

# ACTUALIZACIÓN

## Mecanismo de Lesión Tisular en Criocirugía

Ricardo Julio Dittrich

Especialista en Clínica Quirúrgica

### Resumen

La criocirugía, modalidad efectiva de tratamiento médico, es una técnica quirúrgica que emplea la congelación a temperaturas criogénicas para destruir tejidos biológicos no deseados. El objetivo de la criocirugía es congelar un determinado volumen tisular (para maximizar la destrucción celular) en una región predefinida y provocar necrosis sin daño significativo del tejido sano periférico. Las bases de la criocirugía son: "una rápida congelación, una lenta y completa descongelación, y repetición de los ciclos de congelación-descongelación". Para explicar el daño en una criolesión se han propuesto muchos mecanismos de injuria inducidos por la congelación. Los mecanismos son: (a) lesión celular directa, (b) lesión vascular, (c) apoptosis y (d) lesión inmunológica. La lesión que resulta de la criocirugía es compleja; por lo tanto, para controlar el resultado de este procedimiento es necesario comprender los mecanismos de daño en criocirugía.

**Palabras Clave:** criocirugía, mecanismos, lesión tisular.

### Mechanisms of Tissue Injury in Cryosurgery

#### Summary

Cryosurgery, an effective medical treatment modality, is a surgical technique that employs freezing at cryogenic temperatures to destroy undesirable biological tissue. The goal of cryosurgery is to freeze a specified volume of tissue (to maximize cell destruction) within a predefined target region, resulting in necrosis without significant damage to the surrounding healthy tissues. Factors that facilitate this are: rapid freezing, slow and complete thawing, and repetition of the freeze-thaw cycle. To explain the injury within a cryolesion, many freezing induced injury mechanisms have been proposed. These mechanisms are 1) direct cell injury, 2) vascular injury, 3) cellular apoptosis, and 4) immunologic injury. The injury that results from cryosurgery is complex; therefore, to control the outcome of cryosurgery it is necessary to understand the mechanisms of damage in cryosurgery.

**Key Words:** cryosurgery, mechanisms, tissue injury.

La aplicación del frío para tratar diferentes patologías es un método tan antiguo como la propia medicina de Hipócrates, que recomendaba la aplicación local del frío para reducir la inflamación, o de Galeo, quien descubre las propiedades analgésicas locales del frío para disminuir la sensación dolorosa.<sup>1</sup>

El conocimiento teórico, experimental y clínico, proporciona evidencia de los buenos resultados obtenidos con este método y está haciendo posible tratar con éxito una amplia gama de patologías (benignas, premalignas y malignas) en diferentes especialidades médicas, sola o combinada con técnicas quirúrgicas convencionales. Las áreas tratadas incluyen piel, estómago, hígado, hueso, aparato respiratorio, mama, patología ocular, región genitourinaria y ano rectal, entre otras.<sup>2</sup>

En la era moderna de la criocirugía se fijaron las bases de la técnica, estableciendo una "rápida congelación", una "lenta y completa descongelación" y la "repetición del ciclo congelación-descongelación".<sup>3,4</sup>

La lesión que resulta de la criocirugía, al ser compleja, es tema de varias investigaciones. Así, para obtener un adecuado resultado con este procedimiento es necesario comprender los mecanismos de injuria en criocirugía. La respuesta tisular a la aplicación local de un criógeno varía con la intensidad de la lesión inducida por frío. Una lesión criogénica leve produce una respuesta tisular inflamatoria; pero ante una lesión criogénica de mayor intensidad se produce necrosis tisular, requisito primario para la destrucción de una neoplasia.<sup>5</sup>

La crionecrosis (criolesión), respuesta celular a la congelación tisular localizada, es un proceso multifactorial ocasionado por diversos mecanismos:<sup>2,6,7</sup> 1) inmediato, celular o directo; 2) tardío o vascular; 3) apoptosis celular y 4) inmunológico.

**1. Lesión Celular Directa.** Cuando la temperatura tisular desciende a rango de hipotermia leve (de 0°C a -5°C), el efecto producido en la célula es reversible, ya que los sistemas biológicos no se congelan por la alta concentración de sustancias diluidas, pero sí pueden dañarse (ej.: melanocitos).<sup>7,8</sup> Si llega a rangos mayores (de -6°C a -20°C) se inicia la formación de hielo en el líquido extracelular (EC).<sup>9</sup> con enfriamiento pero sin congelación de la célula y su contenido, por la acción protectora de la membrana celular.<sup>10</sup> Cuando disminuye más la temperatura (> -30°C) y se inicia la formación de cristales de hielo intracelular, el proceso se torna irreversible (≥ -40°C)

**Correspondencia:** Ricardo Julio Dittrich  
E-mail: rdittrich@intramed.net

con la consecuente muerte celular.

