungi after freezing and desiccation. A: Ainsworth GC, Sussman AS, eds. *The Fungi*, Nova York, Academic 1968; III:325-394.
- Mazur P, Schmidt J. Interactions of cooling velocity, temperature, and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeast. *Cryobiology* 1968; 5:1-17.
- Rall WF, Mazur P, Macgrath JJ. Depression of the ice-nucleation temperature of rapidly cooled mouse embryos by glycerol and dimethyl sulfoxide. *Biophys J* 1983; 41:1-12.
- Leibo SP. Preservation of ova and embryos by freezing. A: Brackett EG, Seidel GE, Seidel SM, eds. *New Technologies in Animal Breeding* Nova York, Academic, 1981; 127-139.
- Thorpe PE, Knight SC, Farrant J. Optimal conditions for the preservation of mouse lymph node cells in liquid nitrogen using cooling rate techniques. *Cryobiology* 1976; 13:126-133.
- Morris GJ, Farrant J. Interactions of cooling rate and protective additive on the survival of washed human erythrocytes frozen to -196°C . *Cryobiology* 1972; 9:173-181.
- Rapatz G, Luyet B. Combined effects of freezing rates and of various protective agents of the preservation of human erythrocytes. *Cryobiology* 1968; 4:215-222.
- Miller RH, Mazur P. Survival of frozen-thawed human red cells as a function of cooling and warming velocities. *Cryobiology* 1976; 13:404-414.
- Leibo SP, Farrant J, Mazur P, Hanna MG, Smith LH. Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol. *Cryobiology* 1960; 6:315-332.
- Mazur P, Leibo SP, Chu EHY. A two-factor hypothesis of freezing injury-evidence from Chinese hamster tissue culture cells. *Exp Cell Res* 1972; 71:345-355.
- Mazur P, Leibo SP, Farrant J, Chu EHY, Hanna MG, Smith LH. Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. A: Wolstenholme GEW, O'Connor M, eds. *The frozen cell*. Londres, Churchill, 1970; 69-88.
- Boutron P. Comparison with the theory of the kinetics and extent of ice crystallization and of the glass-forming tendency in aqueous cryoprotective solutions. *Cryobiology* 1986; 23:82-102.
- Asahina E, Shimada K, Hisada Y. A stable state of frozen protoplasm with invisible intracellular ice crystals obtained by rapid cooling. *Exp Cell Res* 1970; 59:349-358.
- McGann LE, Turner AR, Allalunis MJ, Turc JM. Cryopreservation of human peripheral blood stem cells: optimal cooling and warming conditions. *Cryobiology* 1981; 18:469-472.
- Bank H. Visualization of freezing damage. Structural alterations during warming. *Cryobiology* 1973; 10:157-170.
- MacKenzie AP. Death of frozen yeast in the course of slow warming. A: Wolstenholme GEW, O'Connor M, eds. *The frozen cell*. Londres, Churchill, 1970; 89-96.
- Lovelock JE. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 1953; 10:414-426.
- Lovelock JE. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 1953; 11:28-36.
- Rapatz GL, Menz LJ, Luyet BJ. Anatomy of the freezing process in biological materials. A: Meryman HT, ed. *Cryobiology*. Nova York, Academic, 1966; 139-162.