

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

CRIOPRESERVACION DE CELULAS ROJAS DE FENOTIPOS
DE BAJA FRECUENCIA

ANNA LUCIA QUINTO DIAZ

INDICE

I.	RESUMEN	3
II.	INTRODUCCIÓN	5
III.	ANTECEDENTES	7
	A. Preservación sanguínea	7
	B. Criobiología	7
	1. Criopreservación celular	8
	1.1 Congelación	8
	1.2 Crioprotectores	12
	1.3 Descongelación	15
	1.4 Lesiones crioaducidas	17
	1.5 Lavado celular	19
	C. Criopreservación de células rojas	21
	1. Membrana plasmática	21
	2. Formas de transporte de agua y solutos	22
	3. Estudios sobre la criopreservación de eritrocitos	24
	4. Cambios físicos de los eritrocitos después de criopreservación	25
	D. Métodos de evaluación de calidad de eritrocitos criopreservados	27
	1. Viabilidad celular	27
	2. Fragilidad osmótica	27
	3. Antígenos eritrocitarios	28
	4. Hematología, morfología, inocuidad y esterilidad	29
	5. Determinación de niveles de 2,3-difosfoglicerato	29
	E. Transfusión autóloga	29
IV.	JUSTIFICACIÓN	31

V.	OBJETIVOS	33
VI.	HIPÓTESIS	34
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	35
VIII.	RESULTADOS	43
IX.	DISCUSIÓN	51
X.	CONCLUSIONES	58
XI.	RECOMENDACIONES	59
XII.	REFERENCIAS	60
XIII.	ANEXOS	64

II. RESUMEN

La criopreservación es el método utilizado para conservar células o tejidos a temperaturas muy bajas, deteniendo todas las reacciones químicas presentes para que no continúe el proceso de degradación celular. Existen variaciones en el procedimiento principalmente en la velocidad de congelación, temperatura final y el crioprotector a utilizar. El método de Meryman y Hornblower utiliza una concentración alta de glicerol y una congelación lenta para luego realizar lavados con soluciones salinas hiperconcentradas; por otro lado, se encuentra el método de Rowe y Krijnen *et. al.* método que utiliza una baja concentración de glicerol y una congelación rápida utilizando nitrógeno líquido. Con respecto a los crioprotectores a utilizar se encuentran desde aquellos que penetran las células tales como el dimetilsulfóxido (DMSO) y el glicerol, hasta los que no penetran las células como el hidroxietil de almidón (HES).

El presente estudio utilizó la criopreservación para conseguir la prolongación del tiempo de conservación de eritrocitos principalmente de fenotipos de baja frecuencia en Guatemala, teniendo como objetivo la evaluación del comportamiento y los posibles cambios en base a la viabilidad, fragilidad osmótica, antigenicidad, morfología, inocuidad y esterilidad de los eritrocitos criopreservados para lograr el establecimiento del protocolo para la congelación, descongelación y el control de la calidad. Con esto, conseguir que el banco de sangre no sea desabastecido de eritrocitos de fenotipos de baja frecuencia y ayudar a personas que necesiten de una transfusión urgente o aquellas que desarrollan anticuerpos contra varios antígenos eritrocitarios presentando alto riesgo de reacciones post-transfusionales y cuya mejor opción es una transfusión autóloga. De esta manera, las unidades sanguíneas serían aprovechadas en su totalidad sin riesgo al descarte por vencimiento.

Para ello, se utilizó el método de Meryman y Hornblower para la criopreservación de 20 paquetes globulares de distintos fenotipos, principalmente de fenotipos poco frecuentes como Rh negativo. Estos se congelaron en bolsas criogénicas iniciales y finales, como también alícuotas por duplicado en crioviales las cuales fueron evaluadas cada 30

días. Posterior a la descongelación y lavado para la remoción del glicerol de las muestras, se obtuvo una marcada disminución en la viabilidad y fragilidad osmótica, aumento en el tamaño celular, disminución en la hemoglobina, pérdida de antígenos eritrocitarios y la alteración en la morfología celular en todas las muestras. Por otro lado, la inocuidad y esterilidad se mantuvo intacta.

Estos resultados probablemente se deben a que las condiciones no fueron las ideales para este procedimiento, entre ellas no se utilizó un congelador automático que controlara la disminución de la temperatura, no se utilizaron sustancias nutritivas que aumentaran la fuerza de la membrana eritrocitaria y de esta forma evitar la pérdida de enzimas valiosas para la conservación del metabolismo y viabilidad. La morfología celular se alteró probablemente por la disminución de ATP en el eritrocito. Y por último, el lavado fue realizado en forma manual y no con un equipo especializado que estandariza la presión con la cual se moviliza la muestra, lo cual aumentó la lisis mecánica ya que los eritrocitos poseían previamente una membrana frágil.

Por ello se concluye que los protocolos de congelación y descongelación utilizados en este estudio no son aprobados para su realización y se recomienda readecuar las condiciones para evitar el debilitamiento de la membrana plasmática eritrocitaria durante el procedimiento y así lograr una mayor recuperación de células viables. Por otra parte, se considera que el protocolo de control de calidad diseñado es adecuado para su utilización ya que permite abarcar los puntos críticos para identificar contaminación y alteraciones en los eritrocitos durante el procedimiento.

III. INTRODUCCIÓN

La criopreservación es un procedimiento que ha sido estudiado por más de 50 años en todo el mundo, es utilizado generalmente para preservar muestras tales como médula ósea, espermatozoides, células madre pluripotenciales de cordón umbilical, tejidos, entre otros; sin embargo no ha sido utilizada ampliamente para la preservación de eritrocitos debido a que es una técnica costosa. En Guatemala se utiliza la criopreservación para el almacenamiento principalmente de células madre pluripotenciales de cordón umbilical, células fertilizadas o embriones humanos y espermatozoides.

La viabilidad de las células y su funcionabilidad no se alteran mientras que la muestra se encuentre almacenada a baja temperatura (menor a -130°C), el mayor riesgo de perder estas características se encuentra en el proceso de congelación debido a la formación de hielo y en el proceso de descongelación debido al cambio osmótico producido en los espacios extracelular e intracelular.

La adición de un crioprotector ayuda a disminuir las alteraciones o daño físico en la membrana plasmática de las células así como al equilibrio osmótico; sin embargo, los crioprotectores principalmente los que penetran en las células son tóxicos tanto para el paciente que recibe la transfusión como para las mismas células, por lo cual es necesario realizar un lavado o dilución del crioprotector para evitar daño celular o reacciones post transfusionales.

En Guatemala, la preservación de eritrocitos generalmente se realiza a 4°C utilizando el anticoagulante CPDA-1 obteniéndose un límite de sobrevida de 35 días, sin embargo al adicionar ciertas soluciones por ejemplo utilizando CPDA-1 SAGMAN esta sobrevida se alarga a 42 días como máximo. En algunas ocasiones es necesario preservar los eritrocitos por más de 42 días como ocurre principalmente con unidades sanguíneas de fenotipos de baja frecuencia, pero debido a que no se utiliza este procedimiento, al cumplir la unidad su tiempo de vida ésta debe descartarse y con esto la oportunidad de que otro receptor pueda utilizar esta unidad.

La criopreservación de eritrocitos permite el almacenamiento hasta por 10 años, sin embargo este procedimiento no ha sido estandarizado, por lo cual este estudio pretende estandarizar el procedimiento de criopreservación de eritrocitos y las técnicas de control de calidad de los productos obtenidos. Lo anterior, se realizará verificando varias características a 20 muestras, entre las cuales se encuentran la viabilidad celular, la fragilidad osmótica por medio de curva de hemólisis, presencia de antígenos eritrocitarios de la categoría mayor ABO y Rh (D, C, E, c y e) y de la categoría menor sistema P (P1), Lewis (Lea y Leb), Lutheran (Lua y Lub), Kell (k, Kpa y Kpb), Kidd (Jka y Jkb), MNS (M, N, S y s) y Duffy (Fya y Fyb), verificación de morfología celular y hematología cada 30 días por cuatro meses. También se realizarán hemocultivos al inicio y al final del período de estudio para verificar la esterilidad e inocuidad de la muestra.

Con esto se logrará preservar los eritrocitos con mayor tiempo de vida, lo cual beneficiará principalmente a los pacientes con fenotipos de baja frecuencia, al correcto abastecimiento de los bancos de sangre y en general a toda la población guatemalteca.

IV. ANTECEDENTES

A. Preservación sanguínea

La preservación de la sangre y sus derivados puede realizarse por dos métodos, la fase líquida comúnmente utilizada y la criopreservación. Antes de la Segunda Guerra Mundial la sangre se conservaba en citrato de sodio y dextrosa y los glóbulos rojos permanecían viables únicamente durante una semana debido a la falta de purinas y de energía. El primero de los anticoagulantes efectivos fue el ácido-citrato-dextrosa (ACD), descrito en 1943 que contenía glucosa como fuente energética y permitía el almacenamiento durante 21 días (1).

Luego se utilizó el citrato-fosfato-dextrosa (CPD) descrito por Gibson y cols que es el ACD con el agregado fosfato diácido de sodio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), sin embargo en la actualidad se le añadió adenina y ascorbato formando CPDA-1 el cual permite almacenar los eritrocitos durante 35 días. Algunas soluciones aditivas que prolongan el almacenamiento a 42 días son AS-1 (Adsol), AS-3 (Nutricel), AS-5 (Optisol) y SAGMAN (manitol sal) (1,2).

B. Criobiología

La criobiología (del griego cryo= frío, bios= vida y logos= ciencia) es la rama de la biología que estudia a los organismos, órganos, tejidos o células a bajas temperaturas y pretende entender como la baja temperatura prolonga o detiene el tiempo biológico de los sistemas celulares. El tiempo biológico es consecuencia de una serie de reacciones químicas que degradan a la célula (1,3).

Las áreas principales de la criobiología son seis: a) el estudio de la adaptación de los microorganismos, plantas, invertebrados y animales a temperaturas bajas, b) criopreservación de células, tejidos, gametos y embriones de origen animal y humano para propósitos médicos a largo plazo, c) preservación de órganos bajo condiciones hipotérmicas para trasplantes, d) liofilización, e) criocirugía que es un procedimiento poco invasivo para

la destrucción de tejido anormal utilizando gases o fluidos criogénicos y f) física de súper congelamiento, aspectos de la transferencia de calor durante la congelación y el descongelamiento (3).

1. Criopreservación celular

Procedimiento donde las células o tejidos son preservados a temperaturas bajo cero (-80 a -196°C) utilizando nitrógeno líquido cuyo punto de ebullición es a -196°C o bien 77.35 K. La condición natural del nitrógeno es el estado gaseoso ya que constituye aproximadamente el 78% de la composición de la atmósfera. Bajo ciertas condiciones el nitrógeno permite congelar en dos fases, en fase gaseosa congela entre -140°C a -180°C y solo en fase líquida donde la muestra se encuentra sumergida congela a -196°C. En 1949 Christopher Polge, Smith y Parkes criopreservaron por primera vez espermatozoides utilizando nitrógeno líquido y glicerol que es un agente crioprotector que ayuda a prevenir el daño causado por la congelación (3-6).

1.1 Congelación

1.1.1 Velocidad de congelación

Debido a que las células están compuestas principalmente por agua y ésta es necesaria para que ocurran las reacciones químicas, el metabolismo celular se detiene cuando el agua se convierte a hielo durante la congelación. El hielo se forma a diferentes rangos de temperatura, durante un congelamiento lento el hielo se empieza a formar primero en el exterior de la célula y luego dentro de ésta. Cuando se forma el hielo, el agua es removida del espacio extracelular y ocurre un desbalance osmótico a través de la membrana celular haciendo que el agua migre hacia fuera de la célula. Este proceso hace que se aumente la concentración de solutos extracelulares como también puede causar daño intracelular al deshidratarla por completo (7).

La congelación rápida minimiza los efectos de concentración de solutos formando hielo uniformemente, sin embargo crea mayor hielo intracelular el cual durante la

descongelación al hidratarse las células de nuevo pueden destruirse por contener demasiada agua intracelular (7).

Lovelock demostró que el tiempo en que las muestras pasan entre -3°C y -40°C es un factor crítico para que ocurra daño celular. Indicó que mantener las muestras a -45°C por 30 minutos no causa más daño que el ocurrido a -180°C , sin embargo mantener las muestras por lo menos un minuto a -39°C permite la destrucción total de las células. El daño empieza a los -3°C (aproximadamente 1%) y se completa a -10°C (8).

1.1.2 Equilibrio crioprotector-solución celular

Como se describió anteriormente, la velocidad en que se congelan las células es de vital importancia para obtener células viables. También es importante que antes de proceder a la disminución de la temperatura, se adicione un crioprotector celular de manera progresiva con el objetivo de permitir que la concentración de éste se equilibre entre el exterior y el interior celular (Fig 1.I). Según Simione *et al* este período de equilibrio entre el crioprotector y la solución puede variar pero generalmente es aproximadamente de 15 minutos, este tiempo no debe exceder de 45-60 minutos ya que el crioprotector puede ser tóxico para las células si el tiempo de estabilización es muy largo. También es importante que la adición del crioprotector se realice a temperatura ambiente si es glicerol (concentración final entre 5-20 % v/v) y a 4°C si es dimetilsulfóxido-DMSO (concentración final de 5-15 % v/v) lo que permite que el crioprotector penetre a las células. Una estabilización entre crioprotector y solución celular óptima se determina empíricamente dependiendo de las células y el tipo de crioprotector (5, 7, 9-11).

1.1.3 Disminución de la temperatura

La solución de células se almacenan en un congelador biológico y se enfría la mezcla paulatinamente. Durante el proceso de enfriamiento, entre los 4°C y los -10°C , las células se someten a temperaturas menores que las de congelación de la solución que la circunda, pero tanto las células como el líquido extracelular se mantienen sin congelar

(sobreenfriados) (Fig 1.II). Este es un estado metaestable donde la aparición de cristales de hielo entre los -10°C y los -20°C depende de la probabilidad de formación de centros de nucleación. Estos cristales crecen a medida que la temperatura disminuye en forma de frentes de congelación, esto aumenta su viscosidad cuando las células se sitúan en canales de solución líquida y cuando el agua pasa a formar parte de la fracción congelada (7, 9, 12).