Cuando el agua se transforma a hielo ("fase de transición"), posee la propiedad de expandirse, de rechazar solutos (aumenta su concentración) y proteínas.<sup>11</sup> El aumento de la concentración de solutos produce: a) disminución del punto de congelación de la solución restante no congelada; b) gradiente de presión osmótica a través de la membrana celular; c) aumento de precipitación y desnaturalización de proteínas; d) disminución del pH, que acelera la oxidación lipídica y la desnaturalización proteica; y e) disminución de la estabilidad de las grasas.<sup>12,13</sup>

En 1956, Meryman<sup>14</sup> describe el efecto de la destrucción celular como consecuencia de la alteración del estado físico del agua que, de estar en una fase líquida (biológicamente inactiva), se transforma a sólida, con formación de cristales de hielo y modificación de la concentración de electrolitos. Así, el daño celular, con alteración de la función, del metabolismo y de la estructura, comienza cuando la temperatura declina dentro del rango hipotérmico por la rápida transferencia de calor producida tras la aplicación local de un criógeno.<sup>3,8,15</sup> Esta fase de transformación, de líquido a sólido, ocasiona el denominado "**shock térmico celular**".

Este shock térmico determina 2 eventos diferentes de muerte celular según la velocidad de congelación, lenta o rápida, aplicada durante un procedimiento criquirúrgico.

#### **A) Velocidad de congelación lenta.**

A velocidad de congelación lenta, hay formación de cristales de hielo en el líquido EC y aumento de la concentración de electrolitos (solutos). Este aumento crea un ambiente hipertónico extracelular que produce un potencial osmótico por el cual las células comienzan a liberar agua hacia el EC y, junto a las organelas, se deshidratan y disminuyen de tamaño. A su vez, hay aumento de la concentración de electrolitos intracelulares, disminución de la temperatura celular, daño de las membranas celulares y de las organelas.<sup>3,4,16,17</sup>

Mientras los cristales de hielo se forman en el EC, los electrolitos aumentan paulatinamente, llegando a concentraciones letales para la célula. Este mecanismo de daño (altas concentraciones de electrolitos) se denomina "daño de soluto" o "efecto soluto".<sup>9</sup>

Meryman<sup>18</sup> propone la hipótesis de "volumen mínimo". Describe que la lenta congelación resulta en lesión celular por la disminución del volumen celular más allá de un volumen crítico. Mientras la célula reduce su tamaño en respuesta al aumento de la osmolalidad EC, la condensación del contenido aumenta la resistencia para que se achique más. Esta condensación produce una diferencia de presión hidrostática a través de la membrana celular, incurriendo en daño de la membrana. Con el tiempo, el encogimiento celular alcanza un máximo, aunque la concentración EC continúe aumentando. Esto forma un gradiente de concentración entre ambos lados y llega un punto en el tiempo cuando el gradiente de concentración es significativo y permite que los solutos del líquido EC pasen a la célula, generando una

fuerza mecánica que daña y destruye las células.<sup>19</sup>

El efecto deletéreo de la deshidratación y alta concentración de electrolitos no siempre es letal para las células; pero, si el efecto soluto se mantiene en el tiempo, la célula muere.<sup>17</sup>

Mazur y col,<sup>20</sup> en su teoría de "Fracción No Congelada", demuestra que durante lentas congelaciones la supervivencia celular es más dependiente de la magnitud de la fracción no congelada de la solución, que de la concentración de solutos en el extracelular.

El efecto soluto y la disminución de temperatura celular causan disminución del pH celular, disminución de reacciones enzimáticas ATP dependientes (son temperatura dependientes), interferencia de procesos bioquímicos, disminución del metabolismo y desestabilización de la membrana celular.<sup>1,4,13,15,21</sup> Estos factores ocasionan el denominado "shock químico celular".

El aumento de la concentración de solutos y la deshidratación daña y debilita el complejo lípido-proteína de la membrana, y aumenta la pérdida de lípidos y fosfolípidos.<sup>18</sup> La disminución del metabolismo es provocado, por las alteraciones enzimáticas y por la disminución de la temperatura. Por cada 1º C que disminuye localmente la temperatura, disminuye el metabolismo tisular aproximadamente un 10-15%.<sup>22</sup>

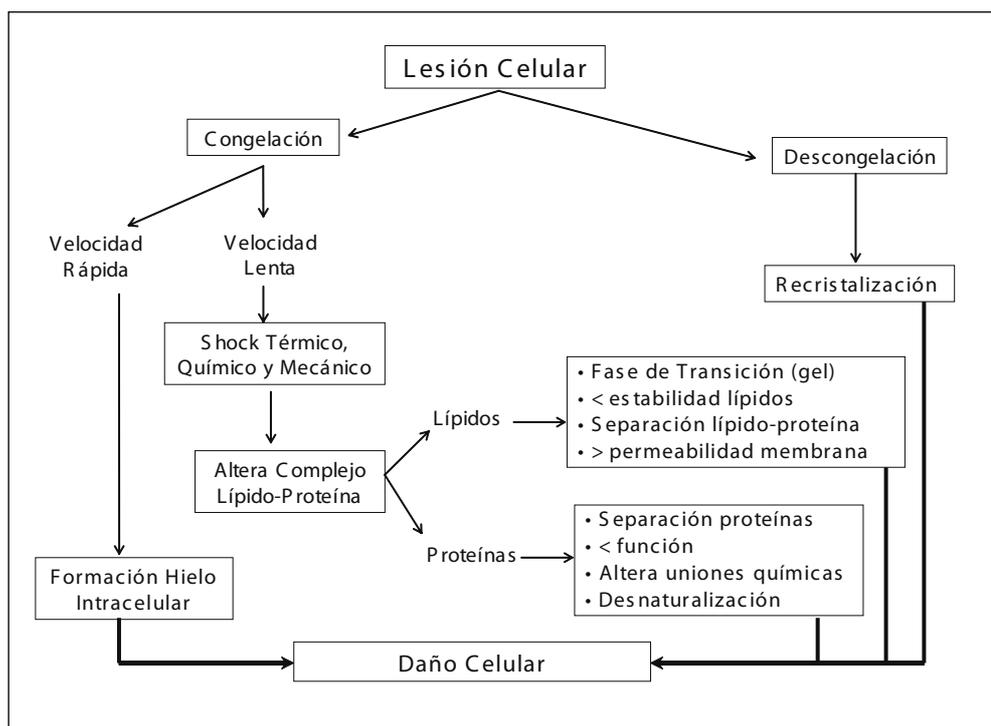
Un mecanismo adicional de daño celular es la "interacción mecánica entre el hielo y la célula". En esta interacción el hielo EC rechaza y comprime las células atrapadas en el espacio entre los cristales de hielo. Esto origina contacto e interacción entre el hielo y la bicapa lipídica (letal), y fuerzas mecánicas de cizallamiento que destruye la célula.<sup>20,23</sup> Este último mecanismo ocasiona el "shock mecánico celular".

La injuria ocasionada por el shock térmico, químico y mecánico, produce alteración de los lípidos y de las proteínas de la membrana y de la célula (Figura 1).

La membrana plasmática, límite DEL compartimiento intracelular y extracelular que controla en forma selectiva el ingreso y egreso de diversas sustancias, es una barrera para la nucleación de hielo y la formación de cristales de hielo a temperaturas menores de -7º C a -10º C.<sup>3,24</sup> Las proteínas de la estructura de bicapa lipídica incluyen, entre otras, moléculas de señalización, canales iónicos y receptores.<sup>24</sup> El citoesqueleto depende de uniones químicas entre las proteínas de membrana y la estructura celular.<sup>4</sup>

A temperaturas fisiológicas, la bicapa lipídica tiene un estado fluido, pero por la acción de la baja temperatura y la consecuente menor energía libre termodinámica, los lípidos de membrana se reorganizan y pasan a una fase de gel (semisólido). Este proceso de "fase de transición de lípidos", al disminuir la estabilidad de los lípidos, altera la estructura de la membrana, provocando separación de complejos lípidos-proteínas y defectos entre las proteínas y la bicapa lipídica. Así, la membrana se vuelve más permeable, altera la actividad de transportadores y enzimas asociados a membrana, y permite un flujo de electrolitos en forma descontrolada 4.

**Figura 1.** Diagrama del mecanismo de lesión inmediato, celular o directo.



Los procesos de vida son reacciones químicas de temperatura dependiente. La acción de la baja temperatura altera y disminuye la función de las proteínas de membrana (bomba de sodio, canales de sodio-calcio, etc.) y su capacidad de controlar el volumen intracelular. Desorganiza también las uniones químicas de las proteínas entre sí y de las proteínas de membrana con la estructura del citoesqueleto. Estas uniones químicas, estables a temperatura fisiológica, se tornan inactivas, inestables y débiles a baja temperatura; resultado en una alteración de la forma de la proteína, que la hace susceptible al daño mecánico e incapaz de interactuar con otras.<sup>4,25</sup>

