

Universidad Nacional de Rosario  
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas



# “Criopreservación de células madre neurales embrionarias (CMNEs) mediante la metodología de enfriamiento lento”

**Catalina Berca**

Tesina para optar al título de Licenciada en Biotecnología

Directores:

Dra. M. Celeste Robert

Dra. Claudia Banchio

Lic. Aneley Montaner

Centro Binacional (Argentina-Italia) de Investigaciones  
en Criobiología Clínica y Aplicada (CAIC)



Universidad Nacional de Rosario

2017



# ÍNDICE

## INDICE

AGRADECIMIENTOS .....	i
ABREVIATURAS.....	ii
RESUMEN .....	iv
PRESENTACIONES A CONGRESOS .....	v
1) INTRODUCCIÓN .....	1
1.1) CRIOPRESERVACIÓN .....	1
1.1.1) Criopreservación de muestras biológicas .....	1
1.1.2) Breve introducción al tema .....	1
1.1.3) Agentes crioprotectores.....	3
1.1.3.i) Dimetilsulfóxido.....	5
1.1.4) Vitrificación.....	6
1.1.5) Congelamiento convencional o enfriamiento lento.....	6
1.1.5.i) Eventos durante el congelamiento. Dependencia de la supervivencia celular con la velocidad de enfriamiento y la concentración de ACP .....	8
1.1.5.ii) Destino del agua intracelular durante el congelamiento .....	10
1.1.5.iii) Lesiones por congelamiento lento .....	13
1.1.5.iv) Lesiones por congelamiento rápido.....	13
1.1.5.v) Rol de la permeabilidad de la membrana en la respuesta al congelamiento .....	14
1.1.5.vi) Rol del superenfriamiento.....	14
1.1.5.vii) Proceso de descongelamiento .....	15
1.2) CELULAS MADRE .....	16
1.2.1) Células madre embrionarias.....	16
1.2.2) Células madre neurales.....	17
1.3) Una visión general del desarrollo cerebral durante la embriogénesis.....	18
1.3.1) Inducción del neuroectodermo. ....	19
1.3.2) Diferenciación de células neuroepiteliales.....	20
1.3.3) Especificación de neuronas y glía a partir del neuroepitelio .....	21
1.3.3.i) Especificación de subtipos neuronales a partir de CMEs. ....	22
1.3.3.ii) Especificación de subtipos gliales a partir de CMEs.....	22
1.3.3.iii) Primero neuronas, luego glía.....	22
1.4) Relevancia de las células madre .....	23
1.4.1) Aplicaciones clínicas potenciales .....	23

1.4.1.i) Terapias regenerativas del SNC .....	23
1.4.1.ii) Trasplante de CMNs .....	24
1.4.1.iii) Trasplante de CMNs diferenciadas.....	24
1.4.1.iv) Trasplante de CMNs genéticamente modificadas .....	24
1.4.2) Utilización de CMNs en investigación.....	24
1.5) Limitaciones en el uso de CMNs.....	26
2) OBJETIVOS.....	28
2.1) Objetivo general.....	28
2.2) Objetivos específicos .....	28
3) MATERIALES Y METODOS .....	29
3.1) Células madre neurales embrionarias (CMNEs) .....	29
3.1.1) Obtención de CMNEs.....	29
3.1.2) Aislamiento de las CMNEs .....	30
3.1.3) Evaluación de la viabilidad celular .....	31
3.1.4) Cultivo y proliferación de las CMNEs.....	31
3.1.4.i) Evaluación de la proliferación de las CMNEs .....	32
3.1.5) Disgregación de las neuroesferas .....	32
3.2) Criopreservación de CMNEs.....	33
3.2.1) Enfriamiento lento y almacenamiento de las CMNEs .....	33
3.3) Descongelamiento y proliferación de las CMNEs.....	35
3.3.1) Evaluación de la proliferación de las CMNEs post-descongelamiento.....	35
3.4) Disgregación de las neuroesferas.....	35
3.5) Diferenciación de las CMNEs .....	36
3.5.1) Caracterización de las CMNEs diferenciadas en cultivo .....	36
3.6) Evaluación citológica de las CMNEs.....	37
3.6.1) Citospín.....	37
3.6.1.i) Tinción Hematoxilina/ Eosina (HE).....	38
3.6.1.ii) Tinción de Nissl.....	39
3.7) Comparación del método de enfriamiento lento con un método de congelamiento de rutina .....	39
3.7.1) Congelamiento de CMNEs mediante protocolo estándar .....	40
3.7.2) Rewarming y proliferación de CMNEs .....	40
3.7.2.i) Evaluación de la proliferación de las CMNEs post-descongelamiento .....	40

3.7.3) Disgregación de las neuroesferas .....	41
3.8) Análisis Estadístico .....	41
4) RESULTADOS .....	42
4.1) Caracterización de la proliferación de CMNEs control .....	42
4.2) Metodología de enfriamiento lento .....	44
4.2.1) Estimación de parámetros .....	44
4.2.2) Análisis del desempeño de la técnica .....	46
4.3) CMNEs post-rewarming .....	49
4.3.1) Evaluación de la proliferación .....	50
4.3.1.i) Rendimiento de la proliferación .....	51
4.3.2) Evaluación de la capacidad de diferenciación .....	52
4.3.3) Evaluación citológica .....	54
4.4) Comparación entre métodos .....	55
4.4.1) Comparación de curvas de proliferación .....	56
4.4.2) Cálculo de UFN .....	58
5) DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	60
6) BIBLIOGRAFÍA .....	67

# **AGRADECIMIENTOS**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis papás, mi ejemplo de vida, responsables de lo que soy y el principal motor que me transportó hasta donde estoy hoy. Gracias por darme todo, por su amor incondicional y por el gran apoyo a lo largo de estos años y siempre.

A mi hermana, Delfi, amiga, compañera, otro gran pilar en mi vida, con la que tuve la suerte de poder compartir no sólo la vida, sino también muchos años de la carrera; que me bancó y me sigue bancando en todas.

A la Universidad Nacional de Rosario y a la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas por formarme y darme las herramientas tanto para poder desempeñarme en esta hermosa profesión como también en la vida.

A Cele, mi directora, por enseñarme tantas cosas con gran dedicación y paciencia; por transmitirme el amor y pasión por la carrera y ayudarme a atravesar esta hermosa etapa final, siempre con alegría y energía. A Leo que dedicó muchas horas de su tiempo, proporcionando una ayuda fundamental en la mesada y que mostró siempre buena predisposición para discutir ideas, enseñándome a pensar y resolver situaciones.

A Joaquín y Edgardo que me recibieron en el laboratorio y me brindaron siempre su ayuda y sus ideas, con alegría, generosidad y haciéndome sentir muy cómoda. A todos mis compañeros de laboratorio, por su buena onda y calidez, por estar predispuestos a colaborar y aportar ideas y por hacerme sentir siempre en familia a lo largo de este tiempo.

A mis co-directoras, Claudia y Aneley, por su aporte fundamental al trabajo de tesina.

A toda la gente que la vida me fue cruzando, amigos, compañeros, hermanos del alma, familiares; todos aquellos que me hicieron crecer y aprender muchísimo y me acompañaron incondicionalmente desde su lugar, dejando su marca; a los que comparten conmigo desde la infancia y a los que se fueron sumando a lo largo de los años. Soy afortunada de la gente que me rodea y todos formaron parte de lo que soy hoy, como persona y como futura profesional. A las personas que ya no están, pero marcaron inmensamente mi camino y están siempre presentes en el corazón. Gracias Dios por permitirme transitar este camino y regalarme todo lo que me toca vivir.

# **ABREVIATURAS**



## **ABREVIATURAS**

ACP: agente crioprotector

bFGF: factor de crecimiento básico fibroblástico

CMEh: célula madre embrionaria humana

CMEs: células madre embrionarias

CMNEs: células madre neurales embrionarias

CMNs: células madre neurales

CPI: célula progenitora intermediaria

CPIa: célula progenitora de astrocitos intermedia

CPIn: célula progenitora neuronal intermedia

CPIo: célula progenitora de oligodendrocitos intermedia

DMEM: medio Eagle Dulbecco modificado

DMSO: dimetilsulfóxido

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EGL: eminencia gangliolar lateral

EGM: eminencia gangliolar media

FGF: factor de crecimiento fibroblástico

GFAP: proteína gliofibrilar ácida

GR: glía radial

HE: hematoxilina/ eosina

HEM: medio intercambiador de calor

N<sub>2</sub>L: nitrógeno líquido

NEs: neuroesferas

NGF: factor de crecimiento nervioso

PBS: Buffer Fosfato Salino

PC: placa cortical

PNE: progenitores neuroepiteliales

SFB: suero fetal bovino

SNC: sistema nervioso central

UFN: unidades formadoras de neuroesferas

ZI: zona intermedia

ZM: zona marginal

ZSG: zona subgranular

ZSV: zona subventricular

ZV: zona ventricular

**RESUMEN**

## RESUMEN

Debido al gran auge en el uso de células madre neurales para terapias regenerativas, es de fundamental importancia contar con métodos de preservación y almacenamiento seguro de las mismas. Uno de los métodos comúnmente usados es la criopreservación mediante enfriamiento lento; sin embargo, no existe al presente un protocolo definido para el mismo.

A partir de esto se propone como objetivo del presente trabajo el desarrollo de un protocolo de criopreservación de CMNEs. Para ello, se requiere controlar e investigar las variables asociadas al daño celular durante el proceso de enfriamiento lento de las células en suspensión, de manera de sentar las bases del mismo. Así, partiendo de parámetros pre-establecidos en nuestro laboratorio mediante estudios de penetración del DMSO para la determinación del tiempo y temperatura óptimos de incubación de dicho ACP con las CMNEs, se evaluaron distintas condiciones para la criopreservación de las mismas. Específicamente, se analizaron distintas velocidades de enfriamiento, así como el efecto de las mismas y del tiempo de almacenamiento sobre determinadas propiedades celulares como ser tamaño, morfología, capacidad de proliferación y potencial de diferenciación. Luego del análisis exhaustivo de los parámetros analizados, se procedió a seleccionar aquella metodología que evidenciara mejor preservación de las CMNEs.

**PRESENTACIONES  
A CONGRESOS**

## PRESENTACIONES A CONGRESOS

- ✓ “Cryopreservation of embryonic neural stem cells (ENSCs) by the slow cooling technique”. **Berca, C**; Montaner, A; Rodríguez, J.V; Banchio, C; Robert, M.C. *Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias, 13 al 17 de Noviembre de 2017*, Buenos Aires, Argentina. Tipo de presentación: Póster.
  
- ✓ “A novel application of Bes-Gluconate-Polyethylene Glycol (BGP) preservation solution to maintain isolated cells for bioartificial devices. Functionality/viability studies”. Tomatis, C; **Berca, C**; Rodríguez, J.V; Guibert, E.E; Robert, M.C. *OBI 2017, 5to Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, 20 al 24 de Agosto de 2017*, Maresias, S Paulo, Brasil. Tipo de presentación: Póster.
  
- ✓ “A novel application of Bes-Gluconate-Polyethylene Glycol (BGP) preservation solution to maintain isolated cells for bioartificial devices. Functionality/viability studies”. Tomatis, C; **Berca, C**; Rodríguez, J.V; Guibert, E.E; Robert, M.C. *XI Jornada de Ciencia y Tecnología, UNR, 26 de Octubre 2017*, Rosario, Argentina. Tipo de presentación: Póster.

# **INTRODUCCIÓN**

# 1) INTRODUCCIÓN

## 1.1) CRIOPRESERVACIÓN

### 1.1.1) Criopreservación de muestras biológicas

La preservación biológica sirve a muchos propósitos prácticos y útiles; independientemente del uso final, su objetivo es extender la ventana de funcionalidad de las muestras. Las estrategias de preservación implican el almacenamiento de células, tejidos u órganos, desde horas a temperaturas hipotérmicas (desde 25 °C a 4 °C) hasta períodos de tiempo más extensos (por ej. años) a muy bajas temperaturas, por debajo del punto de congelamiento de los mismos (-80 °C o menos) [7].

Particularmente, la criopreservación puede definirse como el mantenimiento de material biológico en estado viable y funcional a temperaturas criogénicas, por debajo de -80 °C o más comúnmente a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C) o cerca de ella [6, 7].

### 1.1.2) Breve introducción al tema

La formación de hielo a partir del agua pura se vuelve energéticamente favorable cuando la misma es enfriada por debajo de los 0 °C a presión atmosférica. Sin embargo, para que la formación de hielo realmente ocurra, un grupo de moléculas de agua debe disponerse en un núcleo cristalino estable. Una vez que ese núcleo es formado, moléculas adicionales de agua se unirán, haciendo que el cristal aumente su tamaño, siempre y cuando la temperatura permanezca por debajo del punto de fusión. La formación del primer núcleo cristalino se da al azar, a partir del movimiento aleatorio de las moléculas de líquido.

La probabilidad de nucleación se vuelve mayor a menores temperaturas debido a que el número de moléculas que deberán coordinarse para formar un núcleo cristalino estable será menor. Usualmente la formación de un núcleo cristalino se ve favorecida por la presencia de otras moléculas que impongan un cierto nivel de orden local, incrementando de esta manera la probabilidad de que se forme un cristal ordenado.



Este tipo de sustancias se denominan nucleadores heterogéneos y por lo general ocasionan la formación de hielo a temperaturas entre  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  [21].

A temperaturas de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  todas las reacciones químicas, procesos biológicos y actividades intra y extracelulares quedan suspendidos por lo que, teóricamente, cualquier tipo de muestra criopreservada puede ser mantenida en esa condición indefinidamente. Esto se debe a que el agua líquida no existe por debajo de los  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sino que los únicos sistemas físicos posibles en tal punto son el cristalino o el vítreo y en ambos la viscosidad es tan alta que la difusión se vuelve totalmente insignificante. Además, a temperaturas tan bajas, la energía térmica necesaria para las reacciones químicas es insuficiente. Entre  $0$  y  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la actividad enzimática de las células disminuye en gran medida, aunque permanece activa mientras que por debajo de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  los intercambios fisicoquímicos están totalmente detenidos.

Los únicos fenómenos que podrían ocurrir en sistemas acuosos congelados a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  son eventos fotofísicos tales como la formación de radicales libres y la producción de roturas en macromoléculas, como resultado directo de “golpes” por radiación ionizante o rayos cósmicos [6].

Por lo tanto, el verdadero desafío para las células en criopreservación, no es su capacidad para soportar un almacenamiento a muy bajas temperaturas, sino más bien el hecho de superar la letalidad de una zona intermedia de temperatura ( $15$  a  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), la cual debe atravesarse dos veces a lo largo del proceso global, una durante el congelamiento y otra durante el descongelamiento [39].

En general, el proceso de criopreservación implica una exposición inicial de la muestra a un agente crioprotector (ACP), enfriamiento hasta temperaturas subcero, almacenamiento, descongelamiento y por último, dilución y remoción del ACP, retornando de esta manera a las condiciones fisiológicas. Dicho proceso somete a las muestras biológicas a una serie de cambios térmicos y biofísicos significativos. Los cambios de temperatura se deben principalmente a las condiciones de transferencia de calor impuestas durante el enfriamiento y calentamiento, mientras que los cambios biofísicos son generados por la adición de los ACPs y por el cambio de fase del medio

durante el proceso. Todos ellos afectan la viabilidad celular mediante mecanismos de daño osmótico y de formación de hielo intracelular [6, 35].

Actualmente existen dos estrategias para la criopreservación efectiva de células o tejidos: enfriamiento lento convencional con congelamiento y vitrificación [34, 38, 44].

Muchos son los factores que afectan la criopreservación de células eucariotas, incluyendo el tipo celular, su tamaño, fase y velocidad de crecimiento, composición de los medios utilizados, temperatura de incubación, pH, densidad celular al congelar, velocidad de enfriamiento, temperatura de almacenamiento, velocidad de descongelamiento y medio de recuperación. Sin embargo, uno de los factores más importantes es la composición de la solución de criopreservación. Muchas estrategias para el almacenamiento a largo plazo y preservación de material biológico están basadas en la utilización de diferentes ACPs [42].

### **1.1.3) Agentes crioprotectores**

El primer paso al llevar a cabo cualquier protocolo de preservación es a menudo la carga de un ACP en la muestra biológica [29]. Agente crioprotector es el término funcional utilizado para describir cualquier aditivo químico que pueda proporcionarse a las células previo al congelamiento o vitrificación para generar protección durante el proceso, de manera de obtener un aumento en la supervivencia final respecto a aquella obtenida en su ausencia [21, 23]. Son necesarios ya que inhiben la formación de cristales de hielo intra y extracelulares evitando de esa manera, la muerte celular [10]. La eficacia de la acción de un ACP se relaciona con muchas variables y requiere la satisfacción de ciertas propiedades, como por ejemplo ser altamente soluble en agua, incluso a bajas temperaturas, de manera disminuir la temperatura de congelamiento, y poseer la menor toxicidad posible, de forma de poder ser utilizado en las concentraciones requeridas para ejercer su efecto protector.

Existe una considerable divergencia en cuanto a las clases de moléculas orgánicas con propiedades de ACPs, siendo los más comúnmente utilizados el dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, azúcares, polímeros y alcoholes [23].

El tiempo durante el cual los crioprotectores penetran dentro del tejido/ célula es conocido como “tiempo de equilibrado”. El éxito de un protocolo en particular suele estar influenciado por el tipo y concentración de ACP. El tiempo de equilibrado y el rango de temperatura en el que se carga el ACP deben ser cuidadosamente controlados [29].

Durante el congelamiento, los ACPs forman enlaces de hidrógeno con el agua, permitiendo mantener el estado líquido a menores temperaturas. Además, la concentración iónica neta de las sales presentes en el interior celular y potencialmente perjudiciales, se ve reducida ante la presencia de un ACP. Asimismo las proteínas, especialmente aquellas de la membrana plasmática, se estabilizan mediante interacciones electrostáticas.

Los ACPs pueden clasificarse en dos grupos fundamentales:

- a) Permeantes, capaces de atravesar la membrana plasmática e ingresar a la célula. Son de bajo peso molecular y poseen propiedades anfipáticas. Los más conocidos y utilizados son el DMSO y el glicerol.
- b) No permeantes o extracelulares, de alto peso molecular, tales como azúcares y polímeros.

Aquellos permeantes proporcionan un efecto de dilución para el citoplasma, reduciendo la concentración de electrolitos y creando las condiciones apropiadas para la remoción de agua intracelular a bajas temperaturas de manera de evitar la formación de cristales de hielo. Por ello, son muy efectivos en la disminución del daño celular en sistemas biológicos preservados por enfriamiento lento [6, 21, 43].

Los ACPs extracelulares, proveen un efecto coligativo solamente en el espacio extracelular y operan principalmente incrementando la osmolalidad de la solución extracelular, de manera que las células se deshidraten antes de congelarse. El congelamiento en este caso será más difícil de iniciar ya que una mayor osmolalidad conducirá a una temperatura de congelamiento más baja [28, 40, 52].

El ACP debe proporcionar una protección múltiple en un rango variado de sitios durante el congelamiento de las células. Los mecanismos de acción no están aún completamente explicados pero se los relaciona con interacciones intermoleculares con macromoléculas biológicamente importantes y, en algunos casos incluso, secuestro de radicales libres. Esta complejidad es la razón principal por la cual algunos químicos orgánicos son más exitosos que otros de estructura similar (pero no idéntica).

A pesar de su efecto protector, altas concentraciones de ACP pueden inducir lesiones celulares mediante efectos tóxicos directos. La naturaleza de la toxicidad química es inevitablemente compleja, dados los diversos rangos de estructuras moleculares que presentan los agentes comúnmente utilizados. Aunque la mayoría son relativamente inocuos, existe un efecto apreciable dependiente del tiempo y la temperatura. Además, tanto la adición como la remoción/ dilución del ACP pueden representar una fuente de estrés osmótico letal, como es el caso de cualquier ACP permeante (principalmente glicerol y DMSO). Para minimizar esos efectos, se deben limitar los tiempos de exposición de las células al ACP, antes del congelamiento y luego del descongelamiento [6, 23, 28].

#### *1.1.3.i) Dimetilsulfóxido*

En los protocolos utilizados actualmente, el ACP estándar es el DMSO, un solvente polar aprótico. Su efecto protector está basado en su alta tasa de penetración a través de la membrana plasmática y en la formación de un gran número de enlaces de hidrógeno con moléculas del líquido celular, lo que ocasiona una menor probabilidad de formación de hielo intracelular así como una reducción del efecto nocivo de la concentración de sales en el interior de la célula a bajas temperaturas [10, 37].

A pesar de sus propiedades protectoras, el DMSO presenta efectos tóxicos sobre las células, por lo que es de gran relevancia la selección cuidadosa de la concentración a utilizar, así como el tiempo y temperatura de agregado y remoción del mismo, a fin de minimizar sus efectos nocivos. El enfriamiento debe comenzar lo más pronto posible luego de su adición, siendo importante además la velocidad de agregado del mismo

[37, 53]. Es necesario también removerlo rápidamente luego de descongelar las muestras [27].

#### **1.1.4) Vitrificación**

Al realizar el enfriamiento de una solución, si el agua es capaz de alcanzar temperaturas de aproximadamente  $-138\text{ }^{\circ}\text{C}$  sin formación de cristales, ocurre entonces una transición a fase vítrea y el agua permanecerá en un estado de sólido amorfo mientras sea mantenida a una temperatura menor a la de transición. Esto es lo que se conoce como vitrificación. La viscosidad del vidrio es tan alta que la relajación y la difusión intermoleculares no ocurrirán en las escalas de tiempo ordinarias; los cristales no se forman, debido a que las moléculas ya no se encuentran libres de acomodarse en una estructura cristalina. Además, las reacciones químicas necesarias para la degradación celular, se vuelven prácticamente imposibles. La transición a fase vítrea se da a tasas de enfriamiento extremadamente elevadas; las mismas pueden obtenerse minimizando el volumen de la solución a vitrificar, utilizando contenedores de células en suspensión especialmente diseñados, como por ejemplo crioloops, criotops, entre otros. Para menores velocidades de enfriamiento, la concentración de ACP utilizada debe ser lo suficientemente elevada como para inhibir la formación y crecimiento de los cristales de hielo. El problema aquí es que tales concentraciones resultan ser tóxicas para las células; incluso el estrés osmótico asociado a la adición y remoción de tales cantidades de ACP puede ser letal [21].

Más aún esta técnica requiere de habilidades especiales y no es adecuada para la preservación de grandes cantidades de células.

#### **1.1.5) Congelamiento convencional o enfriamiento lento**

El enfriamiento lento es una metodología de criopreservación en la cual las muestras son enfriadas de manera controlada. Brevemente, el proceso consiste en la carga de la muestra con un ACP y la disminución de la temperatura a velocidad constante hasta alcanzar la temperatura final pre-establecida, seguida del almacenamiento en nitrógeno líquido ( $\text{N}_2\text{L}$ ). Cuando se requieran, las muestras podrán ser descongeladas mediante un calentamiento rápido o lento, dependiendo del tipo

celular. Inmediatamente después del descongelamiento debe removerse el ACP, siendo cruciales tanto el tiempo como la temperatura a la cual se realice este paso.

La velocidad de enfriamiento determina el destino del agua intracelular durante el congelamiento, afectando directamente el tamaño y número de cristales intracelulares formados [47, 50].

Este método es el más adecuado para gran cantidad de muestras y no requiere de un entrenamiento especial para realizarse, siendo sólo necesario el control cuidadoso de las condiciones de enfriamiento, de manera de establecer un protocolo adecuado para asegurar la máxima viabilidad y funcionalidad de las muestras luego de la preservación [29]. Es actualmente el procedimiento más utilizado para el almacenamiento de una gran variedad de tipos celulares. Si el enfriamiento lento se lleva a cabo sin sembrado de cristales, la formación de hielo ocurrirá espontáneamente, a distintos puntos durante el proceso [47].

Cada tipo celular varía enormemente en cuanto a su capacidad para sobrevivir al proceso de criopreservación, siendo las razones de ello muy numerosas aunque los factores más importantes incluyen tamaño, forma, permeabilidad de la célula al agua y al ACP. Los mismos determinarán el grado de penetración del agente crioprotector previo al congelamiento y la velocidad a la cual se perderá el agua de la célula durante el enfriamiento. Por su parte, esto definirá la extensión del hielo intracelular formado [47].

No solamente el tipo celular a ser preservado es un factor importante, sino también el estado de los mismos. El hecho de que las células se preserven como suspensiones de células aisladas, como pequeños grupos de células, en láminas o como una porción completa de tejido puede influenciar en la supervivencia luego del descongelamiento. El congelamiento de suspensiones celulares, tiene como ventaja el rápido equilibrado del agente crioprotector entre el medio intracelular y el extracelular [47].

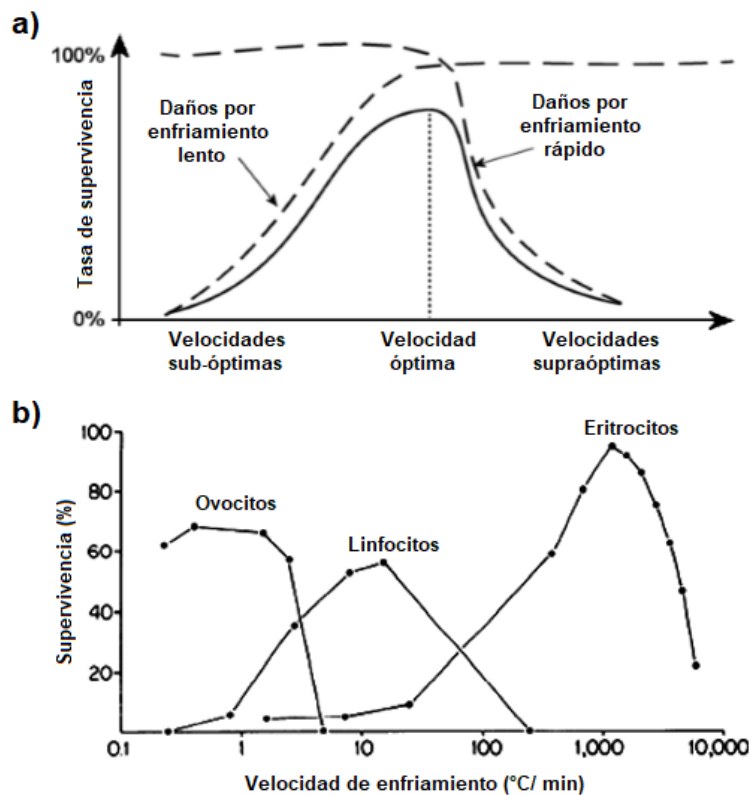
1.1.5.i) *Eventos durante el congelamiento. Dependencia de la supervivencia celular con la velocidad de enfriamiento y la concentración de ACP*

Cuando una muestra biológica es congelada justo por debajo de los 0 °C no habrá formación de hielo debido a la presencia de solutos; a medida que las células continúan enfriándose, entre -5 °C y -15 °C, comienza la formación de hielo, preferentemente en el exterior celular. La formación del hielo extracelular secuestra agua y la remueve de la solución, cambiando abruptamente la concentración de la parte no congelada. Esto crea un gradiente osmótico a través de la membrana plasmática, ocasionando la salida de agua desde las células, hacia el medio extracelular.

Debido a que el flujo es dependiente del tiempo, hasta alcanzar el equilibrio y el cese de la difusión a bajas temperaturas, lo que suceda posteriormente depende de la velocidad a la cual las células estén siendo enfriadas. Si se realiza lentamente, el agua continuará siendo arrastrada hacia el exterior y los cristales de hielo extracelular continuarán aumentando su tamaño, las células se deshidratarán y aumentará la concentración del contenido intracelular. Cuanto menor sea la velocidad, mayores serán la deshidratación y la concentración en el interior. Esa concentración puede alcanzar niveles tóxicos o incluso letales, siendo este el principal factor causante de daños en el enfriamiento lento. Independientemente de los mecanismos específicos, la viabilidad celular decrece a medida que lo hace la velocidad de enfriamiento [28, 47, 52].

A tasas de enfriamiento elevadas, las células no son capaces de perder agua lo suficientemente rápido como para mantener un equilibrio; entonces se irán superenfriando y, eventualmente, alcanzarán el equilibrio aunque a costa de la formación de hielo intracelular, perjudicial para las células. A medida que la velocidad de enfriamiento aumenta, los cristales formados serán de menor tamaño. Por lo tanto, a una velocidad lo suficientemente alta, los cristales formados serán tan pequeños que las células podrán tolerar su presencia; a partir de ese punto, la viabilidad se incrementará cuanto mayor sea la velocidad. A velocidades sumamente altas, la formación de hielo se evita completamente y la solución se vitrifica [28, 47].

La velocidad de enfriamiento óptima para un tipo celular determinado será aquella que asegure la máxima supervivencia luego del proceso congelamiento/descongelamiento. Para ello, la deshidratación del volumen celular deberá darse en una cantidad justa [52]. El gráfico de viabilidad en función de velocidad de enfriamiento (Figura 1a), adopta en la mayoría de los casos la forma de una U invertida, reflejando que hay una velocidad óptima de enfriamiento para obtener la mayor supervivencia celular posible; la misma será diferente para distintos tipos celulares (Figura 1b). Es importante destacar que la supervivencia es una función de varios parámetros, principalmente, la permeabilidad hidráulica de la membrana y la composición de la solución de criopreservación [28, 39].



**Figura 1. a)** Perfil de supervivencia hipotético según el modelo de daño actualmente aceptado (Adaptado de Karlsson & Toner, 1996 [30]); **b)** Sobrevida vs. velocidad de enfriamiento para 3 tipos celulares preservados a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  en DMSO 0.7 – 1 M. (Adaptado de Mazur, 1984 [39])

Durante el proceso de congelamiento/ descongelamiento la membrana celular está sujeta a diferentes tipos de estrés, incluyendo térmico, mecánico, osmótico y perturbaciones eléctricas que pueden llevar a respuestas de lisis por expansión del volumen y/ o pérdida de la capacidad de respuesta osmótica. Tanto la disminución de la

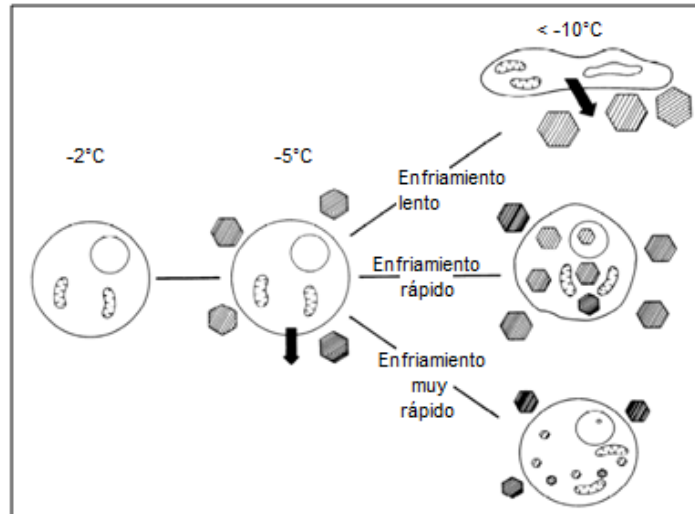


temperatura per se (daño y shock por frío) como la formación de hielo pueden resultar en una transición de fase de la membrana. Estas transiciones son consecuencia de la deshidratación más que de la exposición a temperaturas subcero en sí [52].

#### 1.1.5.ii) Destino del agua intracelular durante el congelamiento

Los principales eventos físicos que ocurren en las células durante el congelamiento se representan esquemáticamente en la Figura 2. Por debajo de los -5 °C, las células y el medio circundante permanecen sin congelarse debido al sobreenfriamiento y a la depresión en el punto de fusión ocasionada por los solutos protectores presentes. Entre -5 y -15 °C, el hielo se forma en el medio extracelular (espontáneamente o como resultado del sembrado de un cristal de hielo en la solución), pero el contenido celular permanece descongelado y sobreenfriado, posiblemente debido a que la membrana bloquea el crecimiento de cristales en el citoplasma. El agua sobreenfriada del interior celular tiene, por definición, un potencial químico más elevado al del agua en la solución extracelular parcialmente congelada; como respuesta a esa diferencia, el agua fluye hacia afuera de la célula y se congela.

Los eventos físicos subsecuentes en la célula dependen de la velocidad de enfriamiento utilizada. Si la misma es suficientemente baja (Figura 2 superior derecha; Enfriamiento lento), la célula es capaz de perder agua rápidamente para concentrar los solutos intracelulares de manera de eliminar el sobreenfriamiento y mantener el potencial químico del agua intracelular en equilibrio con el del agua extracelular. El resultado final en este caso es la deshidratación de la célula, evitando la formación de hielo intracelular. Si la célula se enfría rápida o muy rápidamente (Figura 2 medio e inferior derechos; Enfriamiento rápido o muy rápido), no es capaz de perder suficiente cantidad de agua para mantener el equilibrio; entonces, se sobreenfría cada vez más y finalmente logra el equilibrio, aunque a expensas del congelamiento intracelular [39].



**Figura 2.** Esquema de los eventos físicos en las células durante el congelamiento. Los hexágonos con líneas cruzadas representan cristales de hielo (Adaptado de Mazur, 1984 [39]).

#### 1.1.5.ii.a) Aspectos fisicoquímicos de la formación de cristales de hielo.

Bajo condiciones isotónicas, el agua de los tejidos biológicos se vuelve termodinámicamente inestable a temperaturas por debajo de los 0 °C y tiende a cristalizar. Durante la cristalización, la porción de la solución remanente en estado líquido es excluida de la matriz cristalina y se torna cada vez más concentrada. Dicho incremento en la concentración disminuye el punto de fusión de la solución remanente. El proceso continúa hasta que se establece un equilibrio termodinámico entre el estado cristalino y la solución. Por lo tanto, la cantidad de cristales formados a una temperatura dada depende de la composición inicial de la solución [6].

Bajo ciertas condiciones, la formación de hielo depende de fenómenos cinéticos más que de restricciones termodinámicas. Efectivamente, la formación de hielo en un estado superenfriado, situación termodinámicamente estable, puede iniciar el proceso masivo de agregación instantánea de las moléculas de agua a partir de la cual los cristales de hielo se propagan en la solución; este proceso se conoce como “superfusión” [6].

Así, la cristalización se torna una preocupación central a tener en cuenta durante la criopreservación de muestras biológicas. La misma puede, sin embargo, controlarse

incrementando la viscosidad de la fase líquida y utilizando velocidades de enfriamiento relativamente elevadas [6].

#### *1.1.5.ii.b) Efectos biofísicos de la formación de hielo*

La cristalización, especialmente extracelular, juega un papel determinante durante la criopreservación de células y modifica el entorno químico, generando estrés mecánico en las membranas celulares y deformándolas, induciendo de esa manera la cristalización intracelular [6]. Dentro de los efectos biofísicos responsables de la cristalización, se destacan:

*Deshidratación celular.* Es la principal consecuencia de la formación de cristales de hielo en el espacio extracelular [6].

*Estrés mecánico.* Por retención de las células en canales de líquido residual [6].

*Cristalización intracelular.* La formación de hielo extracelular parece estar directamente implicada en la inducción de la cristalización intracelular [6].

*Shock térmico.* Un cambio brusco de temperatura durante el enfriamiento puede causar lesiones a las células, incluso en ausencia de cristales de hielo. Ocurre esencialmente entre 37 y 15 °C y también entre 0 y -80 °C [6].

*Efectos biológicos de la formación de hielo.* El estrés químico, mecánico y térmico perturban las funciones biológicas de las células. Aunque se produzca la suspensión de las reacciones metabólicas a temperaturas criogénicas, que conservan las muestras de forma indefinida, las fases del congelamiento y descongelamiento en sí pueden ser nefastas; los mecanismos que ocasionan la lesión de células y tejidos en sí no son comprendidos por completo [6].

Otro tipo de injurias de naturaleza no mecánica son la inducción de la formación de burbujas de gas en los espacios intracelulares y los efectos osmóticos ligados a la fusión de los cristales de hielo durante el descongelamiento. Sin embargo, dichos cristales de hielo serán inofensivos si su tamaño es correctamente controlado [6].

### 1.1.5.iii) Lesiones por congelamiento lento

A bajas velocidades de enfriamiento, las principales lesiones se deben a la concentración letal de electrolitos a la cual son expuestas las células. Como esos electrolitos están presentes tanto fuera como dentro de las células, sus concentraciones inevitablemente crecerán a medida que aumente la cantidad de hielo formado extracelularmente. Este tipo de injuria se conoce como *daño por solutos* o *efecto soluto* y se ve agravado por la deshidratación celular, capaz de ocasionar daños a la membrana celular [21].

Otra causa de crioinjurias en estas condiciones se da por:

- interacciones mecánicas entre las células y los cristales de hielo extracelular debido a la expansión ramificada del mismo.
- estrés mecánico generado por contracción celular.
- desestabilización de las membranas y proteínas a bajos potenciales hídricos. [6, 54].

### 1.1.5.iv) Lesiones por congelamiento rápido

A altas velocidades de enfriamiento, existen correlaciones evidentes entre las lesiones celulares y la formación de hielo intracelular. Lesiones de origen mecánico aparecen a nivel de la membrana plasmática o de las membranas de organelas. El daño celular por formación de hielo intracelular no es ampliamente comprendido, pero es evidente que su formación conduce a la muerte de las células. [6, 21].

#### 1.1.5.iv.a) Recristalización del hielo intracelular

Aunque un enfriamiento rápido ocasiona formación de hielo intracelular, los cristales tienden a ser pequeños y hasta a veces, imperceptibles. Sin embargo, estos son termodinámicamente inestables y tenderán a agregarse durante el descongelamiento, formando cristales de mayor tamaño y ocasionando daño celular. Cuanto menor sea la velocidad de calentamiento, más favorable será la recristalización y mayor será el daño ocasionado a las células [39].

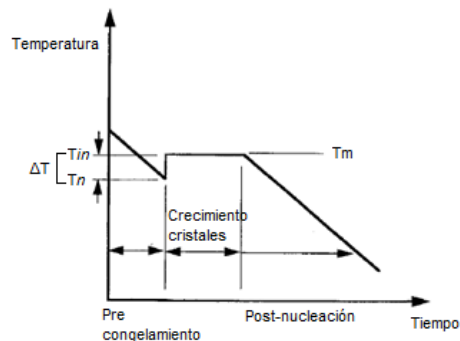
### 1.1.5.v) Rol de la permeabilidad de la membrana en la respuesta al congelamiento

La respuesta de un sistema biológico al congelamiento depende críticamente de las propiedades de su membrana plasmática: la estructura de su superficie permite a las células sobreenfriarse y probablemente determina la temperatura de nucleación de hielo. Esta temperatura junto con la permeabilidad de la membrana al agua y al ACP son las principales determinantes de que las células se equilibren por deshidratación o de que se forme hielo intracelular.

Otro factor relevante para la descripción del transporte de agua en las células es la fracción de volumen osmóticamente inactivo, es decir, la fracción de sólidos y agua dentro de las células que no se encuentra disponible para ser transportada fuera de la misma durante la deshidratación. Es una propiedad celular estática independiente, única para cada tipo celular [28, 39].

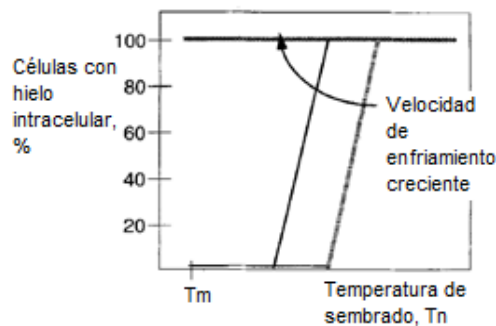
### 1.1.5.vi) Rol del superenfriamiento

Para muestras congeladas a velocidad controlada, la evolución de la temperatura de las mismas en función del tiempo puede representarse como se muestra en la Figura 3. La historia térmica de las células puede dividirse en tres regiones: (1) pre-congelada; (2) crecimiento rápido de cristales, asociado a la liberación del calor latente de fusión; y (3) post-nucleación. El superenfriamiento de la solución ( $\Delta T$ ) es la diferencia entre la temperatura a la cual la solución funde ( $T_{in}$ ) y la temperatura a la que se forma hielo extracelular ( $T_n$ ).



**Figura 3.** Historia térmica de una muestra durante el congelamiento. La muestra es enfriada y permanece en estado líquido hasta la temperatura de sembrado, a la cual se forma hielo extracelular. La segunda etapa involucra la liberación del calor latente de fusión, asociado con el crecimiento rápido de los cristales presentes luego de la nucleación. Por último, se continúa el congelamiento de la muestra (Adaptado de Hubel, 1997 [28]).

Como se describió previamente, la formación de hielo en la solución extracelular está acoplada a cambios significativos en el ambiente extracelular. La temperatura a la cual se produce el cambio juega un rol importante en la determinación de la concentración extracelular y de la respuesta biológica de las células. La permeabilidad de la membrana al agua disminuye cuanto menor sea la temperatura. Así, a valores bajos de  $T_n$  (altos  $\Delta T$ ) la fuerza motriz para el transporte de agua será más alta, aunque la permeabilidad de la membrana será menor. Como resultado, para células congeladas a igual velocidad y con la misma solución de criopreservación, la fracción de hielo intracelular aumentará (Figura 4) con el incremento del superenfriamiento [28].



**Figura 4.** Influencia del superenfriamiento en la probabilidad de formación de hielo intracelular (FHI) durante el congelamiento a mayores velocidades de enfriamiento. Para una velocidad dada, la probabilidad de FHI aumenta a medida que la temperatura de sembrado disminuye (Adaptado de Hubel, 1997 [28]).

#### 1.1.5.vii) Proceso de descongelamiento

Durante el descongelamiento, las células se van rehidratando a medida que el hielo se funde. El daño letal por hielo intracelular se da mediante la recrystalización, al descongelar las células. Por lo tanto, para aquellas células que presenten cristales de hielo en su interior, un descongelamiento lento resultará nocivo [21, 28].

Cuanto más rápidamente sean calentadas las células al descongelarlas, mayor será la tasa de supervivencia [21]. Generalmente se realiza un descongelamiento rápido a 37 °C [53].

## **1.2) CELULAS MADRE**

Las células madre son “células maestras” indiferenciadas, que dan origen a todos, casi todos o múltiples tipos celulares específicos del cuerpo, según su potencialidad [42]. Una célula madre presenta tres características importantes: 1) capacidad de auto-renovación, es decir, de dividirse realizando copias idénticas de ella misma; 2) grado de potencialidad o capacidad de generar diferentes tipos celulares; 3) habilidad para generar/ regenerar el tejido u órgano del que proviene [2, 22, 26].

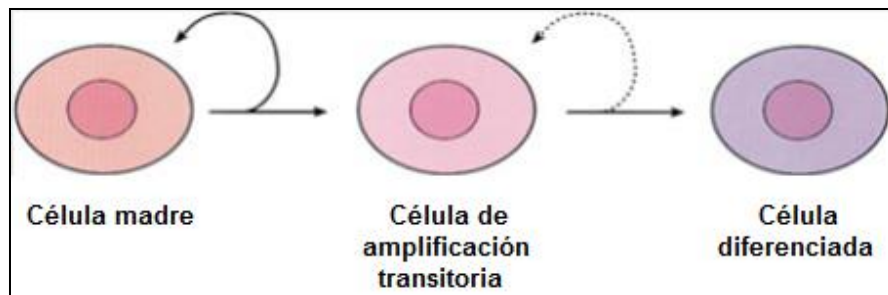
Existen dos tipos básicos de células madre:

- \* Células madre embrionarias (CMEs) que derivan de la masa celular interna del blastocito, son pluripotentes y no presentan limitaciones en cuanto a un destino particular sino que pueden diferenciarse a cualquier tipo celular. Existen también CMEs multipotentes, capaces de originar todos los tipos celulares del tejido del que provienen [3, 14].
  
- \* Células madre adultas, que residen en nichos regulatorios específicos de órganos y tejidos adultos, mantenidas bajo un estricto control del crecimiento. Presentan capacidad de auto-renovación pero sus opciones son más restringidas, pudiendo seguir solamente algunas vías de diferenciación; son multipotentes [2, 22, 46, 58].

### **1.2.1) Células madre embrionarias**

Las células madre embrionarias son pluripotentes, en cuanto al hecho de que puede dar origen a cualquier célula del organismo, exceptuando los trofoblastos de la placenta [24]. Poseen además, el potencial para sanar un amplio rango de enfermedades, desde diabetes y enfermedades cardíacas, hasta injurias y daños neurológicos; de ahí su creciente importancia e interés tanto en investigación como para posibles aplicaciones en medicina regenerativa [22].

Generalmente son de división lenta y pueden responder a señales ambientales específicas para generar nuevas células madre o seguir un programa de diferenciación particular, mediante la siguiente secuencia: de células madre pluripotentes a multipotentes, luego a células precursoras y por último, diferenciadas en los fenotipos maduros de los tejidos. Cuando adoptan un compromiso a diferenciarse, entran en un estado transitorio de proliferación rápida; luego del agotamiento de ese potencial proliferativo, salen del ciclo celular y ejecutan el programa de diferenciación (Figura 5) [22, 54].



**Figura 5.** Las células madre se renuevan y se diferencian para dar lugar a células de amplificación transitoria y células completamente diferenciadas (Adaptado de Fuchs & Segre, 2000 [22]).

### **1.2.2) Células madre neurales**

En el sistema nervioso, las células madre neurales (CMNs) son células primordiales multipotentes, no comprometidas, definidas por su capacidad para: (1) diferenciarse en células de todos los linajes neuronales (múltiples subtipos de neuronas, oligodendroglía y astrogía) en diversos contextos regionales y del desarrollo; (2) auto-renovarse, dando origen a más CMNs con potencial similar; y (3) poblar regiones del sistema nervioso central en desarrollo o que sufran daños o lesiones [1, 18, 20, 48, 55].

Son las células más primitivas del sistema nervioso central (SNC). Su importancia en el mantenimiento del desarrollo y la homeostasis del tejido nervioso es esencial, dado que la mayoría de las células neurales son muy especializadas y sensibles a los cambios a su alrededor, como ser condiciones de oxígeno o moléculas citotóxicas [16]. Se generan durante el desarrollo (y a lo largo de la vida del organismo en algunas regiones) mediante el proceso de neurogénesis y, debido a que las células



maduras del SNC no se multiplican, pueden diferenciarse para reemplazar neuronas o incluso células gliales perdidas o dañadas [3, 46].

Las CMNs constituyen una población heterogénea de células mitóticamente activas que se definen por su capacidad para realizar las siguientes tareas específicas: (1) proliferación dependiente de factores de crecimiento, (2) activación de programas genéticos del desarrollo, (3) capacidad de control transcripcional/ traslacional de la auto-renovación, (4) interacción con la matriz extracelular y migración, (5) regulación del número de células y (6) resistencia al estrés [16, 48].

### **1.3) Una visión general del desarrollo cerebral durante la embriogénesis**

El SNC de vertebrados consta de cientos de tipos celulares, que proveen la diversidad necesaria para la formación y establecimiento de los circuitos neuronales; dicha diversidad es alcanzada mediante la diferenciación regulada de células madre neurales multipotentes. Tal regulación sistemática asegura que las células madre satisfagan las necesidades del organismo durante el crecimiento, o en respuesta a una lesión [12].

Entre los tipos celulares que conforman el SNC se destacan mayoritariamente cuatro: neuronas, oligodendrocitos productores de mielina, astrocitos y células del revestimiento ependimario del lumen central [32, 60]. Todos ellos son generados durante el desarrollo, a partir de una capa de células neuroepiteliales citológicamente indistintas y sin restricciones en su potencial, ubicadas a lo largo de la línea media dorsal del embrión o placa neural. La misma sufre una serie de movimientos morfogénicos (invaginación) hasta formar el tubo neural que representa la base para el posterior desarrollo del cerebro anterior, medio y posterior, y una delgada porción posterior que dará origen a la médula espinal [32, 57]. A medida que el tubo neural madura, la arquitectura celular se vuelve estratificada y las CMNs no comprometidas se encuentran en la lámina ventricular, próximas al lumen, mientras que las células post-mitóticas migran radialmente hacia la superficie cerebral. Esta organización es mantenida durante la embriogénesis de forma tal que las células en proliferación se encuentran en las zonas germinales que recubren los ventrículos y la descendencia

madura migra para alcanzar sus destinos finales. El mismo principio aplica para otras regiones del cerebro [9, 22].

Un número preciso de precursores, aunque no todos, se diferenciará de manera sucesiva en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. La médula espinal formada a partir de la región caudal del tubo neural, es uno de los primeros sitios de diferenciación neuronal [41].

### **1.3.1) Inducción del neuroectodermo.**

La diferenciación neuronal o neurogénesis es un evento temprano en la embriogénesis de mamíferos, que ocurre poco después de la diferenciación de la capa germinal [31]. Es ante todo un proceso de desarrollo que implica proliferación, migración y diferenciación de las células madre primordiales del SNC [45]. En tal proceso, participan factores de crecimiento mitogénicos, como el factor de crecimiento básico fibroblástico (bFGF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF). El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un mitógeno poderoso de numerosas células no nerviosas y también es importante en el SNC, debido a sus efectos mitogénicos y tróficos [4, 49].

Los eventos bioquímicos que conducen a la diferenciación o inducción del neuroectodermo, ocurren previo a la diferenciación celular [62]. Debido a la exposición diferencial a gradientes temporales y espaciales de morfógenos, el proceso no ocurre homogénea ni simultáneamente: se forma primero en la región de la cabeza y luego se extiende caudalmente para formar toda la placa neural. Luego, la placa neural comienza a plegarse y fusionarse dorsalmente en el área futura del cuello y se extiende rostral y caudalmente hasta formar el tubo neural completo, que más adelante da origen al sistema ventricular. La capa epitelial contiene las células madre que formarán neuronas y células gliales del SNC.

Por tanto, las células neuroepiteliales son espacial y temporalmente diferentes entre sí al momento en que la placa y el tubo neural son formados [31, 62]; se segregan en dominios rostro-caudales y dorso-ventrales al momento del cierre del tubo neural, y migran hacia sitios específicos del embrión, donde son destinadas a diferentes

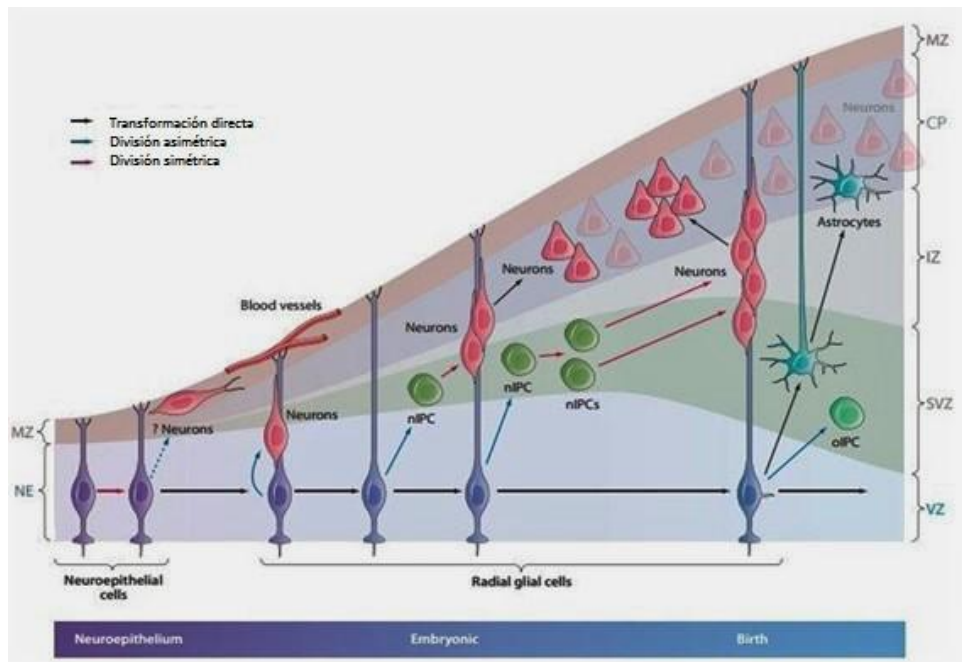
reservorios progenitores. El destino particular que adopten es influenciado por señales locales, transmitidas en parte por el tubo neural dorsal y en parte por la ruta de migración predestinada en cada célula [22, 62]. El desarrollo posterior en células maduras del SNC se regula de forma clara y precisa con diversos patrones de diferenciación [31].

### **1.3.2) Diferenciación de células neuroepiteliales.**

La diferenciación de las células neuroepiteliales es un pre-requisito y un paso clave para la generación de células neuronales y gliales. Inicialmente, el revestimiento neuroepitelial consiste en una capa de CMNs morfológicamente similares denominadas progenitores neuroepiteliales (PNEs). Las mismas se dividen simétricamente para enriquecer el reservorio de CMNs, permitiendo la expansión necesaria para ir construyendo el cerebro; o asimétricamente para generar la glía radial (GR), progenie con un potencial más limitado, capaz de generar las células maduras de los linajes neuronales y gliales. En esa división asimétrica generalmente se produce una célula madre y una neurona inmadura o una célula progenitora intermediaria (CPI); las neuronas inmaduras migrarán fuera de la zona ventricular y luego madurarán, mientras que las CPIs permanecerán en la zona subventricular (ZSV) donde continuarán dividiéndose, constituyendo un reservorio importante de neuronas a lo largo de la neurogénesis [9, 18, 31, 48]. El balance apropiado entre ambos tipos de divisiones es crucial para el mantenimiento de la población de CMNs y para prevenir el crecimiento tumoral ilimitado.

Se utiliza el término general célula madre neuronal (CMN) para referirse a células progenitoras primarias en diferentes etapas del desarrollo que inician linajes, que conducen a la formación de neuronas o glía. Estos productos finales sin embargo, no siempre se generan directamente, sino que pueden generarse a través de una o múltiples etapas de amplificación de los CPIs. Los mismos, pueden generar neuronas (CPI<sub>n</sub>) o células gliales, incluyendo oligodendrocitos (CPI<sub>o</sub>) y astrocitos (CPI<sub>a</sub>) (Figura 6) [33].

La complejidad de los mecanismos que regulan estos procesos va desde vías de señalización intercelulares hasta reguladores del ciclo celular y organelas como el centrosoma [12, 32].



**Figura 6.** Tres modelos de neurogénesis durante el desarrollo cortical. GR en la corteza genera neuronas (a) directamente mediante división asimétrica; (b) indirectamente por generación de nIPC y una ronda de amplificación; y (c) indirectamente a través de nIPC pero con dos rondas de división y amplificación adicional. CP, placa cortical; IZ, zona intermedia; MZ, zona marginal; nIPC, célula progenitora neuronal intermedia; RG, glía radial; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular (Extraído de Kriegstein & Alvarez-Buuylla, 2009 [33]).

### 1.3.3) Especificación de neuronas y glía a partir del neuroepitelio

Cada tipo celular se compromete a un destino laminar particular en la zona ventricular al momento de finalización del ciclo celular. Por lo tanto, es el tiempo de salida del ciclo el responsable de implementar los distintos eventos de compromiso. Existen complejos patrones de expresión, tanto de las señales de superficie celular como de los reguladores transcripcionales en el neuroepitelio en desarrollo que especifican la identidad regional de las diferentes áreas del sistema nervioso central [41].

Cada neurona en una localización dada del cerebro y la médula espinal acarrea un set único de transmisor(es) y establece conexiones con su(s) propio(s) blanco(s). Al mismo tiempo, neuronas con los mismos fenotipos transmisores residen en diferentes

regiones del SNC, ejerciendo distintas funciones. Es probable, por lo tanto, que la asignación de la identidad posicional y la especificación del fenotipo transmisor se den mediante procesos separados [62].

#### 1.3.3.i) Especificación de subtipos neuronales a partir de CMEs.

El nacimiento de un tipo neuronal es consecuencia de una interacción entre el programa intrínseco de las células precursoras y las señales extracelulares en un momento y lugar determinados. En etapas tempranas, los factores extracelulares parecen dictar la elección del destino de los precursores, mientras que en la especificación de los mismos y elección del linaje pasan a tener muy poca influencia; los progenitores esencialmente maduran siguiendo procesos intrínsecos [62].

#### 1.3.3.ii) Especificación de subtipos gliales a partir de CMEs.

Durante el desarrollo embrionario también son generadas las células gliales, es decir, astrocitos y oligodendrocitos. Estos últimos, poseen una capacidad mielinizante única. Los astrocitos son los tipos celulares más abundantes, distribuidos a lo largo del cerebro y la médula espinal, participando casi en cualquier aspecto relacionado a la fisiología del SNC. Poseen diferentes atributos funcionales en las distintas regiones en las que se encuentren. Dicha diferencia funcional pueden atribuirse a los perfiles moleculares producidos por los astrocitos específicos de cada región [62].

#### 1.3.3.iii) Primero neuronas, luego glía.

Durante el desarrollo, diferentes tipos de células neuronales aparecen en un orden preciso, característico de regiones y especies particulares. Generalmente, las neuronas surgen antes que la glía y los tipos específicos de cada célula poseen nacimientos particulares, como resultado de patrones temporales, aparentemente codificados en las células progenitoras además de la información posicional [56].

En la médula espinal, ambas poblaciones celulares derivan aparentemente de precursores comunes, siendo que su destino final depende de señales extrínsecas y de la activación de patrones transcripcionales específicos [31].

#### **1.4) Relevancia de las células madre**

Las células madre neurales son de gran valor para aplicaciones clínicas e investigaciones científicas [38]. El aislamiento de CMNs del cerebro en desarrollo y adulto ha transformado el conocimiento sobre el desarrollo del SNC y ha presentado nuevas alternativas para la medicina regenerativa [18].

##### **1.4.1) Aplicaciones clínicas potenciales**

En general, las CMEs humanas (CMEh), con capacidad de auto-renovarse y diferenciarse en todos los tipos celulares somáticos del cuerpo humano, son consideradas de un enorme potencial para aplicaciones clínicas en el campo de la medicina regenerativa, ofreciendo la posibilidad de terapias para el tratamiento de patologías en las que células específicas se encuentren degeneradas o dañadas debido a anomalías genéticas, enfermedad o injuria (por ejemplo diabetes o enfermedad de Parkinson) [17, 28].

Las células madre y progenitoras neuronales derivadas de fetos humanos y/ o de células madre embrionarias (CMEs), representan una fuente con gran potencial en el campo de trasplantes para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y daños neurotraumáticos tales como infarto cerebral y daño a la médula espinal. Estas células podrían incorporarse a los tejidos target y restablecer la funcionalidad del sistema nervioso dañado [44].

##### **1.4.1.i) Terapias regenerativas del SNC**

La muerte celular es característica en desórdenes agudos del SNC así como también en enfermedades neurodegenerativas [11, 61]. A pesar de que el cerebro intenta inicialmente la reparación de ciertos daños, como lo sugiere el aumento en la proliferación de las CMNs de la ZSV, es claro que estos mecanismos endógenos de reparación no son suficientes para alcanzar una recuperación funcional completa en muchos casos.

Las CMNs, al tener potencial para regenerar tejidos son por lo tanto, candidatas excelentes para terapias de reemplazo de células perdidas por daños o enfermedad [48].

#### 1.4.1.ii) Trasplante de CMNs

El trasplante de estas células puede ser útil para reemplazar células perdidas y restaurar las conexiones neuronales y la funcionalidad del tejido. Esto es particularmente importante en la enfermedad de Parkinson, donde la pérdida de neuronas dopaminérgicas conduce a una severa disfunción motora.

#### 1.4.1.iii) Trasplante de CMNs diferenciadas

Es una alternativa al trasplante directo de las células madre y representa una estrategia interesante para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. El hecho de diferenciar las células hacia progenitores celulares comprometidos *in vitro*, aumenta las posibilidades de obtener mayor cantidad de los tipos celulares deseados *in vivo*.

#### 1.4.1.iv) Trasplante de CMNs genéticamente modificadas

Es un enfoque terapéutico combinado en el cual las CMNs no solamente son utilizadas para reemplazo del tejido perdido, sino que también son aprovechadas como vehículos terapéuticos para administrar factores o proteínas donde el SNC falla [48].

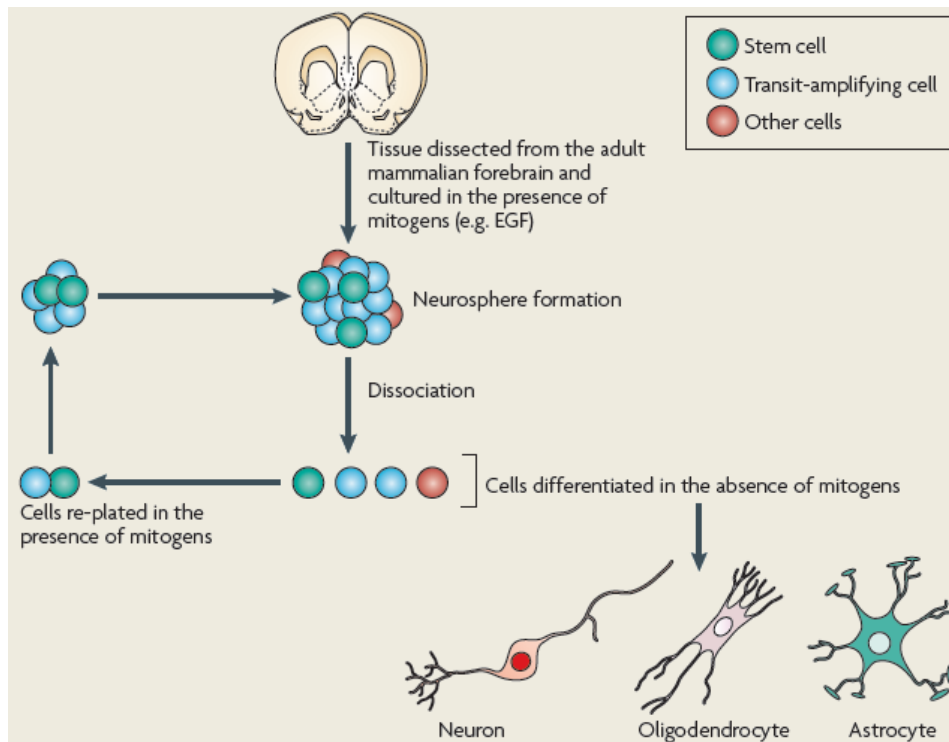
### **1.4.2) Utilización de CMNs en investigación**

El cultivo de células madre es una herramienta clave en la investigación básica y aplicada, especialmente en el campo de la medicina regenerativa [5].

Las CMNs son capaces de dividirse continuamente en cultivo, en medio libre de suero suplementado con distintos factores de crecimiento. Comúnmente se cultivan como agregados clonales de precursores neuronales indiferenciados en suspensión denominados neuroesferas (NEs). Estas NEs son estructuras celulares altamente dinámicas con diferentes gradientes de proliferación, supervivencia, apoptosis y fagocitosis, que contienen progenitores celulares en distintas etapas de diferenciación:

CMNs, células progenitoras y células diferenciadas embebidas en una compleja matriz extracelular tridimensional. Dichos progenitores exhiben morfología, tamaño y granulidad citoplasmática heterogénea, coexistiendo en diferentes fases del ciclo celular [48].

Las NEs pueden generarse a partir de varias estructuras del cerebro de mamíferos embrionarios o adultos [1, 57], mediante un método de cultivo denominado ensayo de neuroesferas (Figura 7). Brevemente, las CMNs son aisladas de la ZSV de ratón, la cual es seccionada, luego dissociada mecánica y enzimáticamente hasta obtención de una suspensión de células aisladas y estas, finalmente sembradas en presencia de mitógenos tales como EGF y FGF. Luego de una semana en cultivo en condiciones de proliferación (Pasaje 1), se obtienen las NEs.



**Figura 7.** Ensayo de neuroesferas. Representación esquemática del cultivo *in vitro* de neuroesferas (Extraído de Chojnacki et al, 2009 [13]).

Las NEs pueden ser disociadas y cultivadas nuevamente (Pasaje 2) en presencia de mitógenos generando más neuroesferas, demostrando de este modo la capacidad de auto-renovación y expansión de las CMNs. También pueden ser diferenciadas en ausencia de mitógenos, ya sea como NEs completas o como células aisladas, para



demostrar su multipotencia mediante la producción de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos [13, 25].

### **1.5) Limitaciones en el uso de CMNs**

Como se ha descrito anteriormente, las células madre y precursoras neuronales de varias áreas del cerebro son potenciales candidatas para investigación y trasplantes. Sin embargo, el suministro del tejido en condiciones adecuadas es uno de los principales problemas asociados con la aplicación generalizada de dichas técnicas.

La capacidad de almacenarlas de forma correcta y segura por períodos prolongados de tiempo, hasta el momento de su utilización ciertamente solucionaría este problema [44, 47]. Ante esto, la criopreservación o preservación a temperaturas subcero, permitirá el almacenamiento correcto y a largo plazo de las células, con las consiguientes ventajas:

- ✓ Clínicamente, las células podrán ser almacenadas por un paciente para su propio uso posterior, facilitando también la donación a otros pacientes.
- ✓ Teniéndolas almacenadas, se las puede distribuir y transportar, evitando el hecho de tener que sincronizar al paciente con su donante.
- ✓ Por otra parte, la posibilidad de almacenar células reducirá el desperdicio de aquellas que no puedan utilizarse al momento de su obtención.
- ✓ Posibilitará la recolección de células en distintos momentos para alcanzar las dosis requeridas, proporcionando además, tiempo para la realización de pruebas de seguridad y control de calidad.
- ✓ En el ámbito de la investigación científica permitirá archivar el material, repetir experimentos a partir del mismo material de partida y lograr colaboración en las investigaciones científicas [28, 42, 47, 54].

Es por ello que el desarrollo de protocolos de criopreservación eficientes podría facilitar significativamente el almacenamiento y transporte de las células para las aplicaciones deseadas [38].

El presente trabajo surge en base a una problemática particular y concreta, recurrente en el laboratorio de Biología Molecular y Celular de Lípidos del Instituto de Biología Molecular de Rosario (IBR). Una de las líneas de investigación del mismo, involucra el uso de células madre neurales embrionarias de origen murino y el congelamiento de las mismas en un freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Según lo expresado anteriormente, esta temperatura es no criogénica, por lo que probablemente ocurran procesos que deterioren las células. Esto, de hecho, se confirma a través de las observaciones experimentales de que, transcurrido un período de 30 días de preservación en el freezer, los rendimientos post-descongelamiento son prácticamente nulos. En base a lo expresado, se plantean los objetivos detallados a continuación.

# **OBJETIVOS**

## **2) OBJETIVOS**

### **2.1) Objetivo general**

Desarrollar un protocolo de criopreservación de líneas primarias de CMNEs mediante la técnica de enfriamiento lento, para su almacenamiento en Bancos y posterior utilización en investigaciones sobre terapia celular e ingeniería de tejidos.

### **2.2) Objetivos específicos**

- \* Ensayar el método de enfriamiento lento de CMNEs a diversas velocidades.
- \* Desarrollar protocolos de descongelamiento de las CMNEs preservadas por enfriamiento lento.
- \* Analizar los efectos de las diferentes metodologías sobre la viabilidad, recuperación, capacidad de proliferación y potencial de diferenciación de las CMNEs.
- \* Seleccionar la metodología que garantice la mejor recuperación, viabilidad y funcionalidad de las CMNEs post preservación y establecer en base a ello un protocolo definido.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3) MATERIALES Y METODOS

#### 3.1) Células madre neurales embrionarias (CMNEs)

##### 3.1.1) Obtención de CMNEs

La obtención de las CMNEs fue realizada por la Lic. Aneley Montaner en el laboratorio de la Dra. Claudia Banchio, en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR, CONICET). El procedimiento se realizó conforme al protocolo de trabajo evaluado previamente para el proyecto de investigación titulado “Fosfatidilcolina como estímulo de la diferenciación neuronal. Mecanismos moleculares subyacentes e impacto en la diferenciación de células madres neuronales” (Resolución nº 191/2014, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR).

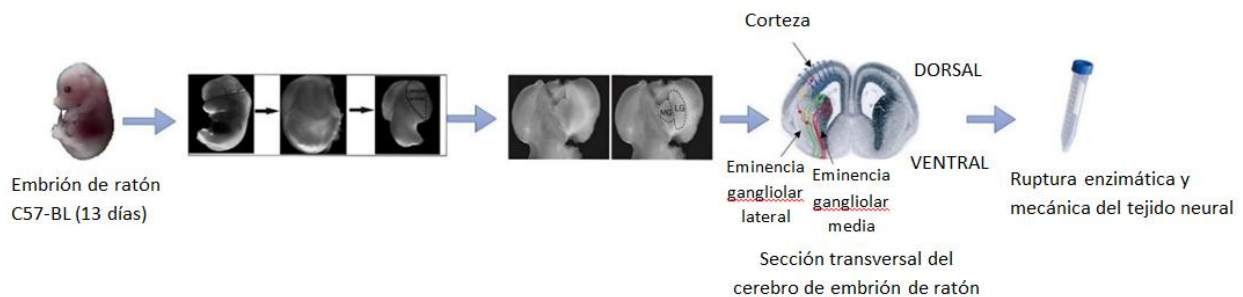
Las CMNEs fueron obtenidas a partir de embriones de ratón de la cepa C57/BL de 13 - 15 días de gestación, provistos por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR. El aislamiento de los embriones fue realizado en el Bioterio y luego se los transportó al IBR para la obtención de las células deseadas a partir de la corteza cerebral lateral. Las mismas fueron finalmente transportadas al CAIC en las condiciones apropiadas para su posterior procesamiento.

Medios de Cultivo:

- Para el aislamiento de las CMNEs y disgregación de las neuroesferas resultantes se utilizó Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose/ Ham's F12, en proporción 1:1 (Gibco 31600-034 y 21700-075, respectivamente), suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado (SFB, Natocor, Argentina).
- Para la proliferación de las CMNEs se utilizó DMEM High Glucose/ F12 en proporción 1:1, suplementado con B27 (suplemento mixto de vitaminas, Gibco 17504-044,50X), FGF (Sigma F0291, 10 ng/ µL) y EGF (Sigma E9644, 10 ng/ µL) [1].

### 3.1.2) Aislamiento de las CMNEs

El saco embrionario fue extraído a partir de un corte en el abdomen del ratón a los 13 - 15 días de gestación, aproximadamente. Este se conservó en Buffer Fosfato Salino (PBS, 0,01 M  $\text{PO}_4^{2-}$ , 0,138 M NaCl y 0,0027 M KCl) frío hasta llegar al lugar de trabajo (IBR), donde se retiraron los embriones contenidos en el mismo. A continuación, bajo la lupa (LEICA EZ4) y a través de un corte a la altura de los ojos, se retiró el cerebro y se procedió a limpiar y separar el mismo de las meninges (membranas muy delgadas que contienen capilares sanguíneos y protegen al encéfalo). Una vez obtenido el cerebro límpido se separaron los dos hemisferios. De cada uno de ellos, se retiró la eminencia, y se realizó una disección en la corteza, de manera de conservar la región lateral ubicada más próxima a la eminencia (Figura 8). Durante el aislamiento, las cortezas laterales fueron mantenidas en PBS estéril en un tubo falcon de 15 mL. Al finalizar el procedimiento se retiró el sobrenadante, se agregó 1mL de tripsina 0,05 % - EDTA 0,02 % y se incubó por 10 minutos en estufa a 37 °C, para la disgregación química del tejido. La tripsina fue luego inhibida por agregado de 1 mL de DMEM/ F12 suplementado con 10 % SFB, con la posterior realización de una disgregación mecánica, mediante la utilización sucesiva de micropipetas Eppendorf (de 1000 y 200  $\mu\text{L}$ ) y pipetas Pasteur de vidrio. La suspensión celular resultante se centrifugó a 200 g por 5 minutos. El precipitado obtenido fue sometido dos veces más al mismo procedimiento de ruptura mecánica, sin utilización de SFB en la última repetición. Finalmente el pellet de células fue resuspendido con 5 mL de medio DMEM/ F12, procediéndose a contar el número de células obtenidas mediante la cámara de Neubauer [36].



**Figura 8.** Aislamiento de las CMNEs. Ilustración esquemática de la disección de las eminencias ganglionar media (EGM) y ganglionar lateral (EGL) embrionarias. Adaptado de Kokaia, Henrik Ahlenius y de Zaal y Gotz (Ahlenius & Kokaia, 2010 [1]; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2011 [34]).

### **3.1.3) Evaluación de la viabilidad celular**

La viabilidad celular post-aislamiento y entre pasajes se determinó mediante el test de exclusión del colorante Azul tripán, basado en evaluar la integridad de la membrana plasmática como índice de viabilidad celular. Aquellas células cuya membrana plasmática esté intacta excluirán el colorante, mientras que las células dañadas permitirán su ingreso y captación, visualizándose de un color azul característico. Brevemente, se realizaron diluciones 1:10 o 1:50 de 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular en 0,4 % (p/ v) de solución y mediante una cámara de Neubauer se contaron células vivas (incolores) y muertas (azules); el % de células vivas fue calculado como:  $n^{\circ}$  células vivas/  $n^{\circ}$  células totales x 100.

A partir de los datos de viabilidad, fue calculado también el rendimiento de la criopreservación, expresado como:  $n^{\circ}$  células vivas obtenidas luego del descongelamiento/  $n^{\circ}$  células vivas inicialmente colocadas en cada experimento x 100.

### **3.1.4) Cultivo y proliferación de las CMNEs**

El cultivo de CMNEs fue realizado en suspensión: las células recién aisladas se sembraron a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células vivas en 5 mL de medio DMEM/ F12, suplementado con B27 50X en frascos CellStar (Greiner Bio-One, GmbH, cod.F010810) de  $25 \text{ cm}^3$  a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de 95 % aire/ 5 %  $\text{CO}_2$ , con 90 % humedad. Simultáneamente, se agregaron en los frascos los factores de crecimiento FGF (10 ng/  $\mu\text{L}$ ) y EGF (10 ng/  $\mu\text{L}$ ); cada tres/ cuatro días se repitió el agregado de los mismos, para asegurar su accesibilidad a las células. Al tercer día de cultivo es posible evidenciar la formación de pequeñas neuroesferas. Luego de 7 días en cultivo, las neuroesferas alcanzan un tamaño óptimo (150  $\mu\text{m}$  aproximadamente) y presentan apariencia y morfología normal, estando en condiciones para realizar el primer pasaje (disgregación de las neuroesferas) para su posterior proliferación o diferenciación en células nerviosas [36]. En caso de continuar en cultivo durante un tiempo mayor a siete días, el centro de las neuroesferas comienza a tornarse oscuro, según lo observado al microscopio, indicando una disminución de la viabilidad de las células que componen dicha neuroesfera. Tal suceso es ocasionado por problemas de difusión de oxígeno y



nutrientes hacia el interior de las neuroesferas, al aumentar demasiado el tamaño de las mismas.

#### **3.1.4.i) Evaluación de la proliferación de las CMNEs**

Se realizó un seguimiento del crecimiento de las neuroesferas en cultivo para evaluar el potencial de proliferación, a partir de la medición del diámetro de las mismas mediante microscopía.

En primer lugar, se tomaron fotos de los cultivos a los diferentes días de crecimiento, utilizando para ello una cámara Canon PowerShot A620 (4x) conectada a un microscopio invertido Olympus CK2 (10x). Se tomaron fotos de seis a diez campos al azar para cada día de cultivo. Este procedimiento se realizó para tres experimentos independientes.

Luego se procedió a medir el diámetro de todas las neuroesferas/ células madre presentes en cada campo mediante la utilización del software público ImageJ (National Institutes of Health; <http://imagej.nih.gov>) [59]. Como referencia en la definición de la escala y medición de los diámetros, se utilizó un micrómetro (Olympus OBM 1/100).

#### **3.1.5) Disgregación de las neuroesferas**

La suspensión de neuroesferas en crecimiento se recolectó en un tubo falcon de 15 mL y se centrifugó a 200 g por 6 minutos. El pellet remanente fue resuspendido en 1 mL de tripsina 0,05 % - EDTA 0,02 %, incubándose en estufa a 37 °C por 10 minutos. Luego se procedió a la inactivación de la tripsina mediante el agregado de 1 mL de DMEM/ F12 suplementado con SFB 10 % y se realizó una ruptura mecánica según el procedimiento descrito previamente para el aislamiento de las CMNEs, con la única excepción de que al precipitado final se lo resuspendió en medio DMEM/ F12 sin agregado de SFB. La viabilidad celular se determinó mediante el test de exclusión del colorante Azul tripán, conforme a lo descrito previamente. Las células madre neurales obtenidas (1° pasaje) fueron utilizadas para realizar los experimentos planificados, o fueron cultivadas nuevamente para su expansión (2° pasaje), siguiendo el protocolo descrito previamente. La tasa de proliferación de las células del 2° pasaje es mucho

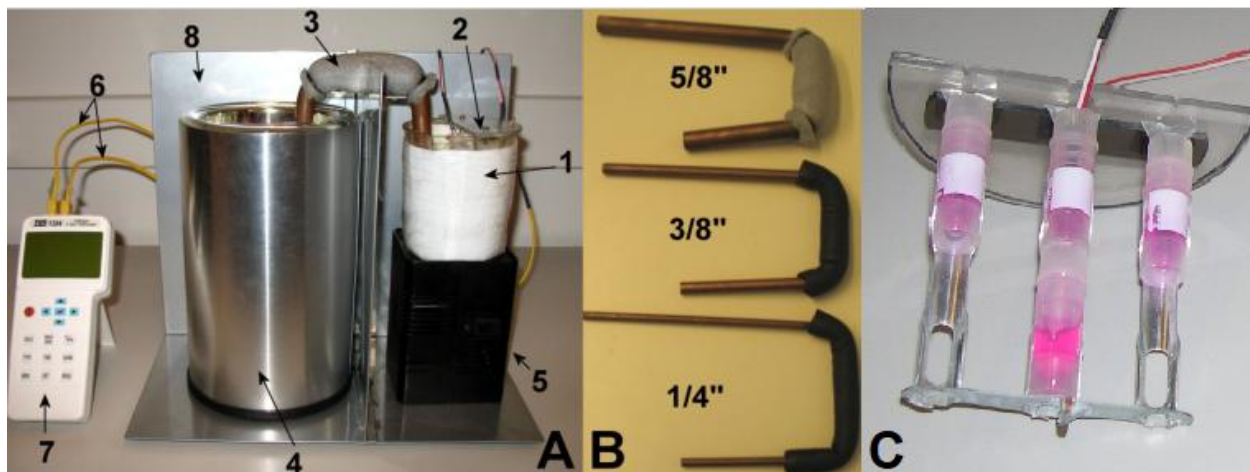
mayor a la de las células frescas (recién aisladas), requiriendo un tiempo no mayor a 4 - 5 días en cultivo para alcanzar el tamaño de neuroesferas óptimo [36].

### **3.2) Criopreservación de CMNEs**

#### **3.2.1) Enfriamiento lento y almacenamiento de las CMNEs**

Para el congelamiento de las CMNEs, se utilizó un dispositivo desarrollado en nuestro laboratorio que permite el enfriamiento lento de las células, a una temperatura controlada y constante, hasta alcanzar los -80 °C y poder almacenarlas luego a -196 °C, en nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>L).

El equipo utilizado (Figura 9) consta de: un termo Dewar (cat. 8621/6099, POPE Scientific, Inc. Saukville, MI, USA) de 1900 mL que contiene el medio refrigerante, una cámara de enfriamiento conteniendo el medio intercambiador de calor (HEM, del inglés Heat Exchange Medium) y un contenedor de muestras, un agitador magnético, una barra de cobre cilíndrica con forma de U invertida, la cual está en contacto con el HEM y el refrigerante y es utilizada como conductor térmico, y un termómetro electrónico TES-1384 (*TES Electrical, Taiwan*), conectado a la PC con el fin de almacenar y procesar las temperaturas registradas por el mismo. En nuestros experimentos, se utilizó nitrógeno líquido como refrigerante y metanol (400 mL) como HEM. Este último, es contenido en un vaso plástico (Polymethylpentene, Griffin Low-Form Beaker, Nalgene, USA, cat: 1203-0400), aislado con una cubierta de espuma de polietileno (2 mm, Isolant SA, Buenos Aires, Argentina).



**Figura 9. A)** Dispositivo de enfriamiento lento: 1-cámara de enfriamiento, 2-contenedor de muestras, 3-barra de cobre, 4-termo Dewar, 5-agitador magnético, 6-termocuplas, 7-termómetro electrónico TES-1384 y 8-plataforma de soporte. **B)** Barras de cobre utilizadas, de diferentes diámetros. **C)** Contenedor de muestras (Adaptado de Paz et al, 2015 [46]).

Al alcanzar el día 6 - 7 de proliferación de las CMNEs se procedió a disgregarlas según el protocolo mencionado anteriormente. A continuación se determinó la viabilidad mediante el test de exclusión del colorante Azul tripán. Se tomaron  $4 \times 10^6$  células viables y se resuspendieron en 4 mL de DMEM/ F12, suplementado con SFB inactivo al 10 % y DMSO al 10 %. Se fraccionó la suspensión de células en 4 criotubos (Corning) con  $1 \times 10^6$  células viables/ mL, uno de los cuales contenía además una termocupla tipo K para el registro de la temperatura durante todo el proceso.

Se procedió a incubar los criotubos por 20 minutos en baño a 30 °C, condiciones óptimas para una buena difusión del agente crioprotector, según resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio.

Finalizada la incubación con DMSO, se colocaron los criotubos en el contenedor de muestras y éste fue puesto en contacto con el HEM, para dar comienzo al proceso de enfriamiento de la muestra. La temperatura de la muestra y del metanol fue registrada cada 10 segundos, colectándose todos los datos para realizar finalmente una gráfica de temperatura vs. tiempo.

Se evaluaron dos velocidades distintas de enfriamiento: una intermedia de  $(3.3 \pm 0.7)$  °C/ min, utilizando la barra de 5/8 hasta alcanzar los -30 °C, luego de la cual se

agregó la barra de 3/8 para alcanzar los -80 °C; y una velocidad mayor, de  $(6.3 \pm 0.5)$  °C/ min por medio de dos barras de 5/8, hasta alcanzar los -80 °C.

Finalmente, los criotubos fueron almacenados en nitrógeno líquido durante dos períodos de tiempo variables, uno menor a 50 días y el otro mayor a 60 días.

### **3.3) Descongelamiento y proliferación de las CMNEs**

Para el rewarming, los criotubos fueron descongelados en baño de agua a 37 °C. El agente crioprotector se diluyó en un factor de 1/5 con medio y se centrifugó por 5 minutos a 200 g. El sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 1 mL de medio para determinar viabilidad y rendimiento.

A continuación, las CMNEs se sembraron en condiciones de proliferación, de la misma forma descrita anteriormente, a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células vivas por cada flask de 25 cm<sup>3</sup>.

#### **3.3.1) Evaluación de la proliferación de las CMNEs post-descongelamiento**

Las CMNEs proliferaron durante 7 días en cultivo, como neuroesferas. Se realizó un seguimiento de dicho cultivo mediante microscopía (protocolo detallado en sección 3.1.41i), de manera de poder compararlo con los controles sin congelar y determinar si el proceso de enfriamiento lento afecta o no la capacidad de las CMNEs para proliferar activamente y formar neuroesferas.

### **3.4) Disgregación de las neuroesferas**

Pasados los 7 días de cultivo, se procedió a disgregar las neuroesferas (sección 3.1.5), de manera de obtener células aisladas para la determinación de la viabilidad luego de la proliferación y de poder cultivarlas en condiciones de diferenciación.

### **3.5) Diferenciación de las CMNEs**

Las células madre neurales aisladas se sembraron en una placa cubierta con poli-L-lisina. La misma actúa como matriz celular y estimula la adhesión de las CMNEs a la placa de cultivo, lo cual es esencial para detener la proliferación y promover que las células se diferencien en astrocitos y neuronas.

Es necesario entonces tratar previamente las placas multiwell de 24 con poli-L-lisina (5 µg/ mL): se agregan 100 µL y se incuban por 15 min, luego de los cuales se elimina la poli-L-lisina y se deja secar. Finalmente, las CMNEs se plaquean en medio DMEM/ F12 con B27 1X a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células vivas colocando 1 mL por well y se dejan en un incubador de cultivo a 37 °C, en atmósfera de 95 % aire/ 5 % CO<sub>2</sub>, con 90 % de humedad, sin cambiar el medio por 3 - 4 días [36].

En nuestro estudio diferenciamos células madre neurales en pasaje 1 y 2 en cultivo normal, y en pasaje 2 luego de la criopreservación, durante los períodos de tiempo establecidos previamente, con el objetivo de evaluar el efecto de la criopreservación en la capacidad de diferenciación de las CMNEs. Pasaje 1 se refiere a células que fueron aisladas y cultivadas en condiciones de proliferación con la posterior disgregación y diferenciación. Aquellas en pasaje 2, fueron cultivadas dos veces antes de diferenciarlas, con los pasos intermedios correspondientes de disgregación.

#### **3.5.1) Caracterización de las CMNEs diferenciadas en cultivo**

Una vez establecidos los cultivos de células madre neurales y las condiciones de diferenciación, se evaluaron los porcentajes de células diferenciadas en cada tipo particular. Para ello se utilizaron marcadores específicos de las diferentes poblaciones celulares: β-III tubulina para neuronas y GFAP para astrocitos [15]. Los análisis se realizaron mediante inmunocitoquímica acoplada a microscopía de fluorescencia.

Para realizar la inmunofluorescencia, las células fueron cultivadas sobre un cubreobjetos en presencia de Poli-L-lisina, de manera de que crecieran adheridas al mismo. Luego de la incubación por un período de 3 días, se eliminó el medio de crecimiento y se lavó con PBS 1X. Se fijaron las células con paraformaldehído-sucrosa

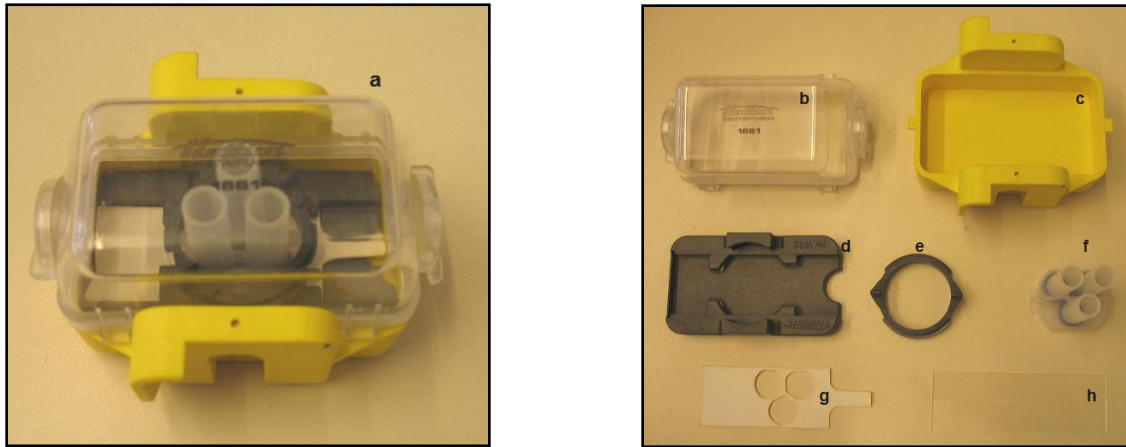
4 % durante 20 minutos y se permeabilizaron las membranas con Tritón X-100 al 0.2 % (v/ v) en PBS 1X por 6 minutos. Posteriormente, se realizó un paso de bloqueo utilizando una solución de albúmina sérica bovina 5 % en PBS 1X, durante una hora en cámara húmeda. Se agregaron los anticuerpos primarios deseados  $\beta$ -III Tubulina (Sigma T2200) para marcar neuronas, o GFAP (Dako Z0334) para marcar astrocitos, y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se agregó el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa fluor-488 y se incubó en oscuridad durante una hora en cámara húmeda. Para visualizar los núcleos y poder contar células totales, se incubó con Hoechst 33342 durante 5 minutos. Finalmente se colocaron los cubreobjetos con las células en un portaobjetos, sobre 1 - 2 gotas de solución de montar (PBS 1X, Tris 1 M pH 7.6, glicerol 87 %, 0.01 g de fenildiamina). Los preparados se dejaron secar en ausencia de la luz a 4 °C [36]. La microscopía se llevó a cabo utilizando un microscopio directo "Nikon Modelo E800". Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa Nikon EZ-C1 3.7 Free Viewer.

### **3.6) Evaluación citológica de las CMNEs**

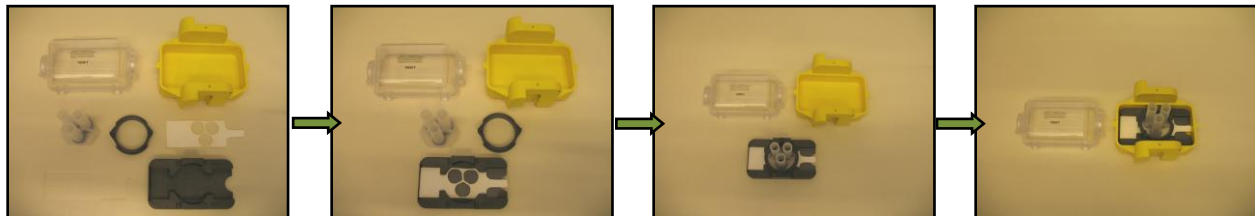
Se utilizó la técnica denominada Citospín de manera de poder realizar un extendido de las CMNEs en suspensión sobre un portaobjetos y observarlas al microscopio antes y luego del proceso de criopreservación/ descongelamiento/ recuperación en medio fresco durante 30 minutos, a fin de evaluar los efectos de la técnica sobre la morfología de las mismas.

#### **3.6.1) Citospín**

El sistema utilizado consta de un soporte oscilante con tapa, constituido por diversos elementos (Figuras 10 y 11).



**Figura 10.** Componentes del soporte oscilante utilizado para la técnica de citospín. **a)** Soporte oscilatorio completo, **b)** Tapa, **c)** Base, **d)** Soporte del portaobjetos, **e)** Anillo para ajustar el sistema, **f)** Contenedor de la suspensión celular, **g)** Tira de papel de filtro, **h)** Portaobjetos.



**Figura 11.** Fotografías del montaje secuencial del soporte oscilante utilizado para realizar la técnica de citospín.

Luego de ensamblar el sistema, se descargó la suspensión celular en los tres tubos del contenedor (f) y se la centrifugó a 41 g a 15 °C en una centrífuga refrigerada (Universal 32R Hettich, Rotor 1624, Cabezal 1661) durante 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se realizó un lavado con 1 mL de PBS 1X, centrifugando por segunda vez en iguales condiciones. Por último, se procedió a aspirar el sobrenadante y desarmar el contenedor, dejando secar el portaobjetos al aire. De esta manera se obtuvo un extendido de CMNEs que fue sometido luego a tinciones morfológicas con Hematoxilina/ Eosina y Nissl.

La concentración celular en cada tubo contenedor fue de  $1.8 \times 10^5$  células vivas/mL.

### 3.6.1.i) Tinción Hematoxilina/ Eosina (HE)

Se procedió a cubrir el portaobjetos seco con una solución de hematoxilina (solución estabilizada Biopur) durante 30 segundos, luego de los cuales se lavó con

abundante agua corriente. Posteriormente se cubrió con solución de eosina (Boehringer), dejándola actuar durante 3 minutos y lavando nuevamente con agua corriente, de manera de eliminar el exceso de colorante. Se dejó secar al aire y por último, se llevó a cabo la observación al microscopio, en aumentos 40X y 100X. Se tomaron fotografías de 4 o 5 campos para cada aumento, utilizando una cámara digital (Canon PowerShot A620) (4x) adaptada a microscopio (Axiolab, Zeiss Germany).

En esta tinción diferencial, la aplicación de hematoxilina, un colorante básico, permitirá visualizar estructuras ácidas como ser los núcleos celulares, en un tono violeta; el citoplasma por otro lado, se podrá observar con coloración rosada, gracias al carácter ácido del colorante eosina.

#### *3.6.1.ii) Tinción de Nissl*

Es una tinción selectiva, comúnmente utilizada para coloración de tejido nervioso; se basa en la aplicación de un colorante acidófilo como el violeta de cresilo (Sigma, C5042), el cual se une al ARN contenido en los ribosomas. Por lo tanto, se observará el núcleo teñido de un color rosa-violeta y los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso (cuerpos de Nissl), en tonalidades púrpuras.

En este caso, se cubrió el portaobjetos seco con una solución de violeta de cresilo 1X (0.1 g/ 10 mL de agua) y se dejó actuar durante 6 minutos, luego de los cuales se procedió a lavar con abundante agua corriente, eliminando de esta manera el exceso de colorante. Finalmente, se realizó la observación microscópica y se tomaron fotografías, de la misma manera que para la tinción con HE.

### **3.7) Comparación del método de enfriamiento lento con un método de congelamiento de rutina**

A fin de verificar la robustez y eficiencia del método ensayado en este trabajo y de manera de poder establecer un protocolo alternativo al utilizado actualmente en muchos laboratorios, incluyendo al Laboratorio de Biología Molecular y Celular de lípidos del IBR, se procedió a comparar algunos resultados, con los obtenidos por el



método de rutina allí utilizado, al que denominaremos de aquí en adelante, por cuestiones de practicidad: “Método estándar o Protocolo estándar”.

### **3.7.1) Congelamiento de CMNEs mediante protocolo estándar**

Luego del aislamiento, cultivo, proliferación y disgregación de las CMNEs mediante las técnicas detalladas anteriormente, las mismas se colocaron en criotubos, a una densidad de aproximadamente  $1.5 - 2 \times 10^6$  células vivas/ mL en DMEM/ F12, suplementado con SFB inactivo al 10 % y DMSO al 10 %, en un volumen final de 1 mL por tubo. Una vez preparados los criotubos, se los incubó en freezer a  $-20$  °C durante 1 h, pasándolos posteriormente a un freezer a  $-80$  °C, para su posterior almacenamiento.

### **3.7.2) Rewarming y proliferación de CMNEs**

Al momento de realizar experimentos con CMNEs, se procedió a descongelarlas mediante el protocolo estándar. El mismo consiste en retirar los criotubos del freezer de  $-80$  °C y colocarlos en baño de agua a  $37$  °C hasta fusión completa del líquido contenido en los mismos. Luego se diluyó el ACP con medio, en un factor 1/5 y se centrifugó a 200 g durante 5 minutos; se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de medio para determinar viabilidad mediante el test de exclusión de Azul tripán.

Por último, las CMNEs se sembraron en condiciones de proliferación, de la misma manera que en los experimentos descriptos previamente, a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células vivas por flask de  $25 \text{ cm}^3$ .

#### **3.7.2.i) Evaluación de la proliferación de las CMNEs post-descongelamiento**

Las CMNEs descongeladas se dejaron proliferar durante 7 días, durante los cuales se determinó el diámetro de las neuroesferas mediante microscopía, de manera de evaluar la capacidad de las mismas para proliferar y de comparar dichos resultados tanto con los controles sin congelar, como con los experimentos de congelamiento mediante la metodología de enfriamiento lento.

### **3.7.3) Disgregación de las neuroesferas**

Como último paso, transcurrido el tiempo de cultivo de las CMNEs como neuroesferas, las mismas fueron disgregadas utilizando el protocolo detallado en la sección 3.1.5. A partir de la suspensión de células aisladas obtenidas, se determinó viabilidad mediante el test de exclusión de Azul tripán, de manera de caracterizar la capacidad de recuperación y crecimiento de las células luego de los procesos de congelamiento/ descongelamiento.

### **3.8) Análisis Estadístico**

Los resultados son expresados como Media  $\pm$  desvío estándar (SD), realizándose como mínimo 3 experimentos para cada condición planteada y, a su vez, cada uno de ellos por triplicado, a menos que se informe lo contrario. Las significancias estadísticas se evaluaron con el programa GraphPad InStat, mediante análisis de ANOVA no paramétrico o un Two-way ANOVA, utilizando el post-test Kruskal-Wallis, según corresponda. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de  $p \leq 0,05$ .

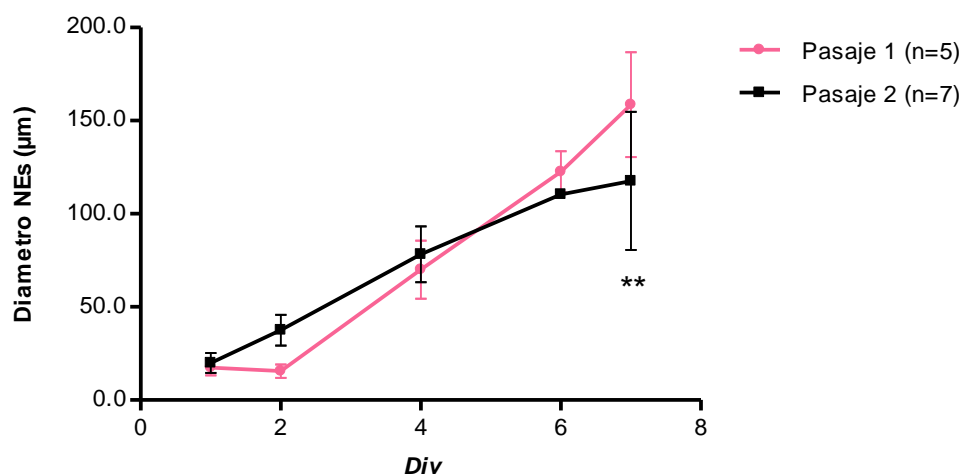
# **RESULTADOS**

## 4) RESULTADOS

### 4.1) Caracterización de la proliferación de CMNEs control

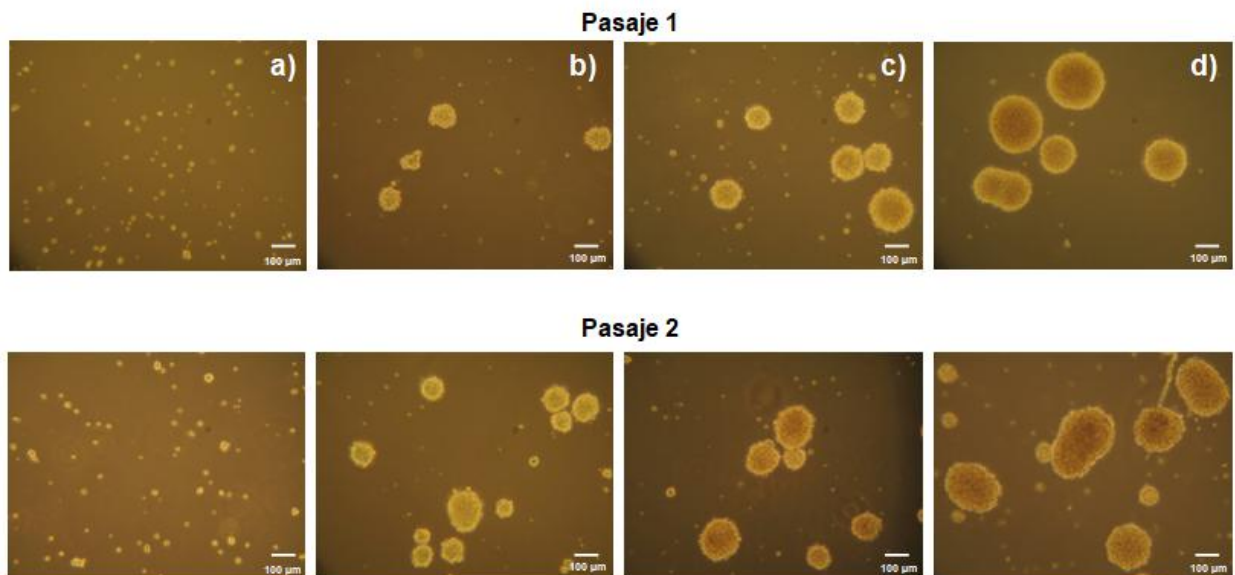
El cultivo y la proliferación de las CMNEs en forma de neuroesferas refleja su gran capacidad para expandirse y auto-renovarse. Es por ello que, al medir y determinar el diámetro de las neuroesferas durante los 7 días de cultivo, se está evaluando directamente su grado de proliferación y auto-renovación. Este parámetro es importante tanto en la caracterización de los cultivos control de CMNEs, como en la evaluación de las distintas metodologías de congelamiento postuladas en este trabajo. Si alguno de los pasos implicados en el proceso global de congelamiento/descongelamiento de las células llegara a afectar la capacidad de división de las mismas, esto podría verse reflejado en las curvas de crecimiento obtenidas a partir de la medición de los diámetros de las neuroesferas a lo largo del cultivo.

En condiciones normales, se puede observar que los diámetros de las neuroesferas de ambos pasajes aumentan significativamente con el paso de los días de cultivo *in vitro* ( $p \leq 0.01$ ; *Div*, Días *in vitro*). Sin embargo, la capacidad de proliferación de las CMNEs del segundo pasaje es significativamente menor que la de las del primer pasaje ( $p \leq 0.01$ ) (Figura 12).



**Figura 12.** Curvas de diámetro de NEs como medida de proliferación de las CMNEs en condiciones normales (control), en pasajes 1 y 2. Significancia estadística: \*\*  $p \leq 0.01$ , pasaje 1 vs. pasaje 2 a 7 *Div* (Días *in vitro*).

Particularmente, en el caso del pasaje 1 (células recién aisladas), se puede observar una fase lag de acondicionamiento al medio de cultivo y/ o recuperación, que se extiende aproximadamente hasta el día 2 de cultivo, luego de lo cual el diámetro de la NE aumenta proporcionalmente con los días de cultivo. En el caso de las NEs de pasaje 2, formadas por CMNEs aisladas de NEs de pasaje 1, no se observa el período de fase lag, posiblemente debido a que las células ya se encuentran adaptadas al medio e inician su proliferación más rápidamente. Es por ello también, que las neuroesferas son inicialmente de mayor tamaño que las del pasaje 1 aún hasta los 4 días de cultivo (Figura 13). Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con las CMNEs de pasaje 1, el crecimiento de las NEs comienza a disminuir, lo que puede deberse a la muerte de las células del interior de la neuroesfera por falta de nutrientes y escasa difusión de oxígeno a tales densidades celulares. También puede deberse a que, luego de varios cultivos sucesivos, las CMNEs sufren acortamiento de los telómeros, ocasionando una proliferación más reducida, neurogénesis disminuida y por último, senescencia [54]. Además, debe tenerse en cuenta que se trata de un cultivo celular primario, con número finito de divisiones en cultivo. Dichos fenómenos pueden evidenciarse microscópicamente, ya que el centro de la neuroesfera se torna opaco y oscuro.



**Figura 13.** Imágenes representativas de la formación de neuroesferas en primer (superior) y segundo (inferior) pasaje, en x días de cultivo: **a)** 1, **b)** 4, **c)** 6 y **d)** 7. Fotografías tomadas a un aumento de 10X en microscopio óptico invertido.

Las células en pasaje 2, generalmente se dejan proliferar hasta el día 4 - 5 de cultivo y luego se las utiliza, debido a los problemas de difusión de oxígeno y nutrientes hacia el interior de las NEs de cierto tamaño, que incrementan la muerte celular en los días posteriores.

## **4.2) Metodología de enfriamiento lento**

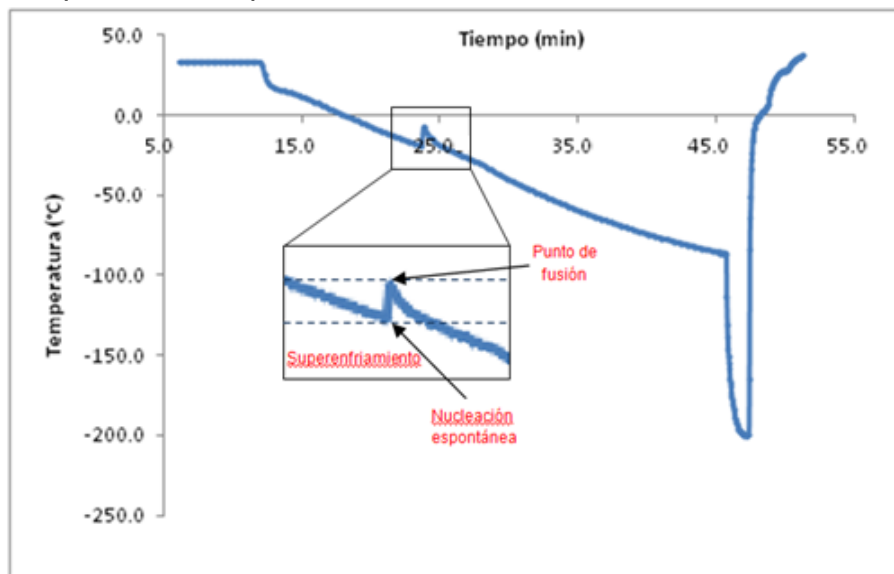
Se evaluaron dos velocidades distintas de enfriamiento controlado y a su vez, para cada velocidad, dos períodos diferentes de almacenamiento en nitrógeno líquido de manera de corroborar que el mismo puede realizarse durante tiempos muy prolongados sin afectar las propiedades de las muestras sujetas a criopreservación debido a que por debajo de  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $T^{\circ}$  de transición vítrea) no ocurre ningún tipo de reacción o proceso fisicoquímico capaz de perjudicarlas.

### **4.2.1) Estimación de parámetros**

En primer lugar, se determinaron los parámetros relacionados al proceso de enfriamiento, mediante la medición de la temperatura de las muestras en función del tiempo. Esto se realizó para corroborar que durante la criopreservación no sucediera ningún tipo de inconveniente que pueda afectar los resultados posteriores; se obtuvo entonces la historia térmica de cada muestra criopreservada, como se visualiza representativamente en la Figura 14.

A partir de la gráfica (Figura 14) podemos observar las distintas fases del proceso de criopreservación. Inicialmente, la temperatura se mantiene constante a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante la incubación de la muestra con DMSO (20 minutos) para permitir la difusión del mismo al interior celular, condiciones establecidas previamente en nuestro laboratorio. A continuación se inicia el enfriamiento de las muestras a una velocidad constante hasta llegar a la zona de superenfriamiento, donde la solución permanece en un estado “super-enfriado”, es decir, se encuentra por debajo de su punto de fusión sin sufrir congelamiento debido a la presencia de agentes que disminuyen la temperatura de cristalización. El sistema permanece en ese estado hasta llegar a la temperatura de nucleación espontánea, donde se origina un cristal al azar que cumplirá la función de

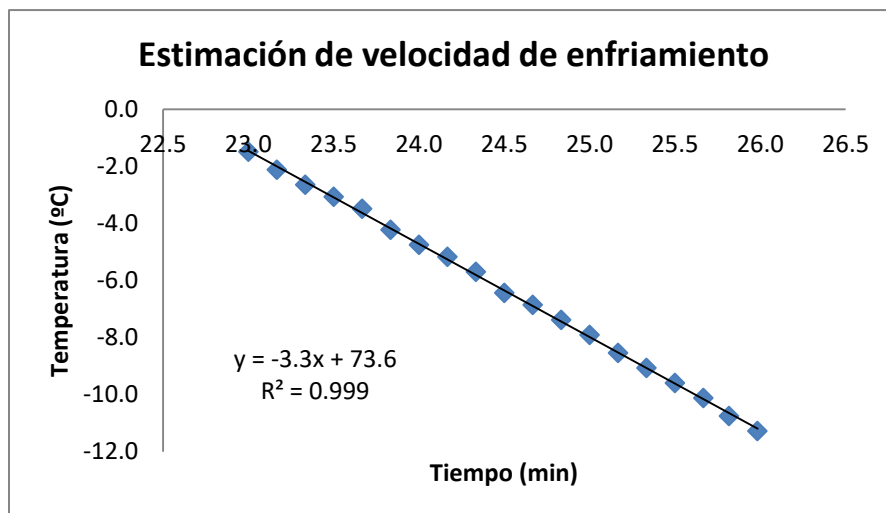
nucleador para la formación posterior de otros cristales; momento en el cual la temperatura aumenta debido a la liberación del calor latente de fusión de la muestra, proceso complejo en el cual se forman nuevos cristales que a su vez provocan una expansión con la consecuente liberación de calor, hasta alcanzar la temperatura de fusión, donde se produce la transición a estado sólido. La temperatura continúa descendiendo a partir de ese punto.



**Figura 14.** Historia térmica de una muestra representativa, sometida al procedimiento de enfriamiento lento y posterior descongelamiento a 37 °C en baño de agua.

En la gráfica también está registrada la etapa de descongelamiento rápido (en baño de agua a 37 °C), en la cual la temperatura aumenta hasta alcanzar el “estado fisiológico” de las muestras a 37 °C (temperatura de cultivo).

A partir de la gráfica de temperatura en función del tiempo, puede obtenerse un gran número de parámetros físico/químicos que caracterizan y describen todo el procedimiento. Entre los más relevantes se encuentran: la velocidad de enfriamiento, la temperatura de nucleación espontánea y la temperatura final a la cual se inicia el almacenamiento. Los mismos se obtienen a partir del análisis de la gráfica y los datos medidos, es decir, observación de la menor temperatura registrada antes de que se produzca la liberación del calor latente de fusión (temperatura de nucleación) y cálculo de la pendiente de la zona lineal de la gráfica, comprendida entre -10 °C y -30 °C (velocidad de enfriamiento), como se esquematiza en la Figura 15.



**Figura 15.** Representación esquemática del cálculo de la velocidad de enfriamiento de una muestra.

Los resultados obtenidos para las barras de cobre utilizadas se ilustran en la tabla I.

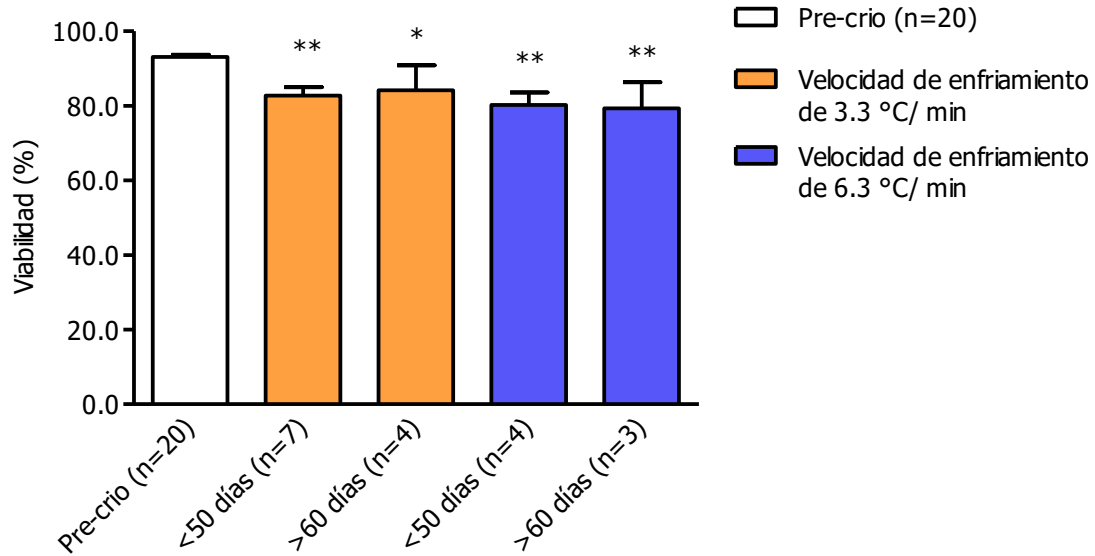
Díámetro barra de cobre (pulgadas)	Velocidad de enfriamiento (°C/ min)	Temperatura de nucleación (°C)	Temperatura final del enfriamiento (°C)
5/8 + 3/8	3.3 ± 0.7 (n=12)	- (11.6 – 25.2)	- 80.0 ± 0.0
5/8 + 5/8	6.3 ± 0.5 (n=6)	- (17.7 – 21.8)	- 80.0 ± 0.0

**Tabla I.** Parámetros más importantes del enfriamiento lento, obtenidos mediante la utilización de las barras de cobre de 5/8" y 3/8", a partir del registro de la temperatura del proceso en función del tiempo.

#### **4.2.2) Análisis del desempeño de la técnica**

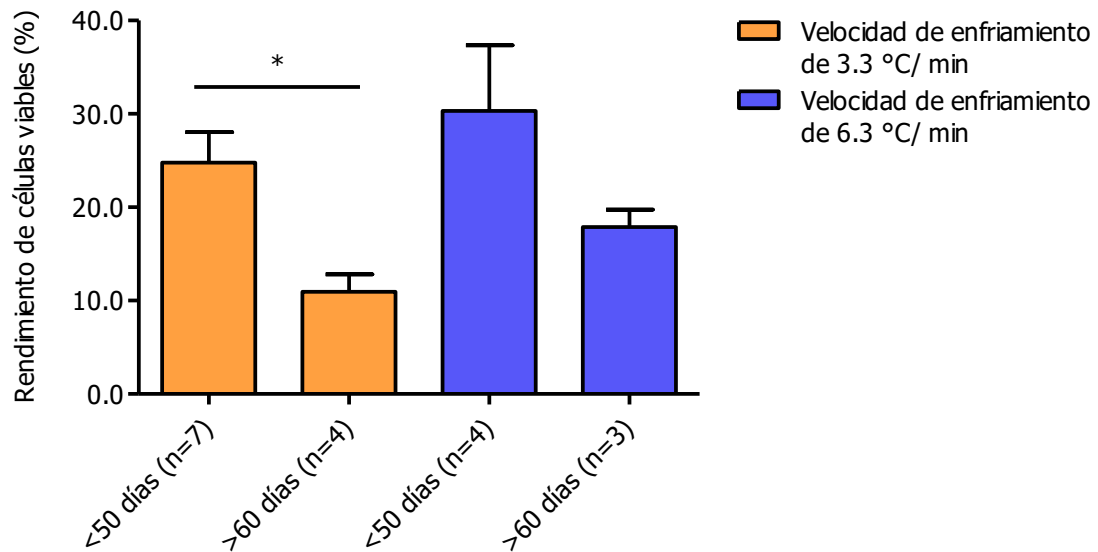
Luego del proceso global de congelamiento/ descongelamiento de las muestras, para las velocidades y períodos de almacenamiento pre-establecidos (< 50 días y > 60 días), se evaluó viabilidad celular mediante el método de exclusión del colorante Azul tripán y se la comparó con la viabilidad de las muestras control, sin criopreservar, obteniendo los resultados observados en la Figura 16. La viabilidad celular disminuye significativamente ( $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.05$ ) respecto al control no preservado en las dos velocidades y ambos tiempos de almacenamiento evaluados. Sin embargo, la viabilidad nunca se encontró por debajo del 80 %, siendo esto un resultado positivo.





**Figura 16.** Viabilidad para muestras control (no criopreservadas) y criopreservadas/ descongeladas. Significancia estadística: \*  $p \leq 0.05$  y \*\*  $p \leq 0.01$ , respecto al control.

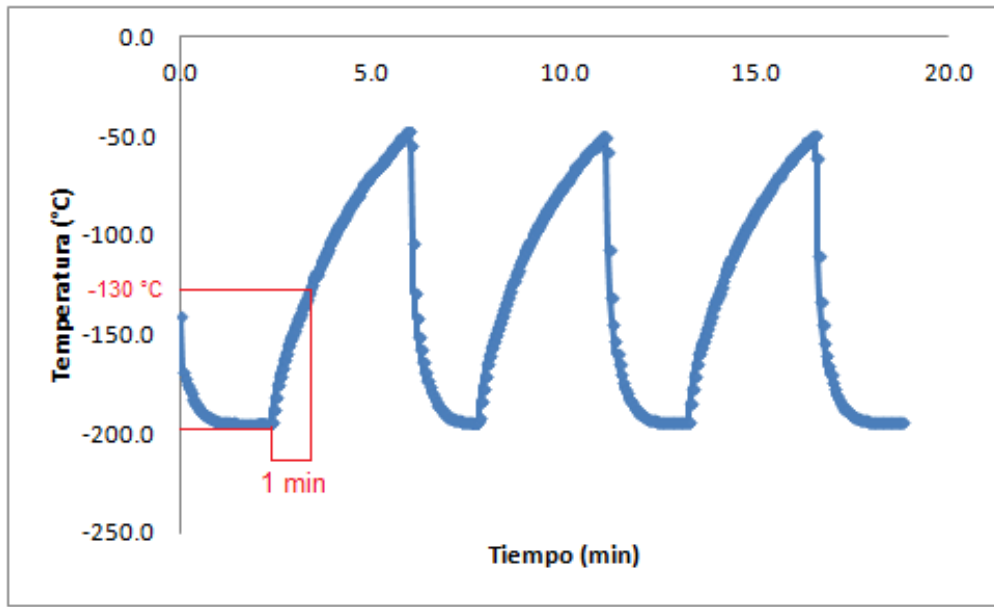
Los datos de viabilidad obtenidos permitieron también calcular el “rendimiento de células vivas” de la técnica en cada caso, es decir, la proporción de células vivas al final del proceso respecto a aquellas inicialmente colocadas en cada experimento, y realizar una comparación de los mismos para cada velocidad y para los distintos tiempos de almacenamiento dentro de cada una de ellas (Figura 17).



**Figura 17.** Rendimiento de células viables para las condiciones evaluadas. Significancia estadística: \*  $p \leq 0.05$ .

Los resultados muestran que los rendimientos de células vivas disminuyeron con el aumento del período de almacenamiento; sin embargo, el período de almacenamiento no debería afectar la viabilidad, ni el rendimiento debido a que por debajo de  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$  no ocurre ningún tipo de reacción o proceso fisicoquímico capaz de perjudicar a las células. Estos resultados sorprendentes nos llevaron a buscar una explicación a dicha disminución. La suposición inicialmente realizada, fue que posiblemente este resultado podría deberse a la inadecuada manipulación de las muestras durante el periodo de almacenamiento. Las muestras son conservadas en cánulas (5 muestras/ cánula) en el tanque de  $\text{N}_2\text{L}$ ; cuando se quiere retirar una muestra se debe extraer toda la cánula del tanque de nitrógeno, procedimiento durante el cual se produce un intercambio de calor con el medio ambiente, alcanzando temperaturas superiores a  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$  en cuestión de un minuto aproximadamente. Dicha suposición fue evaluada colocando una sonda dentro de un criotubo con medio de criopreservación e introduciendo el mismo en un termo con  $\text{N}_2\text{L}$ , de manera de registrar la temperatura en todo momento. Al alcanzar el criotubo la temperatura del  $\text{N}_2\text{L}$ , se procedió a retirarlo del termo, dejándolo expuesto al medio ambiente. Al realizar esto, se pudo observar cómo la temperatura ascendía rápidamente. Alcanzados los  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se volvió a introducir el criotubo en el termo de  $\text{N}_2\text{L}$ , repitiéndose el proceso anterior 3 veces. Finalmente se construyó una gráfica de temperatura en función del tiempo (Figura 18) y se calculó el tiempo exacto que demora la muestra en alcanzar la temperatura de transición vítrea ( $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) una vez retirada del termo de  $\text{N}_2\text{L}$ .

Estos cambios de temperatura pueden haber ejercido efectos nocivos sobre aquellas muestras que debían permanecer más tiempo almacenadas, afectando a las células y provocándoles daños que ocasionaron la lisis celular y, por ende, la disminución en el rendimiento luego del descongelamiento.



**Figura 18.** Representación esquemática de las variaciones de temperatura que sufre una muestra al ser retirada del tanque de nitrógeno líquido. Experimento realizado por triplicado.

En base a estas observaciones, y al hecho de que se pudo corroborar que el período de almacenamiento no tenía influencia alguna sobre las demás propiedades celulares evaluadas como ser morfología, proliferación, diferenciación, entre otras, el resto de las metodologías se realizaron e informaron en base a las dos velocidades de enfriamiento propuestas, sin discriminar por período de almacenamiento para cada una.

### 4.3) CMNEs post-rewarming

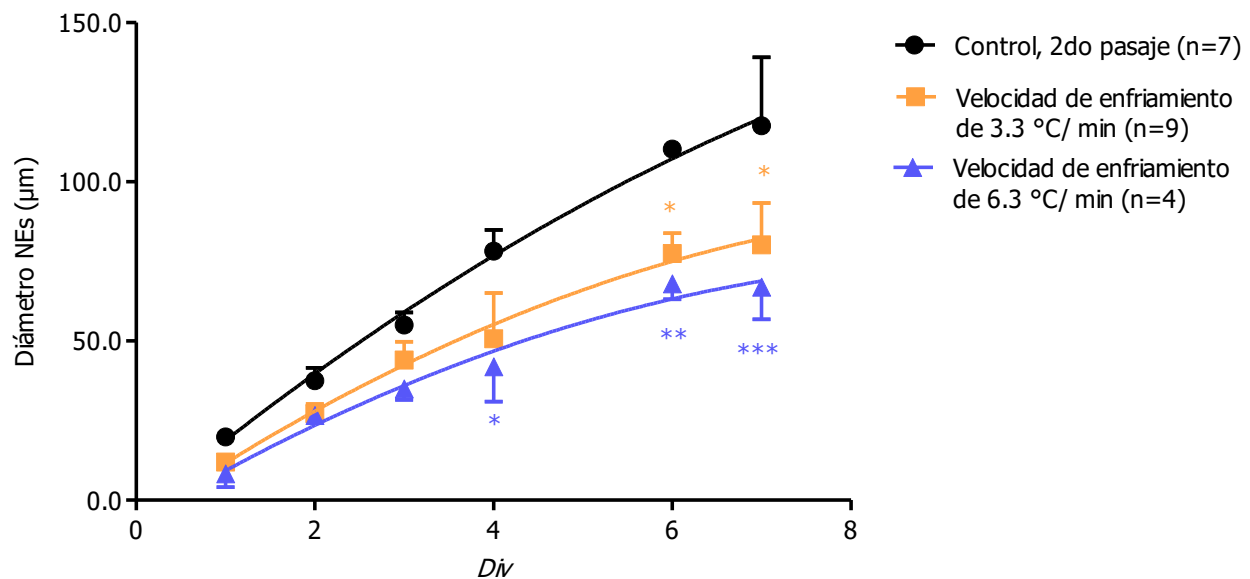
Luego de cumplirse el tiempo de almacenamiento determinado se procedió a descongelar las muestras rápidamente una vez retiradas del tanque de nitrógeno líquido, en baño de agua a 37 °C. Inmediatamente, se procedió a la dilución rápida del DMSO en un paso, mediante centrifugación, de manera de evitar los efectos tóxicos asociados a la exposición al mismo en tiempos prolongados. Posteriormente se evaluó la viabilidad y se sembraron las células en condiciones de proliferación durante 7 días.

Esto se realizó para las células criopreservadas a ambas velocidades de enfriamiento, de igual manera que para las células control.

#### 4.3.1) Evaluación de la proliferación

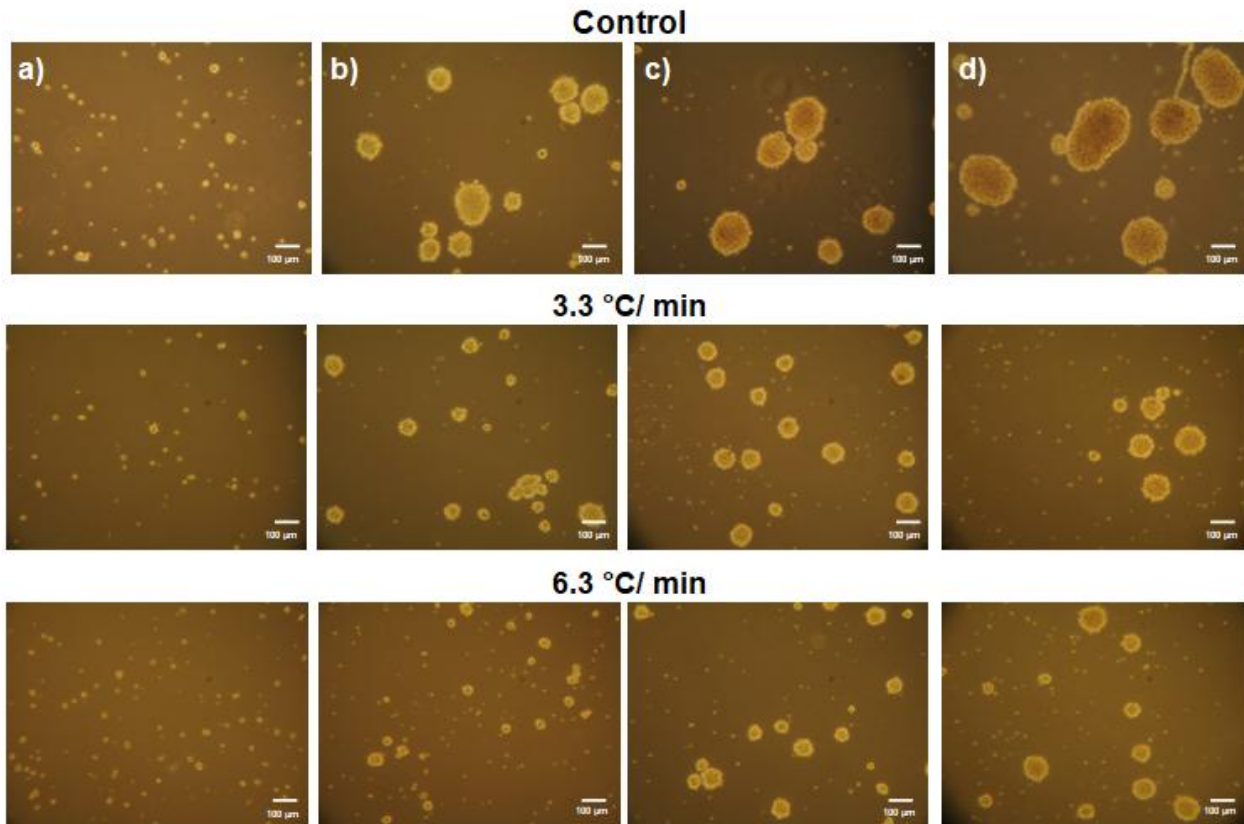
Las células crecieron formando neuroesferas de diámetro cada vez mayor en función de los días en cultivo. Los mismos se midieron mediante microscopía, pudiéndose construir curvas de proliferación. Las curvas de proliferación para cada velocidad evaluada fueron comparadas con la curva de proliferación control de un segundo pasaje. Dicha comparación se llevó a cabo de esa manera debido a que las células criopreservadas representan un segundo pasaje normal, con el paso adicional de congelamiento y descongelamiento entre las dos etapas de proliferación características.

Las células criopreservadas mostraron una disminución significativa en su tasa de proliferación con el aumento de la velocidad de enfriamiento respecto al control no criopreservado. Como puede observarse en la Figura 19, las células criopreservadas siguen un patrón de proliferación idéntico al de un segundo pasaje control, aunque el tamaño de las neuroesferas formadas es significativamente menor en ambos casos.



**Figura 19.** Curvas de diámetro de NEs como medida de proliferación de CMNEs en función de los días de división. Significancia estadística: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  y \*\*\*  $p \leq 0.001$ , respecto al control en todos los casos.

En cuanto al aspecto morfológico de las neuroesferas, el mismo no se ve afectado ni modificado, tal como se puede visualizar en las fotografías representativas de la Figura 20.

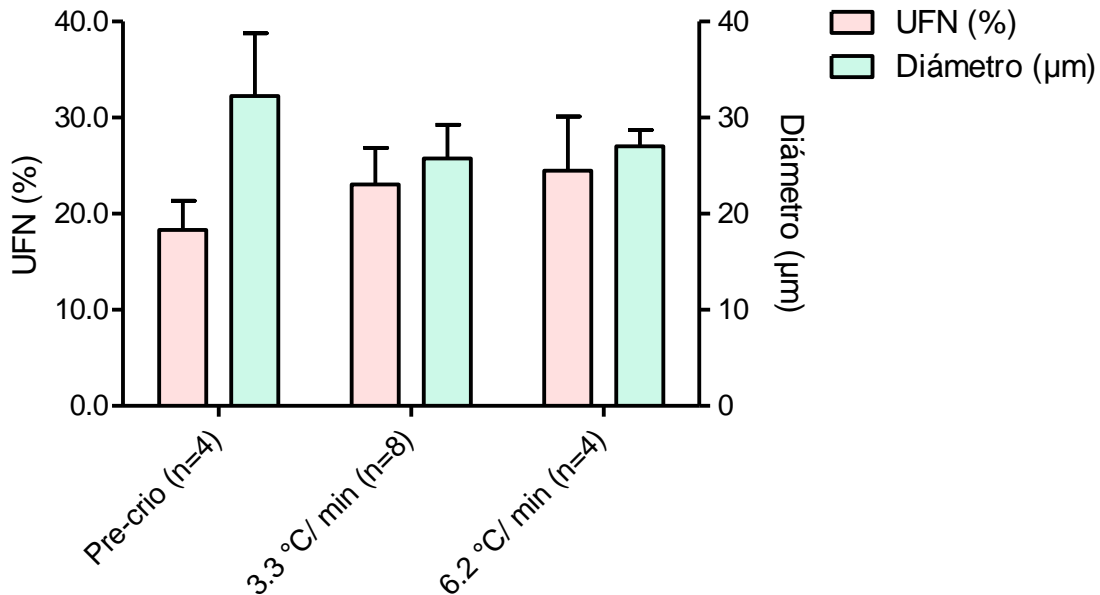


**Figura 20.** Imágenes representativas de la proliferación de CMNEs a: **a)** 1 día; **b)** 4 días; **c)** 6 días y **d)** 7 días. Control: segundo pasaje, sin criopreservar; 3.3 °C/ min: criopreservadas a velocidad de 3.3 °C/ min. 6.3 °C/ min: criopreservadas a velocidad de 6.3 °C/ min. 10X.

#### 4.3.1.i) Rendimiento de la proliferación

A partir de las fotografías tomadas con el microscopio óptico invertido de las NEs en día 2 o 3 de cultivo, se contó el número de neuroesferas en 10 campos al azar y se lo relacionó con el número inicial de células vivas sembradas en cada experimento, obteniendo un parámetro que denominamos Unidades Formadoras de Neuroesferas (UFN). Partiendo de la base de que cada neuroesfera se origina a partir de una única célula, el valor de UFN reflejará la capacidad de las CMNEs viables de dividirse y proliferar, generando cada una, una neuroesfera. Se calcularon las UFN de las células en condiciones normales (control) y luego del proceso de criopreservación a ambas velocidades (Figura 21). Las velocidades de enfriamiento estudiadas no afectaron el

número de UFN, ni el diámetro de las NEs respecto a los valores observados en el control.

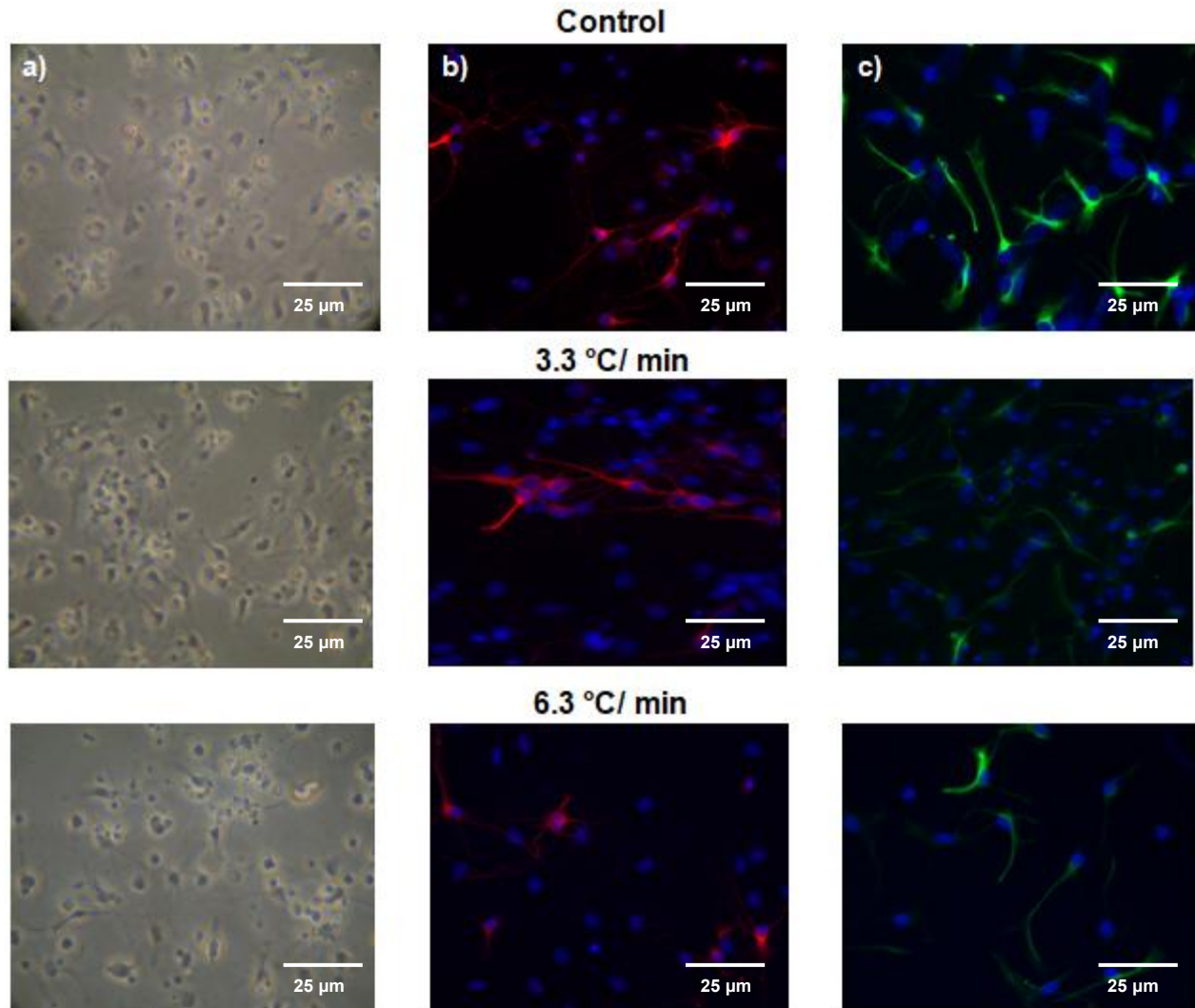


**Figura 21.** Gráfico de Unidades Formadoras de Neuroesferas (UFN) y diámetro de las NEs formadas para las condiciones control y criopreservadas a ambas velocidades.

#### **4.3.2) Evaluación de la capacidad de diferenciación**

Otro parámetro evaluado con el objetivo de poder comparar ambas velocidades de enfriamiento y seleccionar aquella que permita obtener resultados más similares a los del control, fue el porcentaje de diferenciación de las CMNEs a neuronas y astrocitos. Esto se realizó luego de 7 días de cultivo en condiciones de proliferación, mediante disgregación enzimática y mecánica de las neuroesferas y posterior cultivo de las células aisladas en medio de diferenciación libre de mitógenos. Pasados los 3 días de cultivo, se fijaron las células ya diferenciadas y se realizaron tinciones inmunocitoquímicas específicas con  $\beta$ III – Tubulina y GFAP.

Las muestras se observaron con un microscopio óptico invertido y también con uno de fluorescencia y para el análisis se tomaron fotografías de al menos 10 campos al azar por experimento (Figura 22). Mediante las imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia, se pudieron calcular los porcentajes de células marcadas con  $\beta$ III – Tubulina (neuronas) y GFAP (astrocitos).



**Figura 22.** Imágenes representativas de CMNEs diferenciadas para las condiciones control, enfriadas a velocidad de 3.3 °C/ min y a velocidad de 6.6 °C/ min: **a)** observadas en microscopio óptico invertido; **b)** luego de tinción inmunocitoquímica con  $\beta$ III-Tubulina (rojo), para neuronas y **c)** luego de tinción inmunocitoquímica con GFAP (verde), para astrocitos. Núcleos en azul. Aumento 40X.

El porcentaje de CMNEs que se diferencian a neuronas disminuye significativamente con la velocidad de enfriamiento de 3.3 °C/ min; por el contrario se ve un aumento significativo del porcentaje de CMNEs que se diferencian a astrocitos en esta condición. Con la velocidad de 6.3 °C/ min se ve una tendencia de las CMNEs a adoptar un comportamiento similar al de la velocidad menor, aunque deberían realizarse más experimentos para poder lograr resultados certeros y conclusivos. Los resultados indican, en general, que el proceso de criopreservación estaría afectando de

alguna manera la vía de neurogénesis, respecto a la vía de diferenciación a astrocitos que, por consiguiente se ve más favorecida respecto a la primera (Tabla II).

	Neuronas (% $\beta$ III – Tubulina)	Astrocitos (% GFAP)
Control (n=4)	23.3 $\pm$ 3.4	19.8 $\pm$ 1.6
Velocidad de enfriamiento 3.3 °C/ min (n=3)	17.3 $\pm$ 1.3 *	31.0 $\pm$ 2.7 *
Velocidad de enfriamiento 6.3 °C/ min (n=2)	21.6 $\pm$ 8.6	34.8 $\pm$ 16.3

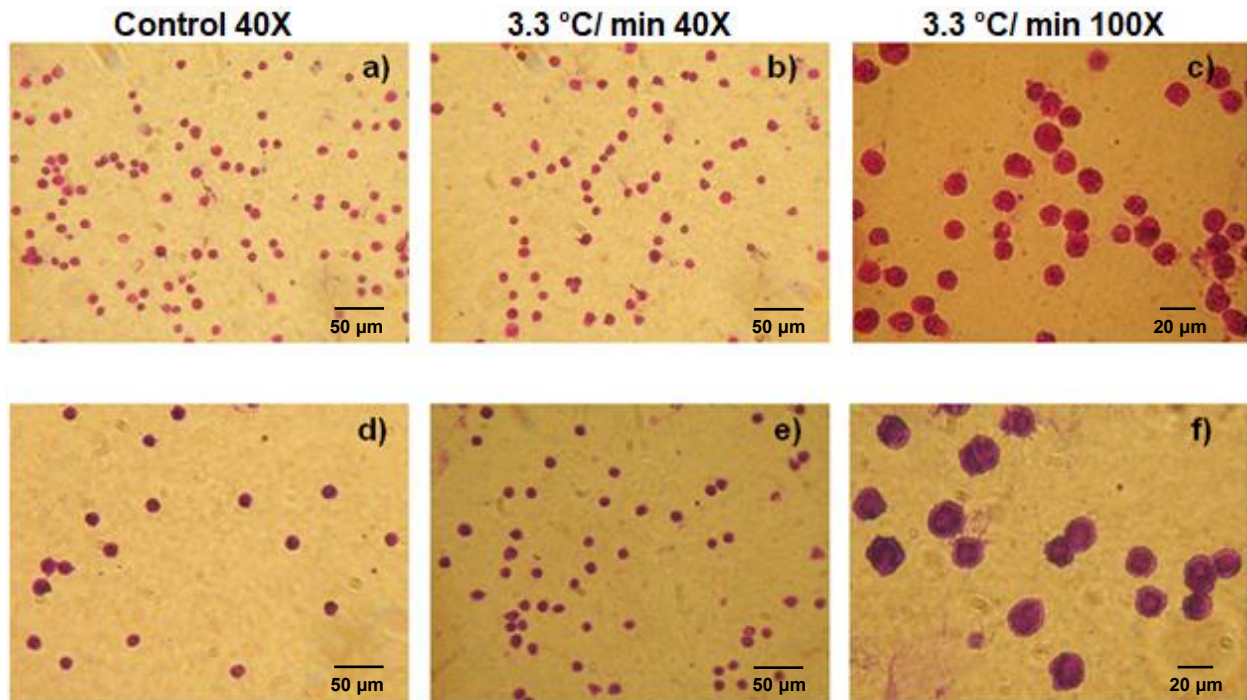
**Tabla II.** Porcentaje de CMNEs diferenciadas a neuronas y astrocitos para las condiciones control y criopreservadas a ambas velocidades de enfriamiento. Significancia estadística: \*  $p \leq 0.05$  respecto al control.

#### **4.3.3) Evaluación citológica**

A pesar del gran auge de los estudios de células madre neurales, especialmente en sus diversas posibles aplicaciones, no se encuentra disponible al momento información acerca del tamaño, morfología y volumen de las mismas en condiciones de proliferación. Es por ello que se realizaron tinciones básicas de células aisladas, luego de su cultivo como neuroesferas y disgregación, de manera de poder caracterizarlas y poseer otra herramienta al momento de evaluar protocolos de criopreservación, pudiéndose comparar la morfología de células control y criopreservadas.

Así, a partir de extendidos celulares realizados mediante citospín de CMNEs en pasaje 2 (sin criopreservar) y de células criopreservadas a una velocidad de 3.3 °C/ min y luego descongeladas, se obtuvieron imágenes representativas (Figura 23) que permitieron evaluar la morfología de las células en las condiciones estudiadas, dando también una idea del volumen celular.





**Figura 23.** Imágenes representativas de tinciones morfológicas de CMNEs control (n=3) y criopreservadas a velocidad de 3.3 °C/ min (n=3): Tinción con Hematoxilina-Eosina de CMNEs control (a) y criopreservadas (b) y Tinción de Nissl de CMNEs control (d) y criopreservadas (e). Aumento 40X. c) Representación esquemática de Tinción de CMNEs con HE en aumento 100X. f) Representación esquemática de Tinción de Nissl en aumento 100X.

En todos los casos, se observaron células de forma esférica y bastante conservada. En aquellas teñidas con HE, se pudieron visualizar los núcleos voluminosos característicos de una coloración violeta y el citoplasma en tono más rosado. Para las CMNEs teñidas con cristal violeta (Nissl), el núcleo se observó en tono violeta y además pudieron visualizarse gránulos citoplasmáticos también de color púrpura. En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas en la morfología de las CMNEs control y aquellas criopreservadas.

#### 4.4) Comparación entre métodos

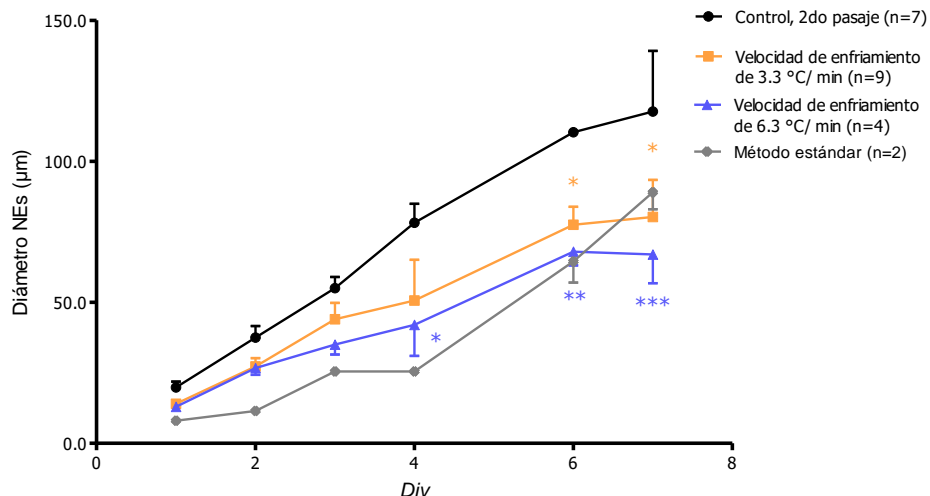
Luego de evaluar la técnica de preservación en sí y con base a la problemática planteada que dio origen al presente trabajo, se procedió a comparar la técnica de criopreservación optimizada con aquella utilizada por el laboratorio de Biología Molecular y Celular de lípidos del IBR ("método estándar"). Los objetivos de esta fase del trabajo fueron: respaldar el método de enfriamiento lento y asentararlo como técnica

preferencial y segura, capaz de proveer un almacenamiento seguro y adecuado para las CMNEs.

Para ello, se procedió a preservar las CMNEs mediante el protocolo de congelamiento y descongelamiento utilizado en el laboratorio de Biología Molecular y Celular de Lípidos del IBR. Brevemente las células fueron congeladas y descongeladas en el IBR, trasladándose al CAIC los flask con las células descongeladas el mismo día de su descongelamiento o al día siguiente, de manera que el protocolo utilizado por ellos no variara de ninguna manera.

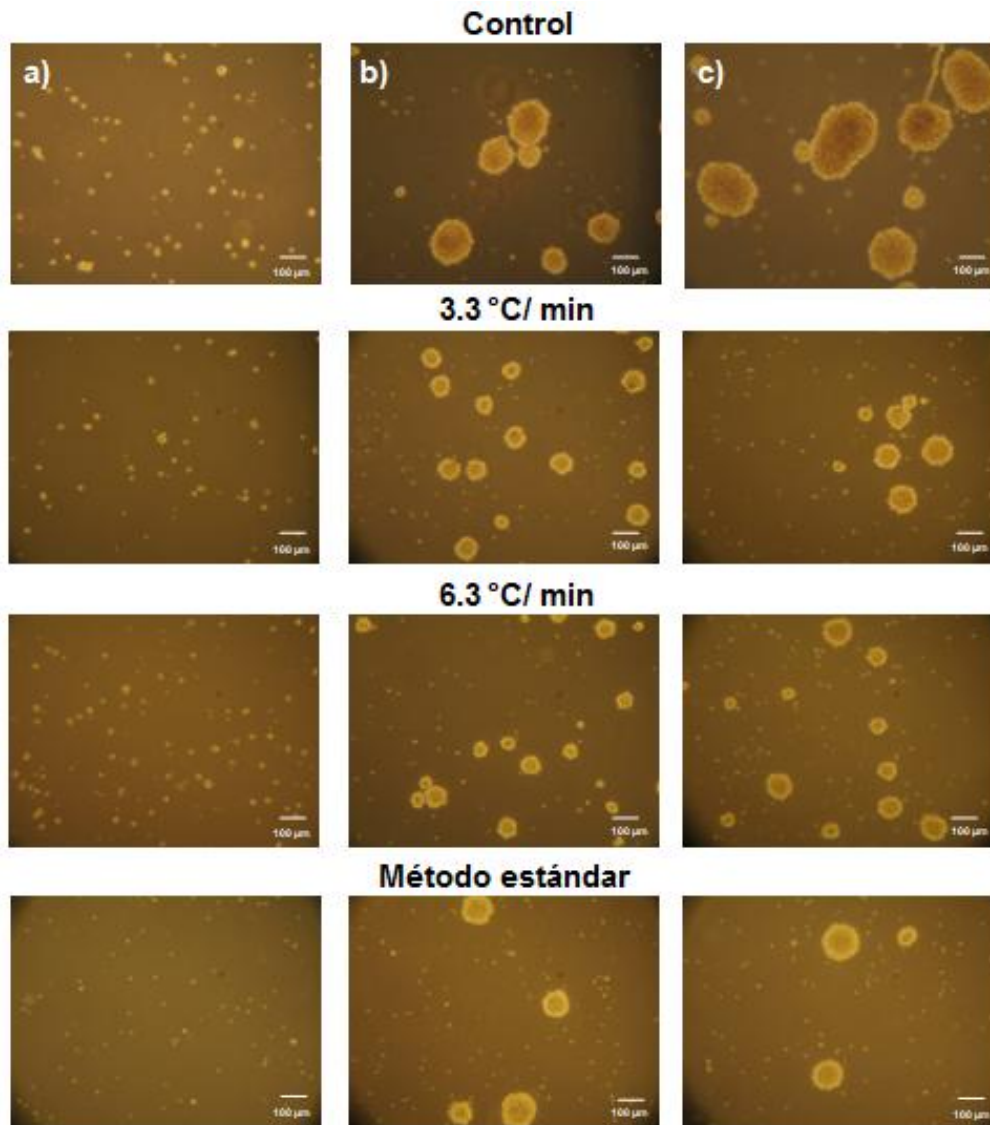
#### 4.4.1) Comparación de curvas de proliferación

Como se describió anteriormente, las células criopreservadas fueron cultivadas en medio de proliferación, tomando fotografías durante los distintos días del cultivo. A partir de las fotografías de campos al azar, se midieron los diámetros de las neuroesferas y se construyó la curva de crecimiento. El diámetro de las NEs obtenidas de CMNEs criopreservadas mediante el método estándar fue notoriamente menor respecto al control a 4 y 6 días de cultivo (Figura 24). Cuando comparamos este método con las dos velocidades de enfriamiento lento, no se observaron diferencias significativas aunque sí se evidenció una tendencia similar; debido a ella, debería aumentarse el número de experimentos para poder concluir sobre la misma.



**Figura 24.** Curvas de diámetro de NEs como medida de proliferación de CMNEs criopreservadas a 3.3 °C/ min y 6.3 °C/ min y mediante el método estándar (n=2). Significancia estadística: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  y \*\*\*  $p \leq 0.001$ , respecto al control en todos los casos.

La Figura 25 es una recopilación de imágenes representativas de los tamaños promedio de las neuroesferas formadas luego de todas las metodologías de criopreservación utilizadas, así como el control.



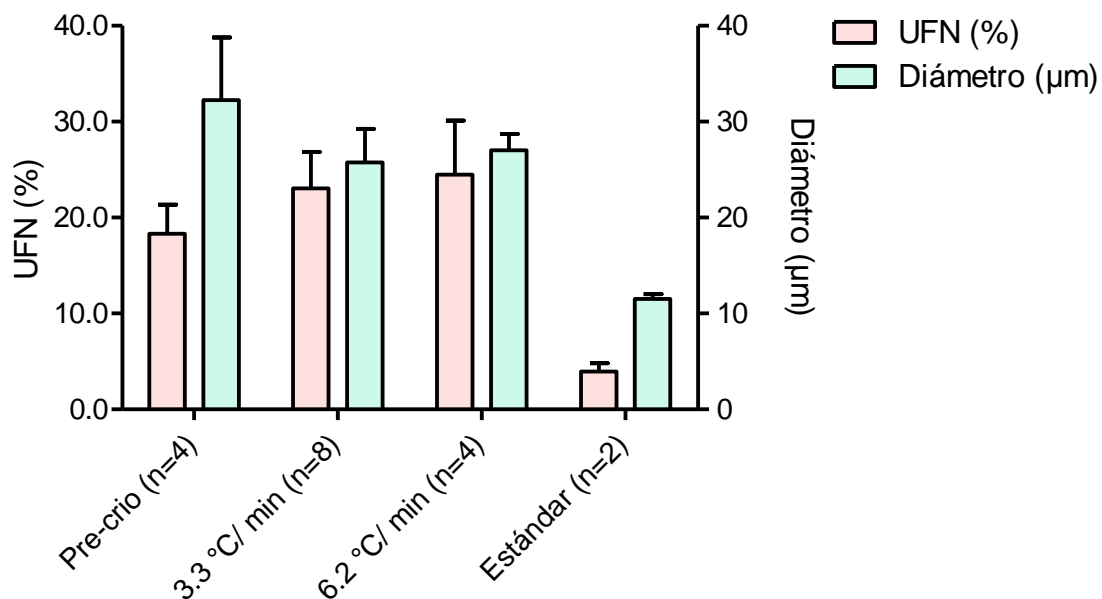
**Figura 25.** Imágenes representativas del tamaño de neuroesferas para CMNEs control y criopreservadas mediante enfriamiento lento a 3.3 °C/ min y 6.3 °C/ min y mediante el método estándar. Proliferación a: **a)** 1 día de división; **b)** 6 días y **c)** 7 días. Aumento 10X.

A partir de las imágenes anteriores puede observarse que en el primer día de cultivo, las CMNEs preservadas por el método estándar no muestran un aumento de diámetro, sugiriendo que no han proliferado aún, probablemente porque necesiten de más tiempo para volver a adaptarse al medio de cultivo, a diferencia de lo que sucede a las dos velocidades de enfriamiento lento testeadas. En los días posteriores el

crecimiento se acelera, acercándose más al de las CMNEs preservadas mediante enfriamiento lento a cualquiera de las dos velocidades. Sin embargo, también es notable el menor número de neuroesferas por campo observado, siendo menor por lo tanto, el rendimiento de las mismas.

#### 4.4.2) Cálculo de UFN

De la misma forma que la detallada anteriormente para el método de enfriamiento lento, se contó la cantidad de neuroesferas formadas en cada día de cultivo, cotejándolas con el número inicial de células vivas y obteniendo los valores de UFN para el método estándar y comparándolos con el control y los métodos ensayados en el presente trabajo (Figura 26).



**Figura 26.** Gráfico de Unidades Formadoras de Neuroesferas para las CMNEs criopreservadas a ambas velocidades mediante metodología de enfriamiento lento y mediante el método estándar, y su relación con el diámetro de las neuroesferas formadas.

A través de este gráfico, se puede corroborar lo postulado anteriormente acerca de que el rendimiento de neuroesferas generadas es notablemente menor en términos de valores absolutos, para aquellas células congeladas y preservadas (en freezer a -80 °C) mediante la metodología estándar. Esto probablemente se deba a que el método de preservación afecta alguno de los mecanismos relacionados con la capacidad proliferativa de gran parte de la muestra, si bien cabe destacar que para aquellas

células no afectadas, la proliferación es prácticamente normal. Además, la temperatura de almacenamiento de -80 °C también juega un papel central en el deterioro de las células y sus mecanismos proliferativos, ya que no es lo suficientemente baja como para detener completamente los fenómenos fisicoquímicos y reacciones enzimáticas nocivos para las células.

Para obtener resultados respaldados estadísticamente, se deberá aumentar el número de experimentos de criopreservación mediante la metodología estándar.

# **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

## 5) DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En los últimos años, la demanda de órganos, tejidos y células en el campo de la reparación de tejidos ha aumentado notablemente, mientras que el número de órganos disponibles y ablaciones ha permanecido prácticamente estático. Por tal motivo, se espera que la medicina regenerativa, incluyendo las terapias basadas en células madre, pueda satisfacer esta necesidad proporcionando a la vez tratamientos novedosos para enfermedades actualmente incurables [51].

Respecto a las enfermedades que afectan el sistema nervioso, con el descubrimiento de las células madre neurales surgió una nueva posibilidad para el tratamiento de las mismas. Sin embargo, la cantidad de CMNs requerida para la investigación y tratamientos es muy elevada. Por tal motivo, la capacidad de criopreservarlas eficientemente sería de gran utilidad para su adecuado almacenamiento a largo plazo, permitiendo de esta manera la utilización de las células en cualquier momento. Además, se evitaría la degeneración y senescencia de las mismas y la variación de la identidad del cultivo debido a contaminaciones microbianas y al mantenimiento del mismo por sucesivos pasajes durante largos períodos de tiempo [38]. A pesar del gran auge en la utilización de estas células, no se ha desarrollado aún un protocolo estándar de preservación [50].

Idealmente, las técnicas de criopreservación para almacenamiento de CMNEs deberían permitir una alta viabilidad celular, mantener la esterilidad del cultivo sin perjudicar las propiedades funcionales de las células [54]. Actualmente, los dispositivos comerciales diseñados para el congelamiento de muestras biológicas consisten en un contenedor con baño de isopropanol (tipo Mr. Frosty<sup>®</sup>) refrigerado en un freezer a -80 °C, o envases de plástico refrigerados con dióxido de carbono sólido. Aunque estos sistemas son de gran utilidad, solamente permiten operar a una velocidad de enfriamiento de 1 °C/ min y además se ha demostrado que tienen bajo rendimiento y efectividad en cuanto a la preservación de CMNEs [29]. Por lo tanto, el desarrollo de otros procedimientos de criopreservación adecuados constituye un desafío que

involucra el estudio y determinación de la composición óptima del medio de congelamiento, los protocolos de enfriamiento y calentamiento, la selección del ACP, determinación de su carga en la muestra y de su dilución/ remoción. Esta selección se vuelve aún más compleja debido al hecho de que los pasos de procesamiento son interdependientes y, por lo tanto, no pueden ser optimizados separadamente [27].

Es por ello que los pasos previos al enfriamiento y ciertos parámetros como ser el tipo y concentración de ACP, el tiempo y la temperatura de incubación del mismo con las CMNEs y la velocidad y temperatura de remoción fueron optimizados durante el trabajo de tesina de la Lic. Andrea Mendía en el CAIC. En este trabajo previo se evaluaron diversas alternativas, de manera de elegir las condiciones más favorables para el posterior enfriamiento y que a la vez resultaran menos nocivas a las células, permitiéndoles mantener sus propiedades y características intactas.

A partir de las condiciones establecidas previamente (DMSO como ACP, concentración 10 %, incubación 20 minutos a 30 °C), en el presente trabajo se propuso analizar distintas velocidades de enfriamiento de las CMNEs y evaluar el impacto de las mismas sobre distintas características celulares como ser la viabilidad, el rendimiento, la morfología, la capacidad de proliferación y diferenciación, con el objetivo de seleccionar las mejores condiciones para establecer un protocolo definido de criopreservación de las células madre neurales a temperaturas subcero.

En primer lugar, el estudio y evaluación del cultivo de las CMNEs como neuroesferas en condiciones control, es decir, sin criopreservar, nos permitió establecer el grado de proliferación normal de las mismas. Así, pudimos determinar que el crecimiento adopta una cinética exponencial para células de primer pasaje hasta el día de división 6, donde es notable el retraso en la proliferación, probablemente debido a la dificultad de difusión de oxígeno y nutrientes hacia el centro de la neuroesfera. Además pudimos observar que luego de un pasaje (disgregación enzimática y mecánica), las células se encuentran más adaptadas al medio y condiciones de cultivo *in vitro*, con mayor proliferación, que se evidencia por los mayores diámetros en los primeros 4 días de iniciado el segundo pasaje. A partir del cuarto día de cultivo parecería que el diámetro de la NE deja de aumentar. Esto podría deberse a que se produce la muerte



de las células en el interior de la neuroesfera, por falta de nutrientes y escasa difusión de oxígeno a tales densidades celulares; además del número finito de divisiones característico de cualquier cultivo primario de células. También puede deberse a que, luego de varios pasajes, las CMNEs podrían sufrir acortamiento de los telómeros, induciendo el cese de la proliferación celular, una neurogénesis disminuida y por último, senescencia [56]. El cambio en el diámetro de las NEs en función del tiempo nos da una idea de la velocidad de proliferación de las mismas, siendo esta mayor para las CMNEs de segundo pasaje hasta el inicio de la fase plateau.

A partir del registro de la temperatura durante todo el procedimiento de enfriamiento lento, se pudo mantener un control estricto de la misma de manera de corroborar que las condiciones sean equivalentes y comparables a lo largo de todos los experimentos realizados y de poder detectar posibles problemas durante el proceso, que pudieran tener un impacto posterior en los resultados. Esto nos permitió también determinar los parámetros más importantes como por ejemplo, la velocidad de enfriamiento y la temperatura de nucleación que, si bien es espontánea, debe conocerse para corroborar que se encuentre dentro del rango normal establecido para el tipo de muestra y solución de criopreservación utilizados.

Luego de realizados los experimentos de preservación a las dos velocidades de enfriamiento determinadas ( $3.3 \pm 0.7$  y  $6.3 \pm 0.5$  °C/ min) y almacenando las muestras durante dos períodos de tiempo establecidos (menor a 50 días y mayor a 60 días, debido a que en el IBR se observaban menores rendimientos de CMNEs viables a medida que el tiempo de almacenamiento aumentaba), nos enfocamos en comparar las variables del proceso de manera de identificar aquella condición que sea más favorable y que permita determinar un protocolo óptimo de criopreservación.

Como paso inicial para ello, medimos viabilidad luego del descongelamiento de las CMNEs en baño a 37 °C, mediante el test de exclusión del colorante Azul tripán. Dicha prueba permite visualizar integridad de membrana y calcular la relación entre células viables y no viables. Los resultados obtenidos fueron comparados con los datos control, observando una disminución significativa de la viabilidad para todas las condiciones evaluadas, aunque obteniendo valores siempre por encima del 80 %, lo

cual indica que la técnica en sí no produce daños excesivos a las células. Este dato no es menor, debido a que supera a muchos de los resultados registrados en la bibliografía para otros métodos de preservación del mismo tipo celular aquí estudiado [38, 42, 44, 54].

El rendimiento es otro de los parámetros calculados, que puede reflejar de una mejor manera el desempeño de la técnica y de las condiciones planteadas. En este caso, no se observaron diferencias significativas al comparar ambas velocidades entre sí, aunque sí se notaron diferencias entre los tiempos de almacenamiento propuestos para cada velocidad, resultados desconcertantes debido a que teóricamente ningún fenómeno ocurre por debajo de  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Luego de investigar con mayor profundidad y de revisar los pasos realizados durante el proceso global, se logró dilucidar la posible causa de tal observación, siendo la misma una inadecuada manipulación de las muestras almacenadas dentro del termo de nitrógeno líquido. Debido al formato del tanque y a la forma de almacenamiento de varias muestras distintas en una misma cánula, al retirar el mismo para descongelar muestras de un experimento, se exponían las otras al medio exterior, sufriendo éstas un intercambio de calor con el medio, lo cual produjo un aumento de la temperatura a  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$  en cuestión de un minuto, con la posterior disminución de la temperatura hasta  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  por el ingreso al termo de nitrógeno líquido nuevamente. Este proceso probablemente haya permitido reacciones o sucesos nocivos para las células, como por ejemplo el crecimiento de cristales de hielo mediante el fenómeno de recristalización con el consecuente daño mecánico a las membranas y finalmente, la lisis celular.

En base a lo observado y a que se corroboró que el tiempo de almacenamiento no afectaba otras propiedades celulares además del rendimiento, el resto de los resultados se expresaron comparando solamente las dos velocidades de enfriamiento.

Con respecto al cultivo de las CMNEs tanto en condiciones de proliferación como de diferenciación, el objetivo fue analizar el desempeño de las mismas luego del proceso de congelamiento/ descongelamiento, de manera de detectar si el mismo afectaba alguna de las funciones celulares requeridas para el crecimiento y expansión tanto simétrica, originando nuevas células madre como asimétrica, es decir, la

diferenciación para originar alguno de los tipos celulares principales del sistema nervioso. En cuanto a la proliferación, se observó una disminución significativa en el tamaño de las neuroesferas a partir del día 4 - 5 de cultivo, siendo la diferencia más significativa en el caso de la velocidad más alta. Como las diferencias se observan tardíamente en el cultivo, podríamos decir que no se estaría afectando la velocidad inicial de proliferación; probablemente se vea afectado el número de replicaciones hasta alcanzar el plateau. El rendimiento de la proliferación, determinado mediante el cálculo de UFN no se vio afectado en ninguno de los dos casos, mientras que la capacidad de diferenciación de las CMNEs en neuronas y astrocitos se vió levemente modificada, denotando una disminución en el número de células diferenciadas a neuronas y un aumento de la cantidad de células diferenciadas a astrocitos. Tales resultados pueden deberse a que durante el proceso de criopreservación se afecte algún punto de la vía de neurogénesis, favoreciendo además la vía de diferenciación a astrocitos. A partir de lo obtenido podemos decir que la preservación por este método prácticamente no afecta las características de ambos tipos de división de las células.

La morfología es otra característica importante a tener en cuenta en la evaluación de la técnica y la selección de un protocolo definido. Como se conoce mediante tinciones morfológicas de CMNEs control, las mismas presentan forma esférica en su mayoría y un núcleo voluminoso, que ocupa gran parte del citoplasma. Realizando las mismas tinciones para células preservadas a la velocidad de 3.3 °C/ min y luego descongeladas y recuperadas en medio fresco durante 30 minutos aproximadamente, pudimos comparar las imágenes obtenidas con aquellas del control, sin evidenciar diferencias significativas y concluyendo que la técnica de congelamiento no está afectando o deformando la morfología de las células.

Por último, se procedió a realizar un paralelismo entre el método estándar aplicado actualmente por algunos laboratorios para preservar las CMNEs, es decir, congelamiento y almacenamiento en freezer a -80 °C y el método estudiado en el presente trabajo. Para ello, se construyó una curva de proliferación de las células preservadas con el método estándar, comparándola luego con aquellas curvas obtenidas para el control y para las dos velocidades analizadas de enfriamiento lento.

Aquí se pudo observar claramente una diferencia significativa al inicio del cultivo, probablemente debido a que las células sufran mayores daños y requieran más tiempo para adaptarse y recuperarse luego del descongelamiento. Adicionalmente, es muy notable en términos de valores absolutos, la diferencia entre el rendimiento obtenido mediante UFN para el método estándar y el de enfriamiento lento, siendo mucho menor para el primero de ellos. Este resultado refleja que no solamente las células puedan requerir mayores tiempos de recuperación, sino que muchas de ellas, a pesar de estar vivas, pierden su capacidad de expansión y proliferación como neuroesferas. Se propone aumentar el número de experimentos de criopreservación mediante el método estándar, para llegar a resultados más claros y concisos.

Si bien con ambas velocidades ensayadas de enfriamiento lento se lograron obtener buenos resultados, se deja entrever una tendencia a que las propiedades celulares sean más conservadas y similares a las de las CMNEs control mediante el enfriamiento a velocidad de 3.3 °C/ min. Por el momento, se propone dicha velocidad como adecuada para el establecimiento de un protocolo estándar de criopreservación de dicho tipo celular mediante la técnica de enfriamiento lento, aunque también se enfatiza la necesidad de continuar con experimentos en el tema, de manera de corroborar lo obtenido hasta el momento e incluso estudiar nuevas propiedades celulares mediante otro tipo de experimentos. Además se destaca la importancia de mantener buenas prácticas de manipulación de las muestras sometidas a temperaturas criogénicas, a fin de evitar efectos adversos sobre las mismas y de mantener homogeneidad en las condiciones a las cuales se las expone, de manera de que no haya variaciones significativas en el rendimiento final.

Debido a que diferentes tejidos y células reaccionan de manera diversa al proceso de congelamiento, los resultados obtenidos en este trabajo posiblemente sean aplicables solo a la preservación de CMNEs de ratón. Los parámetros de enfriamiento ideales a veces dependen de factores contradictorios y desconocidos, los cuales deben determinarse experimentalmente de manera de evitar el choque térmico, el incremento de las concentraciones salinas a niveles destructivos y la alteración del estado coloidal de la estructura celular. En cuanto a la velocidad de enfriamiento, la óptima será aquella

que maximice la supervivencia para cada tipo celular y, a su vez, evite la formación de hielo intracelular así como también la deshidratación excesiva, fenómenos capaces de dañar irreversiblemente a las células [6].

Finalmente, podemos decir que el requerimiento del desarrollo de metodologías de criopreservación más eficaces, en base a los campos emergentes del bioprocesamiento y de las terapias celulares, se ha vuelto crítico. Las estrategias actuales se enfocan en la minimización del daño por estrés fisicoquímico y la disrupción de la membrana, asociados con la formación de hielo tanto extra como intracelular que ocurre durante el proceso de congelamiento-descongelamiento. Los protocolos derivados de este paradigma conceptual, sin embargo, deben aún ser mejorados [8]. Muchos parámetros podrían optimizarse incluso más, así como probarse nuevas combinaciones de los mismos, o incluso modificar ciertas estrategias. Queda abierta la profundización de la investigación en dicho campo, para nuevas mejoras y modificaciones del protocolo de preservación de CMNEs.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## 6) BIBLIOGRAFÍA

1. Ahlenius, H. & Kokaia, Z. (2010). Isolation and generation of neurosphere cultures from embryonic and adult mouse brain. *Methods Mol Biol*, 241-252.
2. Ahmed, S. (2009). The culture of neural stem cells. *J Cell Biochem*, 106(1), 1-6.
3. Alenzi, F.; Bahkali, A. (2011). Stem cells: Biology and clinical potential. *Afr J Biotechnol* 10 (86): 19929–40.
4. Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J. M. & Tramontin, A. D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci*, 2(4), 287-293.
5. Babu, H., Cheung, G., Kettenmann, H., Palmer, T. D. & Kempermann, G. (2007). Enriched monolayer precursor cell cultures from micro-dissected adult mouse dentate gyrus yield functional granule cell-like neurons. *PLoS One*, 2(4), e388.
6. Bakhach, J. (2009). The cryopreservation of composite tissues: principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis*, 5(3), 119-126.
7. Baust, J. M. (2002). Molecular mechanisms of cellular demise associated with cryopreservation failure. *Cell Preserv Technol*, 1(1), 17-31.
8. Baust, J. M., Vogel, M. J., Van Buskirk, R. & Baust, J. G. (2001). A molecular basis of cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival. *Cell Transplant*, 10(7), 561-571.
9. Bergström, T. & Forsberg-Nilsson, K. (2012). Neural stem cells: brain building blocks and beyond. *Ups J Med Sci*, 117(2), 132-142.
10. Berz, D., McCormack, E. M., Winer, E. S., Colvin, G. A. & Quesenberry, P. J. (2007). Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J Hematol*, 82(6), 463-472.
11. Bonnamain, V., Neveu, I. & Naveilhan, P. (2012). Neural stem/ progenitor cells as promising candidates for regenerative therapy of the central nervous system. *Front Cell Neurosci*, 6.
12. Brand, A. H. & Livesey, F. J. (2011). Neural stem cell biology in vertebrates and invertebrates: more alike than different?. *Neuron*, 70(4), 719-729.

13. Chojnacki, A. K., Mak, G. K. & Weiss, S. (2009). Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both?. *Nat Rev Neurosci*, 10(2), 153-163.
14. Clarke, D. L., Johansson, C. B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlström, H., Lendahl, U. & Frisen, J. (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*, 288(5471), 1660-1663.
15. Costa, M. R., Kessarlis, N., Richardson, W. D., Götz, M., Hedin-Pereira, C. (2007) The Marginal Zone/Layer I as a Novel Niche for Neurogenesis and Gliogenesis in Developing Cerebral Cortex. *J Neurosci*; 27: 11376-11388.
16. De Filippis, L. & Binda, E. (2012). Concise review: self-renewal in the central nervous system: neural stem cells from embryo to adult. *Stem Cells Transl Med*, 1(4), 298-308.
17. Draper, J. S. & Andrews, P. W. (2002). Embryonic stem cells: advances toward potential therapeutic use. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 14(3), 309-315.
18. Elkabetz, Y. & Studer, L. (2008). Human ESC-derived neural rosettes and neural stem cell progression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 377-387.
19. English, D., Sharma, N. K., Sharma, K. & Anand, A. (2013). Neural stem cells-trends and advances. *J Cell Biochem*, 114(4), 764-772.
20. Flax, J. D., Aurora, S., Yang, C., Simonin, C., Wills, A. M., Billingham, L. L., Jendoubi, M., Sidman, R. L., Wolfe, J. H., Kim, S. U. & Snyder, E. Y. (1998). Engraftable human neural stem cells respond to development cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat Biotechnol*, 16(11), 1033-1039.
21. Fowler, A. & Toner, M. (2006). Cryo-injury and biopreservation. *Ann N Y Acad Sci*, 1066(1), 119-135.
22. Fuchs, E. & Segre, J. A. (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell*, 100(1), 143-155.
23. Fuller, B. J. (2004). Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*, 25(6), 375-388.
24. Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, 287(5457), 1433-1438.



25. Gil-Perotín, S., Duran-Moreno, M., Cebrián-Silla, A., Ramírez, M., García-Belda, P. & García-Verdugo, J. M. (2013). Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay. *Anat Rec*, 296(9), 1435-1452.
26. Gritti, A., Galli, R. & Vescovi, A. L. (2008). Clonal analyses and cryopreservation of neural stem cell cultures. *Methods Mol Biol*, 173-184.
27. Higgins, A. Z., Cullen, D. K., LaPlaca, M. C. & Karlsson, J. O. (2011). Effects of freezing profile parameters on the survival of cryopreserved rat embryonic neural cells. *J Neurosci Methods*, 201(1), 9-16.
28. Hubel, A. (1997). Parameters of cell freezing: implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfus Med Rev*, 11(3), 224-233.
29. J. de Paz, L., Robert, M. C., Graf, D. A., Guibert, E. E. & Rodriguez, J. V. (2015). Design of a Simple Slow Cooling Device for Cryopreservation of Small Biological Samples. *CryoLetters*, 36(6), 363-371.
30. Karlsson, J. O. & Toner, M. (1996). Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*, 17(3), 243-256.
31. Kennea, N. L. & Mehmet, H. (2002). Neural stem cells. *J Pathol*, 197(4), 536-550.
32. Kintner, C. (2002). Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells. *J Neurosci*, 22(3), 639-643.
33. Kriegstein, A. & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*, 32, 149-184.
34. Kuleshova, L. L., Tan, F. C. K., Magalhaes, R., Gouk, S. S., Lee, K. H. & Dawe, G. S. (2009). Effective cryopreservation of neural stem or progenitor cells without serum or proteins by vitrification. *Cell transplant*, 18(2), 135-144.
35. Liu, J., Phy, J. & Yeomans, E. (2012). Theoretic considerations regarding slow cooling and vitrification during cryopreservation. *Theriogenology*, 78(8), 1641-1652.
36. Louis, S. A., & Reynolds, B. A. (2005). Generation and differentiation of neurospheres from murine embryonic day 14 central nervous system tissue. *Methods Mol Biol*, 265-280.

37. Lyashenko, T. D. & Sukach, A. N. (2011). The Effect of DMSO of Different Concentrations and Freeze-Thawing on Newborn Rat Neural Cell Survival. *Probl Cryobiol Cryomed*, 21(3), 263-273.
38. Ma, X. H., Shi, Y., Hou, Y., Liu, Y., Zhang, L., Fan, W. X., Ge, D., Liu, T. Q. & Cui, Z. F. (2010). Slow-freezing cryopreservation of neural stem cell spheres with different diameters. *Cryobiology*, 60(2), 184-191.
39. Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol Cell Physiol*, 247(3), C125-C142.
40. McGann, L. E. (1979). Optimal temperature ranges for control of cooling rate. *Cryobiology*, 16(3), 211-216.
41. McKay, R. (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science*, 276(5309), 66-71.
42. Milosevic, J., Storch, A. & Schwarz, J. (2005). Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells. *Stem cells*, 23(5), 681-688.
43. Motta, J. P. R., Paraguassú-Braga, F. H., Bouzas, L. F. & Porto, L. C. (2014). Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. *Cryobiology*, 68(3), 343-348.
44. Nishiyama, Y., Iwanami, A., Kohyama, J., Itakura, G., Kawabata, S., Sugai, K., Nishimura, S., Kashiwagi, R., Yasutake, K., Isoda, M., Matsumoto, M., Nakamura, M. & Okano, H. (2016). Safe and efficient method for cryopreservation of human induced pluripotent stem cell-derived neural stem and progenitor cells by a programmed freezer with a magnetic field. *Neurosci Res*, 107, 20-29.
45. Palmer, T. D., Takahashi, J. & Gage, F. H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci*, 8(6), 389-404.
46. Paspala, S., Murthy, T., Mahaboob, V. & Habeeb, M. (2011). "Pluripotent stem cells – A review of the current status inneuralregeneration". *Neurology India* 59(4): 558–65.
47. Paynter, S. J. (2008). Principles and practical issues for cryopreservation of nerve cells. *Brain Res Bull*, 75(1), 1-14.

48. Reekmans, K., Praet, J., Daans, J., Reumers, V., Pauwels, P., Van der Linden, A., Berneman, Z. N. & Ponsaerts, P. (2012). Current challenges for the advancement of neural stem cell biology and transplantation research. *Stem Cell Rev and Rep*, 8(1), 262-278.
49. Reynolds, B. A. & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255(5052), 1707-1710.
50. Robert, M. C., J. de Paz, L., Graf, D. A., Gazzin, S., Tiribelli, C., Bottai, H. & Rodriguez, J. V. (2016). Cryopreservation by slow cooling of rat neuronal cells. *Cryobiology*, 72(3), 191-197.
51. Sharp, D. M., Picken, A., Morris, T. J., Hewitt, C. J., Coopman, K. & Slater, N. K. (2013). Amphipathic polymer-mediated uptake of trehalose for dimethyl sulfoxide-free human cell cryopreservation. *Cryobiology*, 67(3), 305-311.
52. Spindler, R., Wolkers, W. F. & Glasmacher, B. (2011). Dimethyl sulfoxide and ethylene glycol promote membrane phase change during cryopreservation. *CryoLetters*, 32(2), 148-157.
53. Stéphenne, X., Najimi, M. & Sokal, E. M. (2010). Hepatocyte cryopreservation: is it time to change the strategy?. *World J Gastroenterol: WJG*, 16(1), 1.
54. Tan, K., Chee, F., Lee, K. H., Gouk, S. S., Magalhães, R., Poonepalli, A., Hande, M. P., Dawe, G. S. & Kuleshova, L. L. (2007). Optimization of cryopreservation of stem cells cultured as neurospheres: comparison between vitrification, slow-cooling and rapid cooling “freezing” protocols. *CryoLetters*, 28(6), 445-460.
55. Taupin, P. (2009). Cryopreservation of early postmitotic neuronal cells in culture: The University of Georgia Research Foundation, Inc.: US20080274446A1. *Expert Opin Ther Pat*, 19(2), 265-268.
56. Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature*, 414(6859), 112-117.
57. Tropepe, V., Sibilina, M., Ciruna, B. G., Rossant, J., Wagner, E. F. & van der Kooy, D. (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol*, 208(1), 166-188.

58. Trounson, A. (2006). The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev*, 27(2), 208-219.
59. Wayne, R. ImageJ. Programa de procesamiento de imagen digital de dominio público programado en Java.
60. Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J. A. & Jessell, T. M. (2002). Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*, 110(3), 385-397.
61. Xu, X., Warrington, A., Bieber, A. & Rodriguez, M. (2012). Enhancing Central Nervous System RepairThe Challenges. *CNS Drugs* 25 (7): 555–73. Doi: 10.2165/11587830 (inactive 2015-02-01).
62. Zhang, S. C. (2006). Neural subtype specification from embryonic stem cells. *Brain Pathol*, 16(2), 132-142.