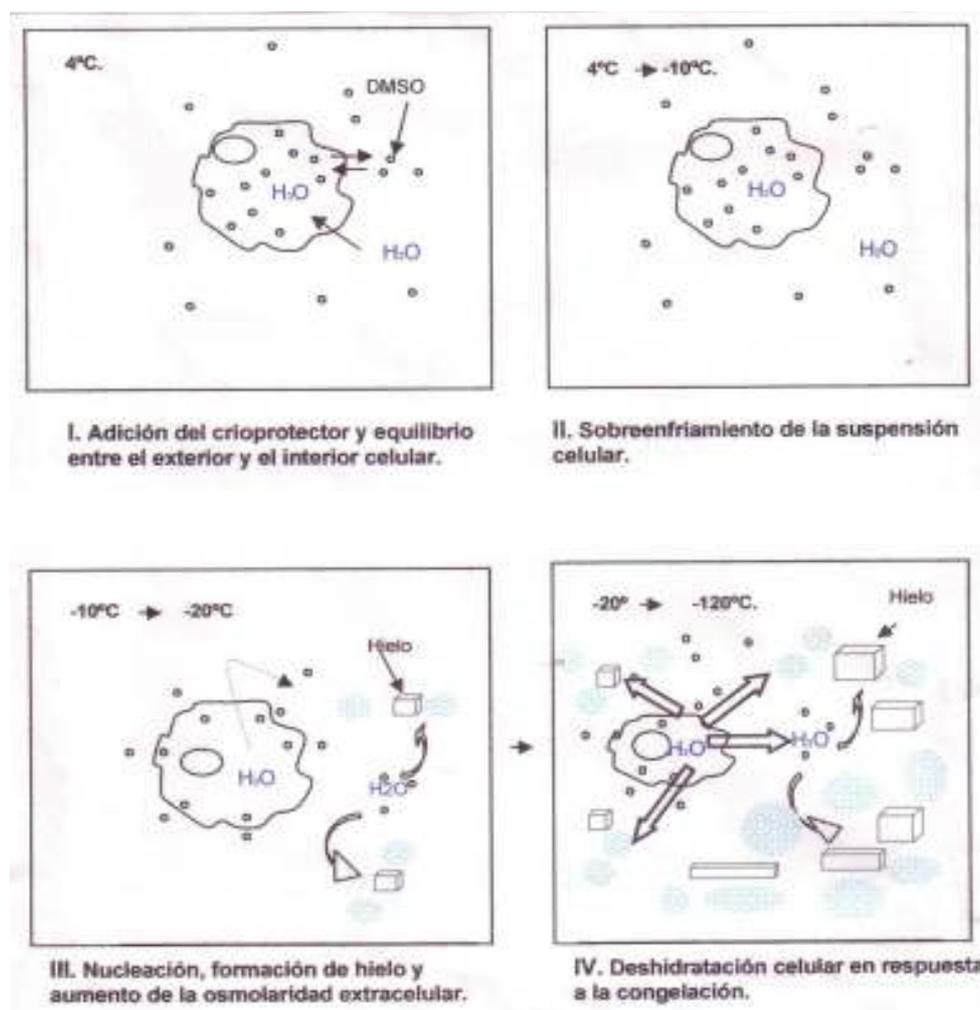


Figura 1. Representación esquemática de la respuesta celular a la congelación.

Tomado de: Rodríguez L. Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO. España: Universidad Autónoma de Barcelona, (tesis de doctorado, Facultad de Medicina) 2005; 22-33 p.

El hielo se forma preferentemente en la solución extracelular y al producirse la cristalización, las moléculas de agua se incorporan al hielo mientras que los solutos quedan excluidos de la fase sólida. De esta manera el espacio extracelular que se va concentrando progresivamente (hipertónico) a la vez que el potencial químico del agua en el espacio extracelular decrece (Fig 1.III). Este cambio de potencial perturba el equilibrio termodinámico entre los espacios intra y extracelular y produce una salida de agua de la célula que intenta revertir el desequilibrio. En consecuencia, la célula se deshidrata progresivamente a medida que el espacio extracelular se va concentrando y al mismo tiempo que el agua que exporta la célula se congela en el exterior (Fig 1.IV) (7, 9).

1.1.4 Clasificación del congelamiento

El congelamiento se puede clasificar de tres maneras: a) congelamiento no controlado, donde se colocan los viales a -60°C o -80°C por 90 minutos y luego se procede a disminuir la temperatura, b) congelamiento semi controlado donde se utiliza un contenedor que congela a -70°C y c) congelamiento controlado aquel que utiliza un congelador biológico programable que disminuye la temperatura 1°C por minuto hasta -40°C y luego 10°C por minuto hasta -80°C . En estos congeladores la transmisión de temperatura entre la cámara interior y las muestras a criopreservar se maximiza mediante el uso de placas metálicas que cubren las muestras dentro del congelador. Las curvas programadas se componen de segmentos cada uno de los cuales tiene una velocidad de enfriamiento ($^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) determinada empíricamente para obtener una máxima viabilidad tras el proceso de congelación. Una vez alcanzada la temperatura de -120°C se retira la suspensión celular del congelador biológico y se almacena en la fase líquida de un tanque de nitrógeno líquido (-196°C) (7, 9, 13, 14).

Un estudio realizado por Stiff *et al* mostró que se obtienen buenos resultados en la criopreservación de células de médula ósea utilizando un protocolo de congelación no controlado. Luego de la adición del crioprotector utilizado el DMSO, las muestras fueron almacenadas por 14 días en un congelador a -80°C . Después de descongelar las muestras a

37°C se obtuvo una recuperación mayor a 80% utilizando la tinción de azul de tripán para determinar la viabilidad celular (15).

1.2 Crioprotectores

Son sustancias muy hidrosolubles y de baja citotoxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución determinada (temperatura mínima a la que una solución se encuentra en estado líquido) mejoran la viabilidad celular alterando el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas en las cuales tiene lugar la criopreservación y ayudan a proteger las células del daño causado por la formación de hielo intracelular. El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que en el momento en que se induce la nucleación en el espacio extracelular, la célula estará más hidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor en el momento en que el espacio extracelular se congele (3, 9, 12, 16).

1.2.1 Clasificación

Los crioprotectores pueden clasificarse según la permeabilidad a través de la membrana en agentes penetrantes y no penetrantes.

a. Los agentes penetrantes son sustancias de bajo peso molecular, permeables a través de la membrana celular que protegen a la célula de lesiones producidas por congelaciones a velocidad lenta. Los más utilizados son el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol (EG) y 1,2-propanodiol (PROH), metanol, propilenglicol y otros alcoholes. (9, 17)

b. Los agentes no penetrantes son sustancias de alto peso molecular que son efectivas cuando se utilizan velocidades altas de congelación. No son crioprotectores propiamente ya que no penetran la célula sino que ejercen su acción promoviendo la rápida deshidratación celular. Suelen usarse asociados a los agentes penetrantes y son utilizados ya que recubren a la célula haciendo que los cristales de hielo no la penetren. Los más utilizados son el almidón hidroxietil (HES, hydroxyethyl starch), la polivinilpirrolidona (PVP) y el polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico, hialuronidato de sodio y otros

polímeros. Este grupo se subdivide en aquellos crioprotectores que son no penetrantes pero que son de bajo peso molecular tales como la glucosa, sucrosa, trehalosa y otros azúcares. Según Saito *et al.* los azúcares ocasionan contracción celular ayudando a la deshidratación y logrando menor formación de hielo intracelular (6, 9, 16, 17).

Los crioprotectores pueden añadirse y extraerse paulatinamente, aumentando o disminuyendo gradualmente la concentración del crioprotector en el medio realizando diluciones y lavados con soluciones a distintas concentraciones, lo que reduce el estrés osmótico sobre la célula. También puede añadirse o extraerse en un solo paso, lo que reduce el tiempo de exposición celular al crioprotector. Es importante mencionar que la adición de crioprotectores ejerce estrés osmótico sobre las células porque aumentan la osmolaridad del medio, las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por su presencia y después se hidratan a la vez que el agua vuelve al interior celular junto con el agente crioprotector (permeable). Dependiendo de la permeabilidad del crioprotector y su citotoxicidad, la adición se realiza a 4°C, 37°C o temperatura ambiente (9, 17).

1.2.2 Dimetilsulfóxido (DMSO)

El DMSO puro es un líquido incoloro e inodoro con una densidad de 1.107 g/cm³ y peso molecular de 78.13 g/mol, su fórmula molecular es (CH₃)₂SO. La vida media en el plasma es de 20 horas aunque el DMSO₂ (sulfato de dimetilo) tiene una vida media de 72 horas y es excretado por vía renal. Una pequeña proporción se reduce a sulfuro de dimetilo (DMS) que es excretado a través de la respiración durante 24 horas después de la infusión. Es menos tóxico que los demás miembros de su clase como la dimetilformamida, dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona, entre otros. Su toxicidad se presenta en dos formas; toxicidad celular y toxicidad relacionada con la infusión. Existen estudios controversiales sobre la toxicidad celular, como los realizados por Goldman en 1978 sobre la recolección, criopreservación y subsecuente viabilidad de células hematopoyéticas y Rowley en 1993 sobre el efecto de la exposición al dimetilsulfóxido en la criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas indican que no causa daño celular. Sin embargo,

estudios realizados por Douay en 1982 sobre la criopreservación de células de médula ósea en la fase gaseosa del nitrógeno líquido indican que sí existe causa daño celular. La toxicidad relacionada con la infusión presenta síntomas desde mareos hasta fallo renal agudo y paro cardíaco, aunque las complicaciones más frecuentes son náuseas, vómito, dolor abdominal y escalofríos (3, 9, 18-20).

Alessandrino *et al.* reporta que la incidencia de la hipertensión en un estudio con 75 pacientes con trasplante de progenitores hematopoyéticos fue del 36%, también se han reportado complicaciones neurológicas, episodios de amnesia global transitoria e isquemias cerebrovasculares severas. Sin embargo la aparición de estas complicaciones puede estar influenciada por otros factores como la infusión de restos celulares y citoquinas provenientes de las células muertas o dañadas. Además, la pre-medicación antihistamínica para prevenir la liberación de histamina inducida por el DMSO podría causar por sí misma bradicardia, por lo que las complicaciones observadas durante la infusión puede ser multifactorial (9, 21).

Es importante mencionar que para su utilización se debe esterilizar por filtración utilizando una jeringa con filtro de 0.2 micras la cual ha sido previamente lavada con alcohol y enjuagada en DMSO (7).

1.2.3 Glicerol

También conocido como propanotriol o glicerina, es un compuesto químico líquido inodoro, incoloro y viscoso cuya fórmula molecular es $C_3H_8O_3$. Su densidad es de 1.261 g/cm^3 , su punto de fusión es 291 K y su punto de ebullición es 563 K. Entre los principales usos se encuentra la elaboración de cosméticos, medicamentos, explosivos, resinas alquídicas, como anticongelante, entre otras. Para su utilización debe autoclavarse por 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión y se debe almacenar en un lugar oscuro (3, 7).

El glicerol ingresa a la célula protegiéndola en virtud de sus propiedades coligantes o fijadoras de agua haciendo que la cantidad de hielo formado sea menor y el nivel de

solutos se reduzca, o sea que reduce la formación de hielo y reduce el punto de congelación (2). Con respecto a la toxicidad del glicerol, se indica que éste es menos tóxico que el DMSO, sin embargo también causa daño celular por lo cual debe ser removido lo más rápido posible y es este proceso de remoción de glicerol el que debe efectuarse correctamente, realizando una serie de diluciones para removerlo por completo y así no causar daño celular o por infusión. Un estudio realizado por Sandoval *et al* indicó que el uso de glicerol, como crioprotector, en la congelación de semen ovino muestra mejores resultados que el etilenglicol, en relación a la motilidad progresiva de los espermatozoides post descongelamiento. Esto se atribuye a que los espermatozoides presentan mayor susceptibilidad a concentraciones altas de etilenglicol, por lo tanto el glicerol proporcionó mayor protección siendo menos tóxico que el etilenglicol (2, 22).

1.3 Descongelación

Durante este proceso ocurren los cambios osmóticos inversos a la congelación. El agua congelada cambia de estado sólido a líquido por lo cual la concentración de solutos en el medio extracelular se reduce progresivamente y la célula vuelve a hidratarse, para compensar esta diferencia de concentraciones entre el exterior y el interior celular (Fig 2).

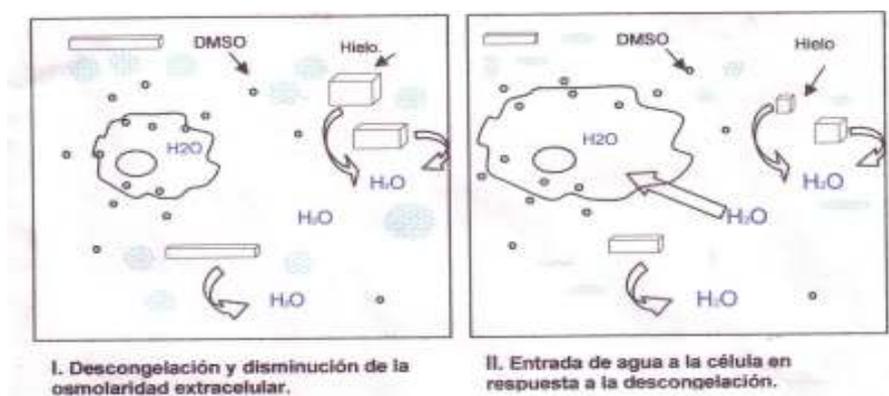


Figura 2. Representación esquemática de la respuesta celular a la descongelación.

Tomado de: Rodríguez L. Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO. España: Universidad Autónoma de Barcelona, (tesis de doctorado, Facultad de Medicina) 2005; 22-33 p.

La toxicidad del crioprotector y las condiciones de osmolaridad intracelular elevada determinarán la supervivencia celular dependiendo del tiempo de exposición a estas condiciones y de la temperatura. Para evitar una disminución de la viabilidad celular post descongelación por causas relacionadas con la presencia del crioprotector se ha propuesto el lavado y/o dilución del crioprotector. Estos procesos implican la dilución del descongelado y por tanto un cambio brusco de la osmolaridad (reducción de la concentración) a la que la célula responderá hidratándose (Fig 3). Los límites mecánicos de la membrana plasmática determinarán durante este proceso la supervivencia celular medida mediante ensayos de integridad de membrana (9).

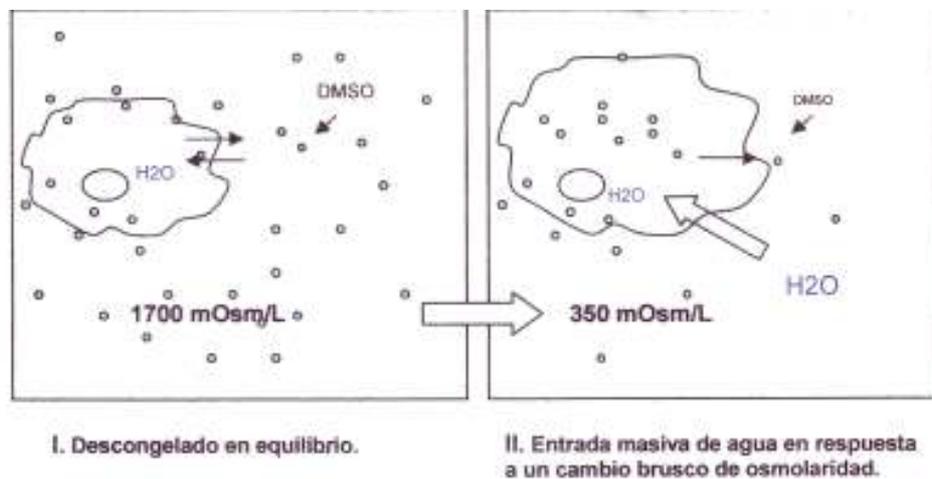


Figura 3. Respuesta celular a un cambio brusco de osmolaridad.

Tomado de: Rodríguez L. Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO. España: Universidad Autónoma de Barcelona, (tesis de doctorado, Facultad de Medicina) 2005; 22-33 p.

Para la mayoría de las células, el descongelamiento debe ser lo más rápido posible, colocando las células en un baño con agua a 37°C, es importante mencionar que el congelado en material plástico requiere mayor tiempo en descongelarse que el congelado en material de vidrio. Este proceso de descongelación rápido (>100°C/min) evita la recristalización del agua, asociación de pequeños cristales de hielo que al unirse pueden crecer en tiempos muy cortos y dañar las membranas mecánicamente (7, 9, 15).

1.4 Lesiones crioinducidas

Entre estas se encuentran principalmente aquellas producidas por la formación de hielo y las lesiones relacionadas con la deshidratación celular o estrés osmótico que ocurren en los procesos de congelación y descongelación.

1.4.1 Formación de hielo

En una solución sobreenfriada la formación de hielo depende de la probabilidad de formación de puntos de nucleación, puntos de inicio de formación de cristales de hielo, el cual es inversamente proporcional a la temperatura. A estos puntos las moléculas de agua se van añadiendo formando cristales cada vez de mayor tamaño, los cuales pueden causar lesiones irreversibles como la muerte celular. La nucleación puede ser homogénea (al azar) o heterogénea (mediante inducción externa). Cuando se utilizan congeladores biológicos programables, la nucleación se induce mediante un descenso brusco de temperatura en el interior de la cámara de congelación. Este descenso tiene doble función, iniciar la nucleación y contrarrestar el calor producido por el cambio de estado del agua extracelular evitando fluctuaciones de temperatura sobre las membranas (9).

a. Formación de hielo extracelular

Se forma hielo extracelular entre los -5°C y los -10°C y no se forma hielo intracelular posiblemente debido a la barrera física que impone la membrana celular al proceso de nucleación y al crecimiento de cristales de hielo. Se ha demostrado que la formación de hielo extracelular no es causa de lesión porque las células criopreservadas se mantienen en canales de solución no congeladas mientras crecen los cristales de hielo en la solución extracelular superenfriada. Cuando la temperatura del medio alcanza los -130°C , el agua no existe en estado líquido y los canales donde se encuentran las células se mantienen en estado vítreo con alta viscosidad y sin cristalización (3, 9, 23).

b. Formación de hielo intracelular

Luego de iniciada la nucleación y el crecimiento de cristales extracelularmente, se produce una disminución de la proporción de agua extracelular en estado líquido que provoca una salida neta de agua intracelular para equilibrar el potencial químico del agua a lado y lado de la membrana, en ese momento todo lo que suceda intracelularmente depende de la velocidad de enfriamiento. Si la velocidad de enfriamiento es muy rápida, la célula puede ser incapaz de deshidratarse suficientemente rápido y al llegar a la temperatura de nucleación, el agua remanente se congela formando hielo intracelular, este alcanzará un tamaño mayor o menor dependiendo de la velocidad, mientras más rápido más pequeños serán los cristales (9, 23).

Si por el contrario la velocidad de enfriamiento es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiendo llegar al colapso celular. Con una velocidad adecuada, la célula se deshidratará y concentrará intracelularmente antes de alcanzar la temperatura de nucleación, de forma que la posibilidad de hielo intracelular y daño celular se disminuirá (9, 23).

1.4.2 Estrés osmótico

Existen dos teorías para explicar el fenómeno de estrés osmótico durante la criopreservación. Primero Lovelock mediante estudios empíricos demostró que la concentración de solutos extracelulares produce un efecto deletéreo en las células basándose en que la hemólisis de eritrocitos durante la congelación empieza a ser evidente a partir de una concentración de solutos determinada (0.8M NaCl, 1600 mOsm/L). La adición de un crioprotector como el glicerol reduce la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada y por tanto reduce la concentración de solutos en ese punto de congelación. No obstante, independiente de la temperatura se produce al descongelar una masiva lisis celular a partir de una concentración de 0.8M de NaCl. Los mecanismos propuestos son las interacciones del soluto iónico con las proteínas que producirían la desnaturalización de proteínas de membrana o facilitarían la formación de puentes

disulfuros entre aminoácidos. Los resultados se comprobaron cuando se utilizó glucosa como agente osmótico, por tanto el hecho de que la lisis celular se produzca independientemente de la concentración de soluto o su naturaleza, apoya el hecho que no es la concentración de soluto en sí lo que daña las células sino la deshidratación celular que se produce. En conclusión, es la gran concentración salina que se alcanza durante la congelación la que altera la permeabilidad de la membrana aumentando el influjo de iones al interior celular, causando un efecto dañino (8, 9).

Y segundo, Meryman propone la hipótesis del volumen celular mínimo que relaciona el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos y la muerte celular con el regreso de las condiciones isotónicas después de la descongelación. Esta hipótesis se basa en que el volumen celular se reduce a medida que aumenta la osmolaridad extracelular (formación de hielo) y a medida que la célula pierde volumen la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen (pérdida de agua); en consecuencia, la progresiva incapacidad de la célula a responder a los cambios osmóticos externos produce una presión hidrostática a través de la membrana plasmática que llegado a un punto de volumen celular mínimo excederá la resistencia física de la membrana y producirá daño en la permeabilidad. Los crioprotectores permeables actuarían reduciendo la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada como también la concentración de soluto durante la congelación y la deshidratación celular (9, 24).

1.5 Lavado celular

Cuando se procede a la técnica de descongelado, es importante someter el material criopreservado a un lavado minucioso con medios nutritivos a concentraciones decrecientes del criopreservante, para su total eliminación evitando de esta forma que sus efectos tóxicos dañen las células. Se pueden utilizar técnicas de centrifugación y dilución del crioprotector. Un estudio de criopreservación de embriones mamíferos realizado por Cabrera *et al* utilizó sucrosa como diluyente del crioprotector mediante dos métodos, la dilución dentro de una pajuela con sucrosa al 0.2M calentada a 39°C y dilución fuera de

una pajuela con sucrosa al 0.1M y 0.2M, obteniendo mejores resultados con el método que utilizó sucrosa calentada a 39°C (6, 9, 16).

Una forma de realizar el lavado de eritrocitos es mediante la utilización de una solución con 16 g de sorbitol o manitol, 0.9 g de cloruro de sodio y 100 ml de agua destilada csp. Donde la muestra debe ser centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos, luego se añade lentamente dos volúmenes de sorbitol y se realiza de nuevo la centrifugación, por último se lavan los eritrocitos tres veces con suero fisiológico tamponado, realizando la incorporación de la solución para el lavado muy lentamente para evitar la hemólisis (25).

Otro método es el que Farrugia *et al* utilizaron para la criopreservación de eritrocitos glicerolizados a -80°C, donde luego del almacenamiento en congelación procedieron al método de descongelación el cual fue a 42°C. Las muestras fueron diluidas con cloruro de sodio al 12% y luego lavadas con 2 litros de cloruro de sodio al 0.9%. Centrifugaron las muestras y descartaron la solución salina sobrante logrando un hematocrito de 80%, luego de 21 días determinaron la hemoglobina y el potasio extracelular, encontrando que la pérdida fue significativamente baja (11, 26).

Otro procedimiento para la remoción de glicerol en glóbulos rojos utiliza tres soluciones a distintas concentraciones de cloruro de sodio, a diferencia del método de Farrugia *et al* que utiliza solamente dos concentraciones. El procedimiento consiste en diluir la muestra en una solución hipertónica de cloruro de sodio al 12% por 15 minutos, en seguida se realiza un lavado 2 litros de solución de cloruro de sodio al 1.6% hasta que se complete la remoción del glicerol y por último, se resuspenden los glóbulos rojos en solución salina isotónica (cloruro de sodio 0.9%) con dextrosa al 0.2% (27, 28).

C. Criopreservación de células rojas

Se refiere a la preservación de eritrocitos a temperaturas menores de -130°C y su objetivo principal es el mantenimiento de la viabilidad y la funcionabilidad de dichas células. La viabilidad se define como la capacidad que posee un eritrocito para circular en el torrente sanguíneo después de 24 horas luego de la reinfusión y la funcionabilidad eritrocitaria está definida como la capacidad de un eritrocito en liberar oxígeno a los tejidos de forma normal. Para mantener estas características es muy importante el papel que realiza una membrana plasmática eritrocitaria intacta. (1, 12, 17, 29).

1. Membrana plasmática

La estructura y composición de las membranas plasmáticas de las células eucariotas son de vital importancia ya que definen la supervivencia de la célula congelada.

Su estructura se encuentra bien organizada según el modelo del mosaico fluido de Singer y Nicholson. Está compuesta por una bicapa de fosfolípidos, proteínas unidas no covalentemente a esa bicapa y glúcidos unidos covalentemente a lípidos o proteínas. Las moléculas más numerosas son los lípidos, aunque las proteínas debido a su mayor tamaño representan aproximadamente el 50% de la masa de la membrana. El 98% de los lípidos son anfipáticos, es decir que poseen un extremo hidrófilo (afin al agua) y uno hidrofílico (repele el agua), los más abundantes son los fosfolípidos y los esfingolípidos, le siguen los glucolípidos, así como los esteroides como el colesterol, éste último representa el 23% de los lípidos de membrana y es un factor importante para la fluidez, permeabilidad y resistencia de la membrana, ya que a mayor cantidad de colesterol menos fluida y permeable es la membrana. En las bicapas, los ácidos grasos de los fosfolípidos se posicionan paralelamente mientras que el colesterol se intercala entre ellos. Este empaquetamiento de las cadenas hidrofóbicas hace que interaccionen entre ellas y se estabilicen por fuerzas de Van der Waals, cuanto más difícil sea este empaquetamiento más fluida será la membrana (1, 9, 30).

La función de la membrana plasmática es como barrera semipermeable permitiendo o no el ingreso de determinadas moléculas. La permeabilidad depende principalmente de factores tales como el tamaño, carga eléctrica y la solubilidad en los lípidos que posea la molécula, por lo cual actúa como barrera permeable selectiva (30).

El cambio de estado físico produce que los ácidos grasos de la membrana cambien su ordenamiento ya que en estado líquido se encuentran en forma desordenada y en estado sólido se encuentran ordenados. La transición se da en un rango de temperaturas denominando a la media como temperatura de transición de fase o Melting Temperature (T_m), ésta temperatura cambia según la composición de los ácidos grasos; sin embargo la mayoría de células eucariotas tienen una T_m entre 0 y 20°C (3, 9).

La transición produce defectos asociados a una mayor permeabilidad de solutos a través de la membrana, por lo que se pierde mayor cantidad de solutos en esta fase. La integridad de membrana puede comprometerse con la pérdida de lípidos de membrana durante la deshidratación celular en el proceso de congelación, la membrana plasmática pierde capacidad de expansión y durante la rehidratación el cambio a condiciones isotónicas pueda dañarla debido al transporte ocurrido (9).

La membrana plasmática puede sufrir daño debido al aumento de la rigidez que ocurre a bajas temperaturas y a la rapidez con la cual se llega a esa temperatura en donde la congelación y descongelación hacen muy difícil el movimiento molecular a través de la membrana. Este movimiento puede ser por transporte activo dependiente de ATP (la disminución de la temperatura de 25°C a 10°C reduce en un 60 % la actividad de las bombas dependientes de ATP), o por difusión facilitada o cotransporte (transporte concomitante de dos moléculas a través de la membrana dependiente una de ellas de ATP y/o iones H^+). Por lo tanto son los procesos de difusión y ósmosis los que predominan durante la congelación y descongelación celular (9).

2. Formas de transporte de agua y de solutos

2.1 Difusión

Es el proceso mediante el cual las moléculas de una sustancia tienden a alcanzar una distribución homogénea en todo el espacio que les es accesible, trasladándose de una región de alta concentración a una de menor concentración. Las moléculas de un soluto están disueltas en un solvente y se mantienen en continuo movimiento al azar. La difusión a través de las membranas está definida por la Ley de difusión de Fick, que relaciona el gradiente entre las dos zonas (gradiente químico o de concentración) y las características de la membrana (grosor, área de sección transversa y permeabilidad para un determinado soluto) (9, 30, 31).

De tal forma, la velocidad del movimiento de un soluto a través de una membrana es directamente proporcional a la superficie de la membrana y a la diferencia de concentración del soluto entre los dos lados e inversamente proporcional al espesor de la membrana. Además la velocidad de la difusión es proporcional a una constante de difusión que depende de las propiedades de la membrana y de los solutos. La difusión solo tiene relevancia cuando las distancias son cortas ya que su efectividad disminuye proporcionalmente al cuadrado de la distancia. La difusión en membranas celulares es vital para el transporte de agua, iones y otros nutrientes (9, 31).

2.2 Ósmosis

Proceso que se define como el movimiento de agua de soluciones de baja concentración de soluto hacia soluciones con alta concentración de soluto, a través de una membrana selectivamente permeable. La presión osmótica es aquella que se ejerce para contrarrestar ese movimiento, por lo tanto la presión osmótica es la presión hidrostática que se genera a través de la membrana semipermeable con un gradiente de concentración de ambos lados (9, 30, 31).

La osmolaridad es la medida de la presión osmótica que ejerce una solución a través de una membrana semipermeable debido a la diferencia de concentración de solutos a lado y lado de la membrana. Esta depende del número de iones en solución pero no de la naturaleza de éstos, es por tanto una propiedad coligativa (9).

Ejemplo: Cálculo de osmolaridad en presencia de DMSO

$$\text{Osmolaridad (Osmoles/L)} = 300 + ((\text{mg/dl DMSO}) / 7.8) \quad \text{ó}$$

$$\text{Osmolaridad (mOsmoles/L)} = 300 + (\text{mmol de DMSO}) \quad \text{donde;}$$

300 : presión osmótica del plasma.

7.8 : peso atómico del DMSO dividido por 10.

Así para una solución al 10% de DMSO, la osmolaridad teórica será la suma de la osmolaridad del plasma más la osmolaridad debida a la presencia del crioprotector. Un 10% v/v de DMSO corresponde a una concentración molar de 1.4 M o 1400mmol/L;

$$\text{Osmolaridad (plasma al 10\% v/v DMSO)} = 1700 \text{ mOsmoles/L (9).}$$

3. Estudios sobre la criopreservación de eritrocitos

La congelación de eritrocitos es un procedimiento que lleva más de 50 años sin embargo no es comúnmente utilizada debido a que es un método costoso y presenta un alto riesgo de contaminación. La congelación se puede realizar a los 5 días de recolectada la muestra o al cabo de su tiempo de almacenamiento. La Administración de Drogas y Alimentos (FDA, Food and Drugs Administration) permite almacenar los eritrocitos congelados con glicerol al 40% p/v a -80°C hasta por 10 años luego de su recolección y requiere que las células descongeladas y desglicerolizadas sean almacenadas a 4°C por un máximo de 24 horas. Estudios recientes indican que después del lavado los eritrocitos se pueden almacenar a 4°C en solución AS-3 Nutricel durante 15 días y utilizando sistemas

cerrados de congelamiento. Los eritrocitos humanos congelados con glicerol al 20% o al 40% tienen tasas de recuperación de al menos 85%, valores de supervivencia postransfusión de 85% después del lavado y almacenamiento a 4°C por 24 horas, función de transporte de oxígeno normal, hemólisis mínima y no hay evidencia de contaminación (2).

Souza *et al* congelaron eritrocitos con *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* en el año 2000, su estudio indicó que la dilución con menor índice de hemólisis fue utilizando glicerol al 20%, el proceso de congelación fue mantener los tubos de criopreservación por 15 minutos a temperatura ambiente, después por más de 30 minutos a 4°C y 15 horas a temperatura de -20°C y por último colocados en nitrógeno líquido por seis meses (32).

4. Cambios físicos de los eritrocitos después de criopreservación

4.1 Aparición de formas anómalas

Un eritrocito sufre importantes modificaciones, pasa de ser un discocito a un equinocito o esferoequinocito. Esto ocurre cuando el ATP intracelular se agota, el contenido del calcio se eleva y se exponen las células a pH elevado. La restauración del ATP revierte el proceso. Por otra parte, la transformación de discocitos a estomatocitos se produce por disminución del pH, exposición a agentes químicos, como detergentes catiónicos y aniones no penetrantes. Se ha establecido que un discocito normal representa una forma óptima para la circulación *in vitro*, ya que los estomatocitos podrían alterar el paso a través de la microcirculación por disminución de la filtrabilidad celular y la transformación a equinocito podría alterar el flujo en los grandes vasos por aumento de la viscosidad sanguínea (2, 33).

4.2 Formación de células densas

Definidas como células falciformes deshidratadas, rígidas y con una vida media reducida, poseen hemoglobina S. Esta variante de la hemoglobina es resultado de una alteración del gen que codifica a la cadena β de la hemoglobina, este gen está localizado en el cromosoma 11, produciendo anemia drepanocítica o anemia de células falciformes (25).

Las células densas homocigotas SS producen un aumento en la concentración de la hemoglobina corpuscular media (CHCM) contribuyendo a la vasoclusión. Diversas interacciones entre transportadores de cationes median la deshidratación de las células falciformes incluyendo un incremento no selectivo de la permeabilidad a cationes relacionado con alteraciones a nivel de la membrana, un canal de potasio dependiente de calcio y el cotransportador KCl (2).

4.3 Hemólisis

La hemólisis ocurre gradualmente durante el almacenamiento. Generalmente ocurre más rápido cuando las células se encuentran con soluciones aditivas que cuando están en su propio plasma. El manitol ayuda a la prevención de la hemólisis, el anión polivalente 2,3-DPG (difosfoglicerato) actúa en el equilibrio osmótico celular y la caída progresiva del pH afecta el movimiento de iones y lleva al encogimiento celular (2, 33).

4.4 Alteración de la resistencia de la membrana celular

La fragilidad osmótica mide el grado de resistencia de los eritrocitos a la lisis en función de la disminución de la concentración de cloruro de sodio del medio (medio hipotónico). Se aumenta durante el almacenamiento y está relacionado a los cambios de osmolaridad interna que ocurren. El principal factor que contribuye es la acumulación de lactato dentro de los eritrocitos, luego el reemplazo del 2,3-DPG por cloruros, que ejerce aproximadamente 3.7 veces más efecto osmótico. Es importante que los eritrocitos se encuentren suspendidos en solución salina isotónica de tal manera que la fragilidad osmótica sea cercana a la normal, aún después de un tiempo prolongado de almacenamiento. Cuando se suspenden los eritrocitos en solución salina, el lactato provoca el influjo de agua a la célula por efecto osmótico de este soluto, se pueden perder algunos lípidos de membrana representada por una cola frágil en la curva de fragilidad osmótica y parece existir una pequeña correlación entre el tamaño de dicha cola y la viabilidad postransfusional (2, 31).

D. Métodos de evaluación de la calidad de eritrocitos criopreservados

Existen numerosos parámetros que deben ser evaluados dependiendo del producto criopreservado que se estudia. Los principales parámetros para evaluar la calidad de células rojas son la viabilidad, la fragilidad osmótica, verificación del fenotipo, inocuidad y esterilidad, comparación hematológica de índices eritrocitarios, verificación morfológica y determinación de niveles de 2,3-difosfoglicerato (2).

1. Viabilidad celular

Debido a que las células muertas carecen de membrana celular funcional, permiten la difusión pasiva de colorantes vitales, como el azul tripán, desde el exterior hasta su citoplasma. El “estándar de oro” para evaluar la viabilidad celular es el método que utiliza el colorante azul tripán, el cual consiste en realizar una dilución en partes iguales de solución de azul de tripán al 0.5% y la suspensión celular, se deja reposar de 5 a 15 minutos a temperatura ambiente, para luego realizar un conteo de 100 células en cámara de Neubauer. Se determina el porcentaje de células muertas o coloreadas y las células vivas o incoloras (25, 34).

2. Fragilidad osmótica

La membrana eritrocitaria es semipermeable, permite el libre paso de agua pero restringe el de ciertos solutos iónicos (principalmente Cl^- , K^+ , Na^+). Debido a ello, cuando el eritrocito se incuba en un medio hipertónico, pierde agua y se deshidrata; por el contrario, cuando se incuba en un medio hipotónico existe una entrada de agua y con ello una hidratación del eritrocito. Si la hipotonía del medio supera cierto límite, ocurre alteración de la membrana celular, por la cual sobreviene una salida masiva de la hemoglobina hacia el medio o hemólisis. La intensidad de la hemólisis depende del grado de hipotonía del medio, de forma que siempre existe un cierto número de eritrocitos capaces de resistir este efecto osmótico excepto cuando la hipotonía es absoluta (agua destilada), en que la hemólisis es del 100%. La medida de la capacidad de una población

de eritrocitos para resistir el efecto hipotónico del medio se denomina resistencia osmótica eritrocitaria. Esta resistencia depende de la relación existente entre la superficie y el volumen de cada eritrocito. Debido a su forma, el eritrocito puede aceptar agua sin hemolizarse y es capaz de aumentar su volumen hasta 70%. Cuando existe una alteración en la morfología eritrocitaria, este límite disminuye y la hemólisis ocurre en presencia de soluciones salinas con mayor concentración. Se realiza una curva de hemólisis utilizando diluciones de cloruro de sodio, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4.5, 4, 3, 2 y 1 g/L. Donde la hemoglobina liberada se evalúa espectrofotométricamente a 540 nm comparando la absorbancia del sobrenadante de las células tratadas con la obtenida por hemólisis del mismo número de células en agua destilada. Considerando como 100% de hemólisis la dilución con 1 g/L y 0% de hemólisis a la solución de 10g/L (25, 29, 35).

3. Antígenos eritrocitarios

Luego de la descongelación de las muestras es de vital importancia verificar la presencia de los antígenos eritrocitarios, para corroborar que estos antígenos no se perdieron por daño en la membrana durante el proceso de criopreservación. Los antígenos eritrocitarios se agrupan en sistemas, siendo la base fundamental que define un sistema su independencia genética. Los sistemas sanguíneos se clasifican en dos categorías, la mayor donde se encuentra el sistema ABO y Rh y la categoría menor donde se encuentra a grupos tales como Lewis, Duffy, Kell, Lutheran, Kidd, MNSs, Diego, entre otros (25, 36).

El sistema ABO descubierto por Landsteiner en 1901, ha permitido realizar con seguridad transfusiones sanguíneas y en la actualidad continúa siendo el sistema más importante en este campo. En general, el antígeno más frecuente es el O, luego el antígeno A, el antígeno B y en menos frecuente es el AB (25, 36-38).

El sistema Rh es el segundo en importancia para la práctica de transfusiones después del sistema ABO. Se han identificado más de 45 antígenos en este sistema, sin embargo cinco son los más frecuentes: D, C, E, c, e. El principal antígeno es el D y el anticuerpo de quienes lo carecen es el anti-D. Si el antígeno D está presente el fenotipo es Rh positivo y

si está ausente el fenotipo es Rh negativo. En todas las regiones del mundo, el fenotipo Rh positivo es el más frecuente (25, 36, 37).

4. Hematología, morfología, inocuidad y esterilidad

El objetivo principal es verificar que las muestras luego de la criopreservación presenten los parámetros morfológicos y hematológicos normales, para ello se realizan frote sanguíneo y hematología completa. Se realizan también hemocultivos para verificar que la muestra no presente contaminación bacteriana.

5. Determinación de niveles de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG)

El 2,3 DPG es un metabolito de la glucólisis, abundante en los eritrocitos que actúa disminuyendo la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, favoreciendo con ello la liberación del oxígeno en los tejidos. Por esta razón, la determinación de 2,3-DPG indica la funcionalidad que poseen los eritrocitos luego de ser criopreservados, sin embargo el procedimiento es complicado y costoso (25, 33, 39).

E. Transfusión autóloga

Se refiere al procedimiento mediante el cual se reinfunde cualquier componente sanguíneo al mismo individuo que voluntariamente lo había donado con anterioridad. La transfusión autóloga presenta beneficios al donador tales como la eliminación de riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas, riesgo de aloinmunización y otros efectos inmunológicos y estimula la eritropoyesis. También presenta beneficios al banco de sangre, tales como la disponibilidad de sangre para pacientes con fenotipos de baja frecuencia o problemas inmunohematológicos y el incremento de reserva global de sangre (40).

La transfusión autóloga incluye tres modalidades principales:

- Transfusión autóloga con predepósito

Es el más empleado y consiste en la donación de una o más unidades de sangre en un período previo a la cirugía, que normalmente no debe exceder a las 5 semanas para evitar la caducidad de la primera unidad extraída. Se debe considerar que el intervalo de dos donaciones debe ser de una semana aproximadamente y la última extracción debe ser 72 horas previas a la cirugía (40).

- Hemodilución preoperatoria (normovolémica o hipervolémica)

Proceso que consiste en la obtención de sangre del paciente inmediatamente antes de la intervención quirúrgica, con el paciente despierto o bien con anestesia. El objetivo es disminuir el hematocrito del paciente reponiendo el volumen con cristaloides o coloides. Entre las ventajas se encuentra que disminuye la viscosidad sanguínea, disminuye complicaciones tromboembólicas, aumenta el flujo coronario; sin embargo puede que exista incremento en el sangrado operatorio (40).

- Recuperación de la sangre intraoperatoria o postoperatoria

Proceso que consiste en la reinfusión de la sangre del paciente, obtenida del mismo campo operatorio o procedente de las pérdidas del postoperatorio. Entre sus ventajas está la reinfusión de sangre recién extraída y que no se separa la unidad del paciente evitando el error de confusión de unidades, no es necesario realizar pruebas serológicas. Sus inconvenientes son la falta de previsión de volumen a recolectar y el costo económico sobre todo en los sistemas de recolección en el campo operatorio (40).

V. JUSTIFICACION

La donación sanguínea voluntaria permite salvar vidas en muchos casos tales como en operaciones quirúrgicas complicadas, accidentes o enfermedades crónicas sin embargo en nuestra cultura su realización no es común y la búsqueda de donadores en ocasiones es muy difícil ya que la sangre necesitada a veces presenta fenotipos de baja frecuencia en nuestra población tales como grupo A Rh negativo, B Rh negativo, AB Rh positivo, AB Rh negativo y O Rh negativo, por lo cual la transfusión sanguínea puede demorar en realizarse o bien no realizarse.

Los anticoagulantes utilizados comúnmente en banco de sangre preservan la sangre hasta 35 días si se utiliza CPDA-1 y 42 días con CPDA-1 SAGMAN. Por diversas razones las unidades sanguíneas a veces no se utilizan dentro de ese período por lo que el esfuerzo realizado por parte de los familiares en la búsqueda de donadores y el trabajo del equipo de salud en el procesamiento y almacenamiento de la sangre se pierde, con el desperdicio de esa unidad de sangre. Debido a esto es muy importante contar con un método que aumente el tiempo de sobrevivencia en las unidades sanguíneas, principalmente en casos donde el fenotipo sanguíneo es de baja frecuencia.

Es importante mencionar que algunas personas desarrollan anticuerpos contra varios antígenos eritrocitarios por lo cual presentan un mayor riesgo a presentar reacciones post-transfusionales, éstas pueden ser leves o bien causar hasta la muerte, por lo cual realizar una transfusión autóloga es la mejor opción para dichos pacientes. La criopreservación permite el almacenamiento de la sangre por mayor tiempo y estos pacientes pueden preservar su propia sangre y en caso de emergencia poder utilizarla evitando así posteriores complicaciones a la transfusión.

En la actualidad, la principal razón por la cual los bancos de sangre descartan las unidades sanguíneas es debido a su vencimiento, estas unidades en ocasiones son de fenotipos muy poco frecuentes. Sin embargo con la criopreservación el tiempo de

almacenamiento se aumenta, logrando disminuir en gran cantidad el descarte de unidades sanguíneas.

Por estas razones, es de gran importancia estandarizar el método de criopreservación de eritrocitos ya que permitirá beneficiar a todas aquellas personas que presentan sangre con fenotipos poco frecuentes y así poder abastecer correctamente al banco de sangre del Hospital General de Accidentes, IGSS. Permitirá también que el banco de sangre pueda proveer de sangre sin riesgo de aloinmunización para pacientes por medio de transfusiones autólogas, logrando que la transfusión sanguínea sea exitosa.

VI. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Criopreservar células rojas principalmente de fenotipo de baja frecuencia en el banco de sangre.

B. Objetivos específicos

1. Diseñar el protocolo para la congelación, descongelación y control de calidad de eritrocitos criopreservados.
2. Evaluar conforme al tiempo, los posibles cambios de los eritrocitos criopreservados con base a su viabilidad, fragilidad osmótica, cambio en la antigenicidad, inocuidad y esterilidad.
3. Determinar por medio de frote sanguíneo si el proceso de criopreservación y posterior descongelación altera la morfología eritrocitaria.

VII. HIPÓTESIS

Es un estudio descriptivo por lo que no se formuló hipótesis.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

1. Universo

Paquetes globulares de todos los tipos recolectados de donadores que asisten al banco de sangre del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social –IGSS- Hospital General de Accidentes.

2. Muestra

Cien paquetes globulares de todos los grupos sanguíneos. Se escogerán principalmente unidades sanguíneas con fenotipos de baja frecuencia, tales como Rh negativo de grupos A, B, AB, O y Rh positivo de grupos B y AB.

B. Recursos

1. Recursos humanos

- Q.B., MSc Vivian Matta (asesora)
- Q.B., EIHS, MBA Paula Castellanos (asesora)
- Personal técnico del banco de sangre
- Br. Anna Lucía Quinto Díaz (investigadora)

2. Recursos Físicos

2.1 Reactivos

- Nitrógeno líquido
- Glicerol al 87%

- Azul de tripán al 0.5%
- Cloruro de sodio en polvo
- Agua destilada csp.
- Solución salina isotónica 0.9%
- Solución de yodo
- Alcohol al 70%
- Colorante Wright
- Paneles de antigenicidad eritrocitaria marca Grifols®
- Frascos para hemocultivo de bacterias aeróbicas de 10 mL

2.2 Equipo

- Tanque de almacenamiento MVE 511 marca Bio-Medical® para nitrógeno con sus bandejas de almacenamiento.
- Centrífuga marca Sorvall RC 3B Plus®
- Campana de flujo laminar
- Interconector estéril marca TERUMO®
- Sellador dieléctrico marca TERUMO®
- Mechero de alcohol
- Autoclave
- Refrigeradora a 4°C
- Congeladores a -20°C y -80°C
- Incubadora LABLINE Instruments®
- Baño de maría con microprocesador marca Scientific® modelo 2032

- Incubadora con sistema computarizado para frascos de hemocultivos
- Termómetro de mercurio de -30°C a 60°C
- Microscopio
- Espectrofotómetro con filtro a 540 nm
- Balanza de bolsas sanguíneas
- Balanza analítica
- Cortador y sellador manual de tubuladura marca TERUMO[®]
- Engargoladora para arandelas de aluminio
- Pipetas automáticas de volumen variable (5-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)

2.3 Materiales

- Bolsas para criopreservación marca OriGen Cryostore[®] CS750n
- Crioviales de polipropileno de 2 mL con tapón de rosca
- Gradilla para crioviales
- Guantes especiales para colocación de bolsas y muestras en tanque criogénico
- Guantes de látex estériles
- Careta de seguridad
- Cámara de Neubauer
- Jeringas de 10 mL, aguja No. 21
- Jeringas de 20 mL, aguja No. 16
- Puntas de pipeta
- Aros de aluminio
- Bolsas marca Ziploc[®] tamaño pequeño y grande

- Papel kraft
- Capilares sin heparina
- Arandelas de aluminio de 2mm
- Marcador punta fina permanente
- Etiquetas autoadheribles
- Bolsas transfer de 300 mL

2.4 Cristalería

- Láminas portaobjetos
- Tubos de ensayo
- Frascos de vidrio de 50 mL
- Probeta de 50 mL
- Balón aforado de 1000 mL

3. Metodología

A. Procedimiento de criopreservación

1. Estandarización del método de criopreservación de eritrocitos.

1.1 Obtención de la muestra

- Se obtuvo bolsas de sangre con CPDA-1 de donadores con el fenotipo deseado cuyas pruebas infecciosas (anexo 1) fueron negativas y a quienes se les realizó hematología.
- Se separó el plasma de los eritrocitos.
- Se almacenaron los paquetes globulares a 4°C y se utilizaron en los primeros 6 días de recolectada la muestra.

1.2 Equilibrio entre el crioprotector y la solución celular

- Se identificó perfectamente las bolsas de criopreservación, con fecha de toma de muestra, fecha de congelación, fenotipo completo y otras anotaciones tales como volumen agregado de glicerol y volumen total.
- Se trasladaron los paquetes globulares a bolsas de criopreservación de forma estéril cuyo volumen de congelado fue de 70 mL.
- Se adicionó lentamente el glicerol al 35.5% a temperatura ambiente por aproximadamente 15 a 20 minutos.
- Se mezcló cada paquete globular junto con el glicerol hasta que se homogenizara por completo. Nota: El glicerol se autoclaveó previamente por 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión.

1.3 Disminución de la temperatura

- Se introdujo cada paquete globular glicerolizado a una refrigeradora a 4°C por 25 minutos.
- Luego se transportó cada paquete globular glicerolizado a un congelador a -20°C y mantuvo por 12 a 15 horas.
- Luego se transportó cada paquete globular glicerolizado a un congelador a -80°C y mantuvo por 6 días.
- Por último, se introdujeron los paquetes globulares al tanque de almacenamiento con nitrógeno líquido.

1.4 Almacenamiento en nitrógeno líquido

- Se procedió a colocar las bolsas congeladas previamente dentro del tanque con nitrógeno en fase gaseosa fría (-140°C a -180°C) de forma ordenada, utilizando equipo de protección y siguiendo las normas para utilizar dicho gas.

2. Descongelación

- Al sacar el paquete globular glicerolizado congelado del tanque de almacenamiento con nitrógeno, se verificó que las etiquetas de identificación se encontraran intactas y claras.
- Se colocó cada paquete globular dentro de una bolsa marca Ziploc[®] la cual fue sellada perfectamente y se introdujeron en un baño con agua a 37°C por aproximadamente 15 minutos.
- Se verificó la descongelación por completo, realizando movimientos para mezclar la muestra.

3. Lavado o dilución del crioprotector

- Se sacó cada bolsa del baño de agua y se centrifugaron por 10 minutos a 1500 rpm, se descartó el sobrenadante.
- Se diluyó cada unidad con solución hipertónica de cloruro de sodio al 12% y se dejó aproximadamente por 15 minutos para que se equilibrara la solución.
- Se lavó con cloruro de sodio al 1.6% hasta que se completara la remoción del glicerol, centrifugando nuevamente por 10 minutos a 1500 rpm y descartando el sobrenadante.
- Se resuspendieron los glóbulos rojos libres de glicerol en solución salina isotónica.

B. Procedimiento de control de calidad del proceso de criopreservación

1. Al 20% de las bolsas obtenidas se les realizó alícuotas, las cuales se utilizaron para controlar diversos aspectos de la muestra durante cuatro meses. Cada 30 días se descongelaron dos alícuotas almacenadas en crioviales de 2 mL, se les evaluó viabilidad celular y fragilidad osmótica. La presencia de antígenos eritrocitarios, verificación morfológica, hematología y hemocultivos para controlar inocuidad y esterilidad se realizaron a las bolsas criogénicas antes de la congelación y después de la descongelación al terminar el período del estudio.

1.1 Viabilidad celular

- Se diluyó en partes iguales la suspensión celular y la solución de azul de tripán al 0.5%.
- Se mezcló y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregó 10 μ L de solución en cámara Neubauer para su observación en objetivo 40x.
- Se realizó un conteo de 100 células, clasificándolas en células muertas (células coloreadas) y células vivas (células incoloras), valorando el porcentaje de células muertas.

1.2 Fragilidad osmótica

- Se realizaron las siguientes diluciones utilizando 50 μ l de sangre con 5ml de solución de cloruro de sodio a diferentes concentraciones, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4.5, 4, 3, 2 y 1 g/L. Las diluciones se realizaron por duplicado.
- Se mezcló por inversión lentamente y se centrifugó a 2500 rpm por 15 minutos.
- Se realizaron lecturas de los sobrenadantes a 540nm en un espectrofotómetro. Nota: La solución de 10g/L es utilizada como blanco.
- Se convirtieron los resultados de absorbancia en porcentaje de hemólisis utilizando la siguiente fórmula: $\text{Porcentaje de hemólisis (\% H)} = (\text{DO}_s - \text{DO}_{bl}) \times 100 / \text{DO}_o$.
Donde: DO_s = densidad óptica del sobrenadante, DO_{bl} = densidad óptica del blanco y DO_o = densidad óptica de la solución de 1 g/L de NaCl.
- Se graficó una curva donde se muestra el porcentaje de hemólisis en función de la concentración de cloruro de sodio y se obtuvo el valor de la concentración de cloruro de sodio que produce el 50% de hemólisis.

1.3 Presencia de antígenos eritrocitarios

- Se colocó cada muestra en los paneles de antigenicidad que incluyen a los sistemas ABO, Rh, P, Lewis, Kell, Duffy, Kidd, Lutheran y MNS.
- Se determinó la presencia o ausencia de cada antígeno eritrocitario comparándolo con la muestra antes de criopreservarla.

1.4 Verificación morfológica y hematología

- Se realizó un frote sanguíneo a cada muestra y se determinó la morfología de los eritrocitos, haciendo énfasis en la presencia de alguna o varias formas anómalas eritrocitarias predominantes.
- Se realizó una hematología completa a cada muestra después de la adición del glicerol y otra después de la descongelación y lavado celular para determinar los volúmenes eritrocitarios y compararlos con la hematología inicial del donador.

1.5 Inocuidad y esterilidad

- Se realizaron hemocultivos al inicio y al final del período de estudio a cada muestra.
- Se desinfectó adecuadamente con solución de yodo y alcohol el tapón del frasco para hemocultivo, previamente identificado.
- Se inoculó la muestra con una jeringa de 5 mL en el frasco para hemocultivo.
- Se colocó el frasco en la incubadora con sistema computarizado por 5 días, la cual detecta el cambio de color en el fondo del frasco.
- Se verificaron diariamente la positividad de hemocultivos.

C. Diseño de la investigación

El banco de sangre del Hospital General de Accidentes del IGSS recibe aproximadamente 40 donadores diariamente, por lo cual se realizó un estudio experimental para la conservación por criomacemamiento de paquetes globulares en un período de 4 meses. Este estudio presenta un diseño de bloques con medidas repetidas a dos réplicas, donde se utilizó una muestra de 20 paquetes globulares tomado a conveniencia y sometido al procedimiento de análisis. Se realizaron alícuotas por duplicado que permitieron analizar los cambios durante el período establecido del estudio. El análisis estadístico de las variables cualitativas (antigenicidad, morfología, hematología, inocuidad y esterilidad) fue presentado de forma descriptiva y las variables cuantitativas (viabilidad y fragilidad osmótica) utilizaron un análisis de varianza para medidas repetidas.

IX. RESULTADOS

Previo al estudio se realizaron las pruebas para determinar el porcentaje de glicerol en que se obtiene la menor cantidad de hemólisis, encontrándose que la concentración que presentó un menor porcentaje de hemólisis fue de 35.5%.

Tabla 1. Determinación de la concentración de glicerol y porcentaje de viabilidad.

Concentración de glicerol		% viabilidad
Inicial	Final	
40.5	20.25	38
40	20	39
35.5	17.75	41
30	15	38

Fuente: Datos experimentales.

Se congelaron 20 muestras con alícuotas por duplicado en crioviales durante un período de estudio de cuatro meses. Se realizaron pruebas para el control de la calidad de los productos descongelados, observando porcentaje de viabilidad celular, porcentaje de hemólisis, morfología, hematología, presencia de antígenos eritrocitarios, inocuidad y esterilidad.

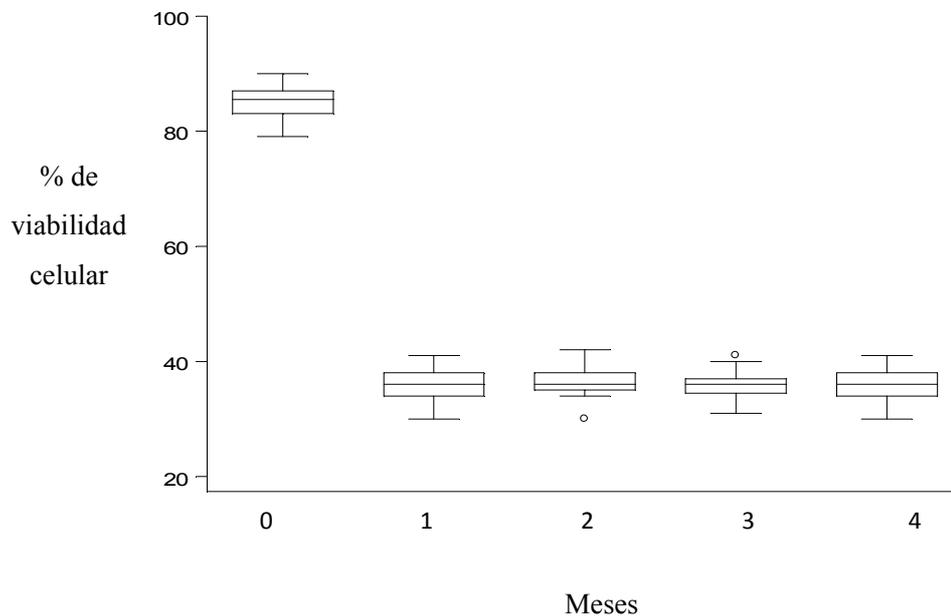
Los resultados de viabilidad celular y fragilidad osmótica (anexo 2) fueron analizados con el paquete estadístico ANOVA, realizando un análisis de varianza, con lo cual se obtuvo las tablas 2 y 4 y las gráficas 1 y 3. La tabla 2 y gráfica 1 muestran los porcentajes de viabilidad celular, en donde se observa que el mes donde se encuentra una diferencia significativa ($p < 0.00001$) es el mes 0, ya que la viabilidad celular disminuye drásticamente luego del lavado realizado al mes de iniciada la congelación (mes 1), posteriormente ésta se mantiene constante durante el resto del estudio.

Tabla 2. Promedio del porcentaje de viabilidad celular de muestras criocongeladas de eritrocitos, durante el período de estudio.

Mes	Promedio (% viabilidad)	Desviación estándar
0	84.9	3.05
1	35.95	2.83
2	36.3	2.34
3	35.85	2.37
4	36.08	2.66

Fuente: Datos experimentales.

Gráfica 1. Porcentaje de viabilidad celular por mes de estudio.



Fuente: Datos experimentales.

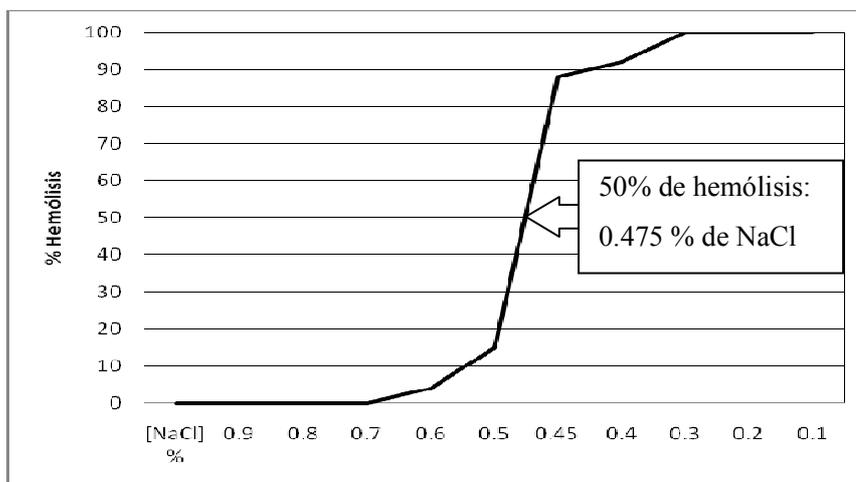
La tabla 3 muestra el promedio de las curvas de hemólisis iniciales de las muestras con respecto al porcentaje de la concentración cloruro de sodio y el porcentaje de hemólisis. En la gráfica 2 se observa que el 50% de hemólisis corresponde a una concentración de 0.475% de cloruro de sodio.

Tabla 3. Porcentaje de hemólisis con respecto a la concentración de cloruro de sodio, 540nm.

[NaCl] %	Abs	% H
0.9	0	0
0.8	0	0
0.7	0	0
0.6	0.02	4
0.5	0.075	15
0.45	0.44	88
0.4	0.46	92
0.3	0.5	100
0.2	0.5	100
0.1	0.5	100

Fuente: Datos experimentales. [NaCl]: Concentración de cloruro de sodio, Abs: Absorbancia, H: hemólisis.

Gráfica 2. Curva promedio de hemólisis inicial.



Fuente: Datos experimentales.

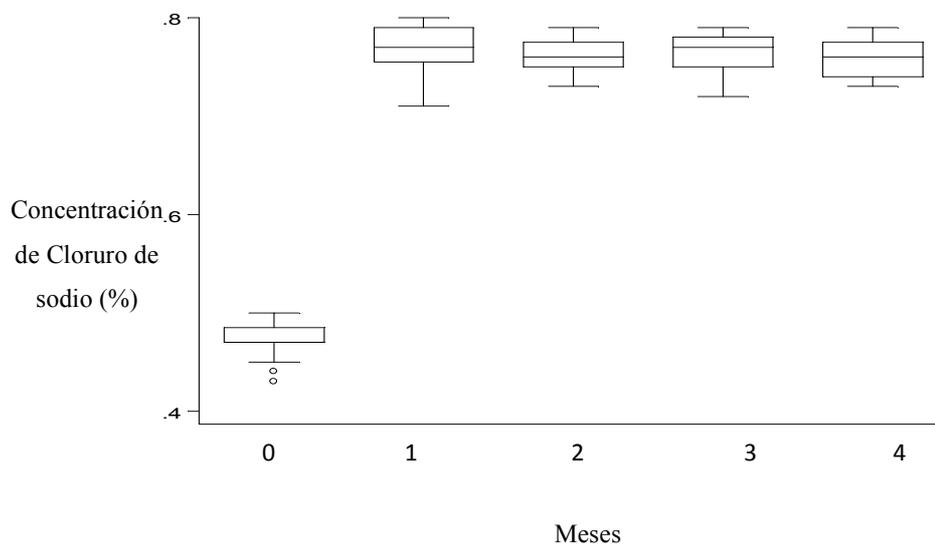
En la tabla 4 se muestra el aumento en la fragilidad de la membrana eritrocitaria. Se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0.00001$) debido al mes 0. El 50% de hemólisis se encontró en 0.76% de cloruro de sodio (gráfica 3).

Tabla 4. Promedio del porcentaje de cloruro de sodio presente en las muestras criocongeladas, por mes de estudio.

Mes	Promedio (% NaCl)	Desviación estándar
0	0.474	0.015
1	0.767	0.021
2	0.761	0.017
3	0.763	0.019
4	0.76	0.018

Fuente: Datos experimentales.

Gráfica 3. Porcentajes de cloruro de sodio correspondiente al 50% de hemólisis, por mes de estudio.



Fuente: Datos experimentales.

La presencia de antígenos eritrocitarios fue confirmada luego de la descongelación y lavado del glicerol de las bolsas criogénicas, la tabla 5 indica el fenotipo de cada muestra y el resultado obtenido luego del procedimiento. Se observó que solamente el 30% de la muestra (6/20), mantuvo el fenotipo inicial post descongelación.

Tabla 5. Presencia de antígenos eritrocitarios.

Muestra	Fenotipo inicial	Presencia post descongelación
1	B - ce	si
2	AB+ DEce	no
3	O+ DCe Kell+	si
4	A- ce	no
5	AB+ DCEce	si
6	A- ce	no
7	A+ DCEce	no
8	B+ DEce	si
9	O- ce	no
10	O- ce	no
11	A- ce	no
12	O+ DCe	no
13	B+ DCEce	no
14	AB+ DCe	no
15	A+ DCEce	si
16	O- ce	no
17	O+ DcE	no
18	O+ DCEce Kell +	no
19	A- ce	si
20	B- ce	no

Fuente: Datos experimentales.

Luego de realizar el lavado celular a las bolsas criogénicas, se procedió a realizar un frote teñido con colorante Wright en láminas portaobjetos, se observó que el 40% de los eritrocitos mantuvieron su forma original de disco bicóncavo, sin embargo se observó una severa hipocromía y moderada macrocitos. El 60% de los eritrocitos dismórficos presentaron forma de ovalocitos, equinocitos y con forma de lágrima.

Se realizó una serie de hematologías para cada muestra, la primera antes de la congelación, la segunda después de la adición del glicerol y la tercera después del lavado celular post descongelación, esto con la finalidad de observar el cambio que podían presentar los eritrocitos durante el procedimiento. Se observó disminución en la mayoría de los parámetros hematológicos, principalmente en la hemoglobina. Aumentó el volumen corpuscular medio (VCM) o tamaño celular después de la adición del glicerol y se mantuvo elevado luego del lavado celular. La hemoglobina corpuscular media se conservó dentro de los valores de referencia durante todo el procedimiento (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de parámetros hematológicos obtenidos durante el procedimiento de criopreservación.

		Parámetros hematológicos					
		RGR (M/ μ L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
*		4.94	13.7	42.3	85.6	27.7	32.4
**	1	4.5	9.7	42.1	126.5	27.6	21.8
***		4.1	4.9	27	126.7	27.6	20.8
		5.43	14.7	43.9	80.9	27.1	33.5
	2	4.2	9.9	41.9	123.6	27	25.5
		4	4.8	30	125.2	26.3	24.6
		5.19	13.8	43.6	84	26.6	31.7
	3	5.02	8.6	41	109.2	26.1	22.6
		4.3	3.2	26	113.2	26	20.4
		5.83	16.3	51.5	88.3	28	31.7
	4	5.1	11.3	43	113.2	26.3	28.5
		3.93	4.4	32	113.3	26	23.4
		5.22	15	47.7	91.4	28.7	31.4
	5	5.1	10.2	45	118.5	27.4	27.7
		4.2	3.8	37.8	120.4	26.9	20.8
		5.31	14.5	44	82.8	27.3	33
	6	4.83	11.2	43.8	116.1	26.9	31.1
		3.99	3.9	40.4	117.3	26.3	30.7
		5.68	16.6	50.9	89.7	29.2	32.6
	7	4.97	10.9	47.9	124.1	28.6	31.2
		4.57	4.1	47.5	125	28.2	30.6

	RGR (M/ μ L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
8	4.92	13.6	41	83.3	27.6	33.2
	4.48	9.3	40.1	127.3	27.5	31.6
	3.95	3.6	36.4	127.4	26.8	28.3
9	4.48	12.5	39.3	87.7	27.5	31.3
	4.2	8.6	38.2	122.5	27.3	30.9
	3.89	2.9	37.5	123.7	26.3	29.5
10	5.19	15	47.6	91.8	28.9	31.5
	4.74	12.1	46.2	129.5	28.1	30.8
	4.25	4.3	41.6	130	27.6	26.7
11	6.2	17.2	53.4	86.2	27.7	32.2
	5.6	14.3	50.8	117.8	26.5	31.3
	5.1	5.8	48.3	119.3	25.8	30.4
12	5.04	15.3	46	91.3	30.4	33.3
	4.38	10.8	45.2	119.4	28.5	31.4
	4.24	4.1	40.8	120.3	26.2	30.6
13	5.53	14.8	46.5	84	26.8	31.8
	4.69	9.8	45.3	109.9	25.8	28.5
	4.02	3.9	41.9	111.5	24.9	26.9
14	4.74	14.3	44.5	93.9	30.2	32.1
	4.18	9.6	42.8	125.2	29.5	30.2
	3.79	3.9	40.1	127.3	27.2	26.9
15	5.59	16.5	51.2	91.6	29.5	32.2
	4.86	12.7	50.1	124.9	27.9	31.8
	4.14	5.1	45.2	129.4	25.1	30.2
16	5.17	15.4	47.4	91.6	29.8	32.5
	4.79	11.8	42.8	119.6	28.5	30.7
	3.93	4.6	39.6	124.3	26.9	29.2
17	5.57	15.6	48.3	86.8	28	32.3
	4.38	11.8	43.7	107.4	26.8	31.2
	4.11	4.2	40	114.6	26.1	28.9
18	4.79	13	41.1	85.7	27.1	31.6
	4.19	7.9	40	116.7	26.9	30.2
	3.86	4.2	36.2	119.6	25.8	27.9
19	5.34	15.4	46.8	87.7	28.8	32.9
	5.04	11.6	43.8	120	28.3	25.9
	4.48	4.6	39.1	122.1	27.5	20.7

	RGR (M/ μ L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
	5.33	14.5	44.3	83.1	27.2	32.7
20	4.49	7.9	39.7	118.9	25.9	26.4
	3.58	3.9	35.8	124.6	25.9	20.3

Fuente: Datos experimentales.

RGR: recuento de glóbulos rojos, M/ μ L: millones de células por microlitro, Hb: hemoglobina, g/dL: gramos por decilitro, Hct: hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, fL: femtolitro, HCM: hemoglobina corpuscular media, pg: picogramo, CHCM: concentración de la hemoglobina corpuscular media. *: Hematología inicial, **: Hematología luego de la adición de glicerol, ***: Hematología luego del lavado celular.

La inocuidad y esterilidad fue evaluada mediante la realización de hemocultivos de las bolsas criogénicas antes de la congelación y después de la descongelación al concluir el tiempo del estudio, ninguna de las muestras mostró contaminación antes y durante el procedimiento. Todos los hemocultivos realizados fueron negativos para bacterias aeróbicas.

X. DISCUSIÓN

La congelación de eritrocitos es un método que permite prolongar el tiempo de su almacenamiento, por lo cual es importante estandarizar este procedimiento. El presente estudio utilizó únicamente el 20% de la muestra original (100 paquetes globulares) para la evaluación del control de la calidad del proceso de criopreservación debido a que las pruebas realizadas previo al estudio presentaron una viabilidad del 41%, por lo tanto era necesario determinar las causas de este porcentaje antes de congelar el resto de paquetes globulares. También se determinó la concentración de la solución de glicerol a 35.5% al obtener el mejor porcentaje de viabilidad celular (Tabla 1). Sin embargo, algunos trabajos refieren buena recuperación utilizando una solución estandarizada de glicerol, a la cual se le añade lactato de sodio, cloruro de potasio y fosfatos, esto con el objetivo de estabilizar a la célula y agregar nutrientes para que siga funcionando el metabolismo del eritrocito. Es importante mencionar que no fue posible obtener este tipo de solución ajustada debido a falta de proveedores que abastezcan esta solución a Guatemala, por lo cual el glicerol utilizado probablemente no proveyó la nutrición máxima para mantener el porcentaje de células viables. (8, 11, 25, 26).

La adición del crioprotector es un paso muy importante debido a que es necesario que éste se equilibre entre el exterior y el interior de la célula. Ésta se realizó de forma progresiva con la muestra y el glicerol a temperatura ambiente, se utilizó una solución de glicerol con concentración inicial de 35.5% p/v y se logró una concentración final de 17.75% de glicerol total en la muestra (2, 9, 11, 24).

El presente estudio utilizó el método desarrollado por Meryman y Hornblower, el cual utiliza una congelación lenta y la descongelación de forma rápida (9, 11, 24). La velocidad de la congelación fue un factor que pudo afectar directamente a la cantidad de hemólisis del producto obtenido, éste se realizó con una congelación lenta transportando las muestras de una refrigeradora a 4°C hacia a un congelador a -20°, luego a -80°C y por último introducirlo al tanque de almacenamiento con la fase gaseosa del nitrógeno líquido.

Lo más recomendable es utilizar un congelador que disminuya la temperatura de forma programada a 1°C por minuto hasta llegar a -40°C y luego 10°C por minuto hasta -80°C (2, 7, 9, 12). En este estudio la disminución de la temperatura no fue totalmente controlada lo que pudo causar daño irreversible en las células, ya que cuando se forma hielo el agua es removida del espacio extracelular y ocurre un desbalance osmótico a través de la membrana plasmática haciendo que el agua salga de la célula. Si la velocidad de la congelación fue muy lenta, se pudo aumentar la concentración de solutos extracelulares y así causar daño al deshidratarla por completo. La temperatura crítica para que ocurra daño celular es de -3°C a -40°C debido a que la muestra se encuentra en estado vítreo donde se están formando los centros de nucleación, de tal manera no se recomienda mantener las muestras mucho tiempo en ese rango de temperatura, ya que se necesita solamente más de un minuto a -39°C para que ocurra destrucción total celular, por lo tanto pasando ese rango de temperatura las células no presentan mayor daño debido a que la muestra se encuentra totalmente congelada y el metabolismo celular totalmente detenido (2, 9, 11, 21, 26).

La descongelación es el proceso contrario a la congelación, las células se hidratan de nuevo y el espacio extracelular disminuye su concentración de solutos progresivamente hasta llegar a un equilibrio extra e intracelular. Este proceso se realizó de manera rápida e inmediata luego de sacar la muestra del tanque con nitrógeno, colocando las muestras en un baño de maría a 37°C y de esta forma evitar que pequeños cristales de hielo se unieran y pudieran crecer en un tiempo corto y que sus aristas pudieran dañar a la membrana eritrocitaria. La rehidratación ocurrida en este paso no causó daño celular debido a la utilización del glicerol, cuya función fue penetrar a la célula durante la congelación, disminuyendo el punto eutéctico y la formación de hielo intracelular, de manera que durante la descongelación la célula estaba más hidratada y el gradiente osmótico fue menor (7, 9, 15).

El factor crítico de mayor dificultad para controlar fue el lavado para la remoción del glicerol, éste se realizó para crioviales un sistema abierto y para bolsas de criopreservación un sistema cerrado, utilizando un interconector de bolsas en forma estéril. La dilución del descongelado utilizó varios lavados con soluciones hipertónicas de cloruro

de sodio al 12% y 1.6%, como también solución isotónica de cloruro de sodio al 0.9%. Se utilizaron soluciones hipertónicas debido a que el medio intracelular de las células glicerolizadas es relativamente hipertónico con respecto al medio extracelular en el que se encuentran, por lo cual la primera solución utilizada para el lavado debe ser hipertónica. Esta solución permite que el glicerol empiece a difundirse hacia afuera de la célula mientras que el medio intracelular disminuye su hipertonidad (11, 26-28).

En este paso se observó hemólisis luego de cada centrifugación y el daño se debió principalmente a que los eritrocitos fueron sometidos a un cambio demasiado brusco de osmolaridad que la membrana plasmática debido a su fragilidad no pudo controlar correctamente el paso de solutos, por lo cual entró demasiada agua y la célula aumentó de tamaño (Tabla 6, ver VCM). Es importante mencionar que el proceso de lavado se realizó de forma manual y este dura entre 40-45 minutos, por lo cual el tiempo de exposición de la muestra con el crioprotector pudo dañar a la célula, debido a la toxicidad a temperatura ambiente que presenta el glicerol, también un lavado de forma manual aumenta la posibilidad de daño debido a su alta manipulación de muestras.

El promedio de los porcentajes de viabilidad celular se observan en la tabla 2, en general presentaron porcentajes menores al porcentaje inicia o mes 0. La viabilidad eritrocitaria fue analizada por medio del paquete estadístico ANOVA y se realizó una análisis de varianza, obteniendo que el mes 0 fue el que presentó una diferencia significativa ($p < 0.00001$) con respecto a los siguientes meses, los datos obtenidos se presentan en la gráfica 1, la cual muestra que la viabilidad celular disminuyó considerablemente a partir del primer mes en todas las muestras, manteniendo resultados parecidos a lo largo del período del estudio. Esta prueba indica que los eritrocitos obtenidos de la criocongelación pierden muchas de las funciones necesarias para poder circular en el cuerpo humano y liberar oxígeno por lo menos en 24 horas ya que el metabolismo no se conservó activo y perdió la capacidad de mantener la flexibilidad e integridad de la membrana además de preservar a la hemoglobina en su forma funcional y así asegurar una adecuada liberación de oxígeno, sin embargo existe cierto porcentaje de eritrocitos que mantiene esas funciones vitales pero no es la cantidad suficiente como para

realizar una transfusión. La causa principal de la disminución de la viabilidad es probablemente debido a que la membrana eritrocitaria se encontró muy débil perdió enzimas eritrocitarias que ocasionó la disminución de su metabolismo y permitió el paso de solutos extracelulares de forma que diluyó a los solutos intracelulares durante el proceso de lavado para la remoción del glicerol, en parte su debilidad se debe a que no se encontraron las soluciones nutritivas necesarias que debían adicionarse y con las cuales la viabilidad se vería menos afectada. También es importante mencionar que bajo otras circunstancias la literatura reporta una viabilidad mayor que la obtenida y por lo tanto la posibilidad de transfusión en estos casos sopesa el riesgo versus el beneficio, es decir una célula congelada jamás mantendrá la viabilidad de una célula fresca y que no ha sido expuesta a ningún estrés ni daño celular, pero si la suficiente viabilidad como para elevar la hemoglobina de cualquier paciente de alto riesgo que no cuente con un soporte transfusional oportuno.

Razón por lo cual, fue necesario determinar la fragilidad de la membrana de los eritrocitos, ésta fue medida a partir de la realización de curvas de hemólisis, realizando una serie de diluciones hipotónicas de cloruro de sodio con las muestras, se determinó el porcentaje de hemólisis utilizando las densidades ópticas obtenidas en un espectrofotómetro a 540 nm de longitud de onda, de igual manera que con la viabilidad, los resultados fueron analizados con el paquete estadístico ANOVA realizando un análisis de varianza a bloques repetidos. Se obtuvo el promedio de la concentración de cloruro de sodio que equivale al 50% de hemólisis de cada mes (Tabla 4). El 50% de hemólisis se encontró en la dilución 0.76% de cloruro de sodio (Gráfica 3), lo cual indica que la membrana eritrocitaria post criocongelación es menos resistente a la lisis en función de la disminución de la concentración de cloruro de sodio en el medio que la resistencia que muestra un eritrocito no congelado, ya que el promedio del resultado inicial fue de 0.47 % (Tabla 3 y Gráfica 2). Esta prueba demostró que el procedimiento realizado dañó de forma irreversible a la membrana de más de la mitad de eritrocitos, por lo tanto el glicerol utilizado no protegió completamente la membrana.

El fenotipo tiene un papel muy importante en este estudio ya que una de las finalidades a largo plazo es lograr proveer este tipo de sangre a las personas debido a la dificultad en su obtención y evitar la aloinmunización, por lo cual se utilizaron muestras con fenotipo de baja frecuencia, tal es el caso de muestras Rh negativo. Los resultados de cada muestra tanto inicial como el obtenido después de la descongelación se muestran en la tabla 5, la cual indica que únicamente el 30% de las muestras logró preservar el fenotipo inicial. Debido al daño ocasionado a la membrana y al cambio de osmolaridad, los antígenos se perdieron durante el procedimiento, sin embargo ese 30% que mantuvo el fenotipo es una esperanza para lograr un mejor resultado a futuro, ajustando los parámetros necesarios durante este procedimiento, sobre todo utilizando métodos automatizados de lavado que eviten el rompimiento de la membrana eritrocitaria donde se encuentran los antígenos y estos se puedan conservar para su evaluación.

En la serie de hematologías realizadas se observó que el número de eritrocitos y el hematocrito disminuyó luego de los lavados realizados para la remoción del glicerol, esto se debe a que aproximadamente el 20% de las células sufren daño permanente por hemólisis mecánica. Por otra parte, la cantidad de hemoglobina en gramos por decilitro (g/dL) presentó una disminución severa en todas las muestras, debido a la fragilidad en la membrana eritrocitaria que permitió el paso brusco de solutos extracelulares a su interior causando dilución de la hemoglobina dentro de la célula y provocando un estado de turgencia, este valor bajo en hemoglobina se debe entonces a que la proporción tamaño-hemoglobina de cada eritrocito se alteró.

En comparación con la hematología inicial, los índices eritrocitarios VCM (volumen corpuscular medio), HCM (hemoglobina corpuscular media) y CHCM (concentración de la hemoglobina corpuscular media) presentaron alteraciones (Tabla 6). El VCM después de la adición del glicerol aumentó de 10 a 25 femtolitros (fL), esto debido a que el glicerol penetró a las células aumentando su volumen y de esta manera proteger su estructura durante la congelación. Después de la descongelación, el VCM no sufrió mayor alteración en la mayoría de las muestras sin embargo en algunas aumentó su volumen de manera moderada esto asociado al grado de hemólisis que se observó debido a su fragilidad

osmótica aumentada, se puede inferir que la membrana eritrocitaria no toleró las altas concentraciones de cloruro de sodio utilizado en el lavado de remoción del glicerol, obteniendo así que las células se hincharan para equilibrar la concentración de solutos en el medio extracelular con el intracelular.

La HCM se mantuvo dentro del parámetro de referencia (26 -32 picogramos, pg) durante la serie de hematologías realizadas, sin embargo se observó una ligera disminución con respecto al valor inicial. De tal forma que la cantidad de hemoglobina por glóbulo rojo se mantuvo dentro de los límites normales durante todo el procedimiento, pero tomando en cuenta que estaba diluida con agua extracelular.

La CHCM disminuyó luego de la adición de glicerol, debido a que el glicerol penetró en la célula, diluyó la hemoglobina existente y debido a que este parámetro mide la cantidad de hemoglobina relativa al tamaño de la célula por glóbulo rojo, es de esperar un valor inferior al normal, ya que la célula se encontraba más grande y no aumentó la hemoglobina dentro de ésta. Después de la descongelación, la CHCM siguió disminuyendo, también debido a que en la célula penetró solución salina hipertónica y la membrana eritrocitaria aumentó su tamaño.

Luego de la descongelación, a cada muestra se le realizó un frote teñido con colorante Wright, en el cual se observaron eritrocitos dismórficos tales como equinocitos, ovalocitos y en menor proporción células en forma de lágrima, como también eritrocitos con forma normal discoide y bicóncavos. La presencia de eritrocitos dismórficos se debe principalmente a la disminución de ATP intracelular perdido durante el movimiento de solutos para equilibrar la osmolaridad con el medio y también se debe al cambio de pH ocurrido con la adición de glicerol ya que los cambios de pH afectan la morfología celular transformando de discocitos a equinocitos, esta transformación podría alterar el flujo en los grandes vasos sanguíneos por aumento de la viscosidad por lo tanto el producto no es totalmente recomendado para una transfusión.

Con respecto a los hemocultivos realizados, se observó que ninguna muestra presentó contaminación bacteriana aeróbica ni antes ni después del procedimiento, esto debido a la utilización de un sistema cerrado para la intercomunicación con las soluciones de lavado previamente estériles.

En resumen, el procedimiento utilizado para la criopresevación de eritrocitos presentó parámetros no controlados y no utilizó sustancias nutritivas, lo cual probablemente ocasionó daño irreversible en la membrana plasmática y consecuente desequilibrio en el metabolismo eritrocitario, evitando una recuperación adecuada para la transfusión de eritrocitos.

XI. CONCLUSIONES

1. No se logró criopreservar eficazmente células rojas principalmente de fenotipos de baja frecuencia para el almacenamiento en el banco de sangre, es necesario mejorar los materiales y equipos a utilizar.
2. Los protocolos diseñados para la congelación y descongelación de eritrocitos, deben ser mejorados debido a las deficiencias de viabilidad y fragilidad observadas en las muestras criopreservadas.
3. Los parámetros de estudio presentaron las siguientes alteraciones luego del primer mes de criocongelación, la disminución de 84.9% a 36.04% de viabilidad celular, aumento en la fragilidad de la membrana eritrocitaria por presentar un 50% de hemólisis a una concentración de cloruro de sodio de 0.76% y el 70% de pérdida de antígenos del fenotipo luego de la criopreservación. Sin embargo, el parámetro de inocuidad y esterilidad no presentó ningún cambio durante el período de estudio, ya que el 100% de los hemocultivos realizados fueron negativos.
4. Los frotis sanguíneos realizados determinaron la alteración causada en la morfología celular eritrocitaria. El 60% de los eritrocitos perdieron su forma original de disco bicóncavo, lo cual pudo deberse a la pérdida de ATP en la membrana con poca viabilidad, fragilidad aumentada y al desequilibrio en el pH de la solución.

XII. RECOMENDACIONES

1. Utilizar una solución estandarizada como el Glycerolyte 57[®], el cual posee compuestos nutritivos que ayudan a preservar el metabolismo celular.
2. Agregar manitol o sorbitol a la solución de glicerol en la concentración adecuada y bajo los estándares de esterilidad, para prevenir la hemólisis y disminuir la fragilidad de la membrana plasmática eritrocitaria.
3. Realizar el procedimiento de criopreservación utilizando un congelador automático con un programa que disminuya la temperatura de 1°C por minuto hasta llegar a -40°C y luego que disminuya 10°C por minuto hasta llegar a -80°C.
4. Utilizar sistemas automáticos de lavado celular post descongelación que aseguren una recuperación celular aceptable, produzcan resultados reproducibles y funcionen en sistemas cerrados, para disminuir el tiempo de remoción del glicerol.
5. Controlar el pH de la solución de glicerol utilizada en el procedimiento de criopreservación.

XIII. REFERENCIAS

1. Ávila-Portillo L, *et al.* Fundamentos de criopreservación. Rev Colomb Obst y Ginec. 2006; 57(4): 20-29 p.
2. Peñuela O, *et al.* Preservación de eritrocitos y cambios físicos ocurridos durante el almacenamiento. Rev Fac de Med. 2003; 51(4): 190-197 p.
3. Fahy GM. Cryobiology: The study of life and death at low temperature. 1986; 224:315-335 p.
4. Ryan J. General guide for cryogenically storing animal cell cultures. Corning Life Sciences. Technical Bulletin. 2004. 10p.
5. Ryan J. Cryogenic preservation and storage of animal cells. Corning Life Sciences. 2005. Disponible en www.corning.com/lifesciences.
6. Pérez H. Documento de apoyo del Instituto Nacional de Donación y Trasplante de Células, Tejidos y Órganos (INDT). Uruguay. 1998.
7. Simione F. y Nalge Nunc international corporation. Cryopreservation manual. 1998. 8p
8. Lovelock JE. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. Biochim Biophys Acta. 1953; 10: 414-426 p.
9. Rodríguez L. Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO. España: Universidad Autónoma de Barcelona, (tesis de doctorado, Facultad de Medicina) 2005; 22-33 p.
10. Kang E, *et al.* Mobilization, collection and processing of peripheral blood stem cells in individuals with sickle cell trait. Blood. 2002; 99(3): 850-855 p.

11. Valeri CR. Simplification of the methods for adding and removing glycerol during freeze-preservation of human red blood cells with the high or low glycerol methods: Biochemical modification prior to freezing. *Transfusion*. 1975; 15(3): 195-218.
12. Day J y Stacey G. Cryopreservation and freeze-drying protocols. *Methods in molecular biology*. 2a.ed. Estados Unidos: Humana Press Inc, 2007. 361p. (p.xi)
13. Rowley S, *et al.* Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. *Blood*. 1994; 83(9): 2731-2736 p.
14. Reubinoff BE, *et al.* Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Human Reproduction*. 2001; 16(10): 2187-2194p.
15. Stiff P, *et al.* Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimetilsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing. *Blood*. 1987; 70(4): 974-978 p.
16. Cabrera P, *et al.* Vitrificación: Una alternativa para la criopreservación de embriones. *Rev. Fac. Cienc. Vet.* 2006; 4(1).
17. Sputtek A, Kühnl P and Rowe A. Cryopreservation of erythrocytes, thrombocytes and lymphocytes. *Transfus Med Hemother*. 2007; 34:262-267 p.
18. Goldman J, *et al.* Collection, cryopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukaemia in blast-cell transformation. *Br J Haematol*. 1978; 40(2): 185-195 p.
19. Rowley S and Anderson GL. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on haematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant*. 1993; 11(5): 389-393 p.

20. Douay L, *et al.* Study of granulocyte-macrophage progenitor (CFUc) preservation after slow freezing of bone marrow in the gas phase of liquid nitrogen. *Exp Haematol.* 1982; 10(4): 360-366 p.
21. Alessandrino P, *et al.* Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 23(6): 533-537 p.
22. Sandoval R, *et al.* Criopreservación de semen ovino empleado con 3 dilutores y 4 combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. *Rev Inv Vet Perú.* 2007; 18(2): 107-114 p.
23. Boiso I. Principio básicos de criobiología. *Rev Iberoam Fert.* 2001; 18(4).
24. Meryman HT. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology.* 1971; 8(5): 489-500 p.
25. Lluís-Vives J y Lluís-Aguilar J. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 2a.ed. España: MASSON, 2001. 653p. (p. 566-568).
26. Farrugia A, *et al.* Cryopreservation of red blood cells: Effect of freezing on red cell quality and residual lymphocyte immunogenicity. *J Clin Pathol.* 1993; 46: 742-745p.
27. Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología. Manual Técnico. 13a. ed. Argentina, 2001. 815p. (p. 737-739).
28. Walker R, *et al.* Technical Manual. American Association of Blood Banks. 11a. ed. Estados Unidos de América, 1993. 890p. (p. 790-793).
29. Fink N. *et al.* Métodos de laboratorio hematológico. Uruguay: Universidad Nacional de la Plata (Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas) 2007; 34-35 p.
30. Devlin TM. Bioquímica. 4a. ed. España: Reverté, 2004. 593p. (p. 203).

31. Serway R *et al.* Fundamentos de Física. 6ta ed. Thomson vol 2 Cengage Learning Editores 2004, 445p
32. Souza P, *et al.* Cryopreservation of *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* with glycerol. Rev Parasitol dia. 2000; 24(1-2).
33. Van de Watering L and Brand A. Effects of storage of red cells. Transfus Med Hemother 2008; 35:359–367 p.
34. Borbolla JR, *et al.* *In vitro* and clinical results of a simple -80°C cryopreservation thecnic. Amer Soc Hem. 2000; 14(56).
35. Gutiérrez C, *et al.* Encapsulación de amicacina en eritrocitos utilizando un método de diálisis hipoosmótica. Tecnología Farmacéutica. 2000; 113-115 p.
36. Radillo A. Medicina transfusional. 2a. ed. México: Editorial Prado S.A., 2000. 249p. (p. 66, 67, 142-145)
37. Carmona J. Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO y Rh en la población laboral del Valle de Aburrá y el cercano oriente de Antioquia. Act Med Colomb. 2006; 31(1): 20-30 p.
38. Campana G. Grupo sanguíneo y factor Rh en los ingresantes a la Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco. 2000; 8(15): 9-11p.
39. Luisada A. Colorimetric determination of 2,3-diphosphoglycerate in whole blood. Clinical Chemistry. 1973; 18(1): 118-120p.
40. Barbolla L, *et al.* Manual de hemoterapia y medicina transfusional. Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. 2a.ed. España: Janssen-Cilag, 2000. 305p. (p. 243-248).

XIV. ANEXOS

Anexo 1. Listado de pruebas realizadas a las bolsas de sangre previo a la criopreservación.

- ✓ Anticuerpos totales contra el virus de inmunodeficiencia adquirida.
- ✓ Antígeno p-24 del virus de inmunodeficiencia adquirida.
- ✓ Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.
- ✓ Antígeno del núcleo o core del virus de la hepatitis B.
- ✓ Anticuerpos totales del virus de la hepatitis C.
- ✓ Anticuerpos totales contra el virus linfotrópico-T humano tipo 1 y 2.
- ✓ Anticuerpos IgM contra el citomegalovirus.
- ✓ Anticuerpos totales contra *Trypanosoma cruzi*.
- ✓ Anticuerpos totales contra *Treponema pallidum*.

Anexo 2. Matriz del porcentaje de viabilidad y porcentaje de cloruro de sodio en 50% de hemólisis, por duplicado.

Muestra	Mes	% viabilidad	[NaCl]50% hemólisis	Muestra	Mes	% viabilidad	[NaCl]50% hemólisis
1	1	85	0.47	4	4	36	0.74
1	1	85	0.47	4	4	38	0.72
1	2	35	0.76	4	5	37	0.75
1	2	37	0.75	4	5	39	0.75
1	3	39	0.75	5	1	86	0.48
1	3	35	0.77	5	1	84	0.47
1	4	37	0.75	5	2	34	0.76
1	4	35	0.74	5	2	36	0.77
1	5	34	0.74	5	3	36	0.75
1	5	36	0.76	5	3	36	0.78
2	1	87	0.47	5	4	35	0.77
2	1	89	0.45	5	4	37	0.78
2	2	41	0.72	5	5	38	0.77
2	2	39	0.74	5	5	33	0.75
2	3	39	0.75	6	1	89	0.47
2	3	41	0.73	6	1	90	0.49
2	4	39	0.74	6	2	41	0.77
2	4	37	0.75	6	2	39	0.75
2	5	41	0.74	6	3	40	0.79
2	5	39	0.76	6	3	42	0.78
3	1	81	0.48	6	4	39	0.76
3	1	79	0.47	6	4	41	0.77
3	2	30	0.71	6	5	39	0.77
3	2	32	0.73	6	5	39	0.79
3	3	38	0.73	7	1	88	0.48
3	3	30	0.75	7	1	90	0.49
3	4	33	0.72	7	2	39	0.77
3	4	31	0.74	7	2	41	0.79
3	5	32	0.75	7	3	37	0.79
3	5	32	0.74	7	3	39	0.78
4	1	85	0.47	7	4	40	0.77
4	1	87	0.46	7	4	40	0.79
4	2	39	0.75	7	5	41	0.78
4	2	37	0.77	7	5	37	0.77
4	3	37	0.75	8	1	80	0.44
4	3	34	0.75	8	1	80	0.43

Muestra	Mes	% viabilidad	[NaCl]50% hemólisis	Muestra	Mes	% viabilidad	[NaCl]50% hemólisis
8	2	31	0.78	12	2	35	0.79
8	2	33	0.79	12	2	35	0.76
8	3	34	0.77	12	3	34	0.76
8	3	34	0.77	12	3	36	0.74
8	4	32	0.78	12	4	36	0.78
8	4	34	0.79	12	4	36	0.78
8	5	32	0.79	12	5	37	0.74
8	5	30	0.79	12	5	35	0.78
9	1	85	0.46	13	1	80	0.49
9	1	83	0.46	13	1	80	0.47
9	2	37	0.77	13	2	31	0.78
9	2	35	0.79	13	2	35	0.75
9	3	39	0.78	13	3	35	0.73
9	3	36	0.79	13	3	35	0.74
9	4	33	0.79	13	4	32	0.78
9	4	35	0.78	13	4	36	0.75
9	5	34	0.77	13	5	33	0.76
9	5	34	0.77	13	5	36	0.79
10	1	86	0.47	14	1	81	0.49
10	1	86	0.48	14	1	81	0.47
10	2	38	0.77	14	2	34	0.79
10	2	36	0.79	14	2	36	0.77
10	3	36	0.79	14	3	35	0.75
10	3	36	0.78	14	3	35	0.76
10	4	35	0.75	14	4	35	0.77
10	4	37	0.74	14	4	33	0.79
10	5	37	0.76	14	5	36	0.74
10	5	37	0.75	14	5	36	0.74
11	1	87	0.48	15	1	83	0.48
11	1	87	0.48	15	1	86	0.47
11	2	37	0.76	15	2	38	0.77
11	2	36	0.75	15	2	34	0.79
11	3	34	0.74	15	3	35	0.76
11	3	36	0.75	15	3	35	0.75
11	4	39	0.77	15	4	34	0.78
11	4	37	0.76	15	4	36	0.77
11	5	35	0.78	15	5	33	0.79
11	5	40	0.78	15	5	36	0.77
12	1	85	0.45	16	1	89	0.5
12	1	87	0.46	16	1	87	0.47

Muestra	Mes	% viabilidad	[NaCl]50% hemólisis	Muestra	Mes	% viabilidad	[NaCl]50% hemólisis
16	2	40	0.79	18	4	37	0.78
16	2	36	0.77	18	4	35	0.76
16	3	39	0.75	18	5	36	0.74
16	3	39	0.78	18	5	40	0.73
16	4	36	0.75	19	1	81	0.49
16	4	38	0.76	19	1	83	0.5
16	5	38	0.74	19	2	31	0.76
16	5	38	0.77	19	2	33	0.79
17	1	86	0.48	19	3	34	0.76
17	1	86	0.49	19	3	34	0.77
17	2	37	0.79	19	4	32	0.78
17	2	36	0.77	19	4	34	0.79
17	3	36	0.77	19	5	33	0.75
17	3	36	0.77	19	5	36	0.74
17	4	35	0.78	20	1	85	0.5
17	4	37	0.75	20	1	83	0.47
17	5	38	0.74	20	2	37	0.8
17	5	36	0.74	20	2	35	0.78
18	1	86	0.49	20	3	35	0.75
18	1	88	0.46	20	3	35	0.77
18	2	38	0.73	20	4	35	0.75
18	2	34	0.76	20	4	37	0.74
18	3	38	0.75	20	5	34	0.78
18	3	38	0.75	20	5	36	0,77

Fuente: Datos experimentales.