Las proteínas, al perder su estabilidad, se desnaturalizan. La "desnaturalización" es el proceso por el cual una proteína es transformada desde una forma nativa u ordenada a un estado menos ordenado debido a la reestructuración de las uniones de hidrógeno (estructura secundaria), sin cambios en las uniones covalentes (estructura primaria).<sup>26</sup> Desde la termodinámica, la desnaturalización es vista como la condición cuando suficiente energía es transferida a una proteína nativa de forma tal que altera su estructura molecular.<sup>26</sup> La pérdida de la estructura nativa hace que la proteína sea incapaz de llevar a cabo sus funciones específicas.<sup>11,26</sup>

La desnaturalización proteica, durante la congelación, es leve a temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$  y masiva a  $-80^{\circ}\text{C}$ .<sup>26</sup> Sus principales causas son la deshidratación, exposición de solutos crio-concentrados cuando el agua se cristaliza y la disminución de la temperatura.<sup>4</sup>

#### **B) Velocidad de congelación rápida.**

El segundo evento del shock térmico que se pre-

senta con velocidades de congelación rápida es la "formación de hielo intracelular" (FHI). A mayor velocidad de congelación y menor temperatura lograda, mayor formación (nucleación) de hielo intracelular y más rápida la destrucción celular (shock térmico y mecánico),<sup>13</sup> porque el agua no tiene el tiempo suficiente como para salir de la célula ni para realizar equilibrio osmótico con el medio EC, pues la difusión termal es mucho más rápida que la difusión de masa.<sup>4,12,19</sup>

Cuando disminuye la temperatura ( $\geq -40^{\circ}\text{C}$ ) la solución intracelular (IC) se torna termodinámicamente inestable e inicia la formación de hielo intracelular (evento terminal, irreversible y letal).<sup>10,16</sup> Los cristales de hielo, por expansión de volumen, rompen las organelas y la membrana celular.<sup>19</sup> También hay efecto soluto secundario a la FHI.<sup>16,17</sup>

La FHI en una célula dentro de un tejido, y no en células en suspensión, proviene de la combinación de diferentes procesos:<sup>3,4,27,28</sup>

1- Cuando se mantiene una temperatura de congelación constante en el tiempo, a velocidades de congelación lenta. El estrés osmótico que se desarrolla con estas velocidades determina una ruptura en la membrana plasmática y permite que el hielo extracelular se propague hacia el citoplasma.

2- Por FHI independiente o espontánea, cuando se aplica una velocidad de congelación rápida. Como resultado de la nucleación dentro de la célula, catalizada por la membrana plasmática o por partículas intracelulares.

3- Por propagación de hielo "intercelular", dependiente de la presencia de hielo intracelular en las células vecinas. El hielo presente en una célula

sometida a congelación directa es suficiente para causar la formación de hielo en todas las células que se conectan entre sí, y que no han sido sometidas a congelación directa. Este proceso se denomina "estímulo de iniciación".<sup>25,27</sup> La propagación de hielo intercelular puede ser mediada por:<sup>27,28</sup> (a) Enzimas lisosomales liberadas a partir de una célula cuya membrana está rota por la acción de los cristales intracelulares. Las enzimas rompen membranas de células sanas y permiten nueva formación de cristales de hielo en éstas. (b) Uniones "GAP" activas en la interacción célula-célula. (c) Otros canales intercelulares. La propagación de hielo intercelular es el modo dominante de FHI en rápidas congelaciones tisulares y el contacto célula-célula aumenta la velocidad de FHI.<sup>28</sup>

La lesión celular por acción de diferentes velocidades de congelación resulta en una curva con forma de "U" invertida de supervivencia celular vs velocidad de congelación. La viabilidad celular es baja a velocidades de congelación extremadamente lenta y rápida, y aumenta la viabilidad a velocidades de congelación intermedias. La velocidad de congelación óptima es función de la permeabilidad de membrana y de la superficie celular, y varía entre los diferentes tipos celulares.<sup>6</sup>

Otro proceso que daña las células, basado en la morfología de los cristales de hielo, es la recrystalización. Cuando el hielo se forma en el IC durante la rápida congelación, se forman varios sitios de nucleación, y la célula congelada está llena de numerosos y diminutos cristales de hielo. No hay tiempo suficiente durante esta congelación para el crecimiento de los cristales.<sup>12</sup> La recrystalización es el proceso por el cual, y durante la lenta descongelación, pequeños cristales de hielo con alta energía de superficie se derriten y se unen entre sí para formar un cristal más grande, con menor energía de superficie.<sup>9</sup> Los grandes cristales son más agresivos porque disocian la membrana celular y rompen la estructura macroscópica tