



Criopreservación/Descongelación de Células Mononucleares Humanas.

Created: Jul 16, 2008; Last modified: Nov 15, 2013, Version: 3.0

La criopreservación de células mononucleares (CMN) permite almacenar alícuotas celulares por largo tiempo sin la necesidad de mantenerlas en cultivo perpetuo. Idealmente las CMN deben someterse al procedimiento de transformación para generar líneas celulares tan pronto como llegan al laboratorio. No obstante, el procesamiento de múltiples muestras no es práctico o técnicamente factible. La criopreservación de CMN frescas permite diferir el procesamiento ulterior y organizar las actividades de transformación para no sobrecargar los recursos y necesidades del laboratorio. Para preservar la viabilidad de las CMN criopreservadas hace falta emplear sustancias crioprotectoras como el Dimetil Sulfóxido (DMSO) y Suero Bovino Fetal (FBS) al igual que de un procedimiento escalonado de congelación. Por regla general se recomienda una tasa lenta de congelación a razón de 1°C por minuto y una tasa de descongelación rápida (a 37°C por 2 minutos). La descongelación de CMN es un procedimiento muy sencillo pero no se recomienda realizarlo en más de 2 muestras a la vez, ya que el DMSO es tóxico para las CMN a temperatura ambiente. Si se piensa procesar más de dos muestras retire los crioviales del tanque de LN₂ y colóquelos rápidamente en el ultracongelador a -80°C. Estos crioviales no deberán permanecer a esta temperatura por más de una hora. Las CMN deberán criopreservarse a razón de 2-5x10⁶ células/mL de solución de criopreservación.

Procedimiento (criopreservación)

1. Prepárese con anterioridad alícuotas de la solución de criopreservación agregando 500 µL de FBS + 100 µL de DMSO a crioviales de 1.5 mL (ver nota #1). Almacénelos en el congelador a -20°C.
2. Recupere una cantidad apropiada de crioviales con solución de criopreservación y descongélelos a temperatura ambiente. Una vez descongelados homogeneice la solución y manténgalos bajo hielo a -4°C.
3. Rotule cada criovial con los siguientes datos: ID único, fecha, número de células totales en el criovial expresadas en millones y porcentaje de viabilidad. Por Ejemplo: MXSLP00001, 20AGO08, 3.5, 90%. Coloque y mantenga los crioviales bajo hielo (ver nota #2).
4. Corrija la concentración celular obtenida del procedimiento de aislamiento de CMN a 5x10⁶ CMN/mL con RPMI-1640.
5. Agregue 1 mL de la suspensión de CMN a 5x10⁶ células/mL al criovial que contiene la solución de criopreservación. Repita este mismo procedimiento hasta procesar la totalidad de las células extraídas.
6. Homogeneice la mezcla de CMN y solución de criopreservación por agitación gentil y manténgase en hielo a -4°C.
7. Coloque los crioviales en el congelador de -20°C durante al menos 2 horas.





8. Transfiera los crioviales al ultracongelador (-80°C) durante al menos 8 horas (NOTA: pero no más de 24 hrs).
9. Transfiera los crioviales al tanque #1 de LN₂ en fase líquida a -196°C (ver nota #3).

Procedimiento (descongelación)

1. Descongele una cantidad apropiada de RPMI-1640 a 37°C calculando el volumen a razón de 10 mL por criovial.
2. Retire los crioviales del tanque de nitrógeno líquido y descongélelos parcialmente agitando en baño de agua a 37°C durante exactamente 2 minutos. ¡No deben descongelarse por completo a temperatura ambiente! Una vez que se hayan descongelado parcialmente deberán colocarse en hielo.
3. Añada 8 mL de RPMI-1640 a 37°C a un tubo de fondo redondo de 12 mL.
4. Permita que el criovial con CMN se termine de descongelar por completo bajo hielo e inmediatamente decante el contenido del criovial al tubo de cultivo de fondo redondo.
5. Enjuague el criovial cuantas veces sea necesario con 2 mL de RPMI-1640 vertiendo su contenido al tubo de fondo redondo con el objeto de recuperar la mayor parte de las células criopreservadas.
6. Centrifugue el tubo de fondo redondo a 400 G por 10 minutos programando la centrifuga para una desaceleración sin freno (Programa automático #2, CL31 del Cuarto de Cultivo Celular).
7. Deseche el sobrenadante por decantación directa a un frasco de descontaminación con NaOCl al 0.5%. Resuspenda las CMN en el RPMI remanente y afore a 1 mL con RPMI-1640.
8. Proceda a realizar el conteo de células y a evaluar su viabilidad de acuerdo al protocolo de “*Conteo y Viabilidad*”.
9. Ajuste la concentración de CMN entre 2×10^6 y 10×10^6 células/mL y proceda con el protocolo de transformación descrito en “*Transformación Celular*” (ver nota #4).

Notas

1. La composición final del medio de criopreservación deberá ser: 50% SBF, 40% RPMI-1640 y 10% DMSO.





2. Todos los pasos del procedimiento deben llevarse a cabo en hielo, ya que el DMSO resulta tóxico para las CMN a mayores temperaturas.
3. Acerque el tanque de LN₂ al ultracongelador de -80°C ya que el último paso debe realizarse rápidamente.
4. Colóquese el tubo con las CMN descongeladas en la incubadora a 37°C con 5% de CO₂ y humedad relativa de 95% mientras se dá inicio al proceso de transformación. ¡No deberán permanecer en la incubadora por más de 6 horas sin procesar!

Referencias

1. Cheng, L, et al. Cryopreserving Whole Blood for Functional Assays Using Viable Lymphocytes in Molecular Epidemiology Studies. *Cancer Letters* 166 (2001) 155-163.
2. Mayor N, Marsh SGE. EBV Supernatant Production, Protocol for BLCL Generation. Anthony Nolan Research Institute. University College and Royal Free Hospital School of Medicine, London, United Kingdom.
3. Gorodezky C, et al. Manual de Procedimientos Serológicos y Celulares de Histocompatibilidad. Departamento de Inmunología e Inmunogenética del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), México 2007.

Revision history

- 1.0 Original document.
- 2.0 Optimized protocol.
- 3.0 Changes to document format only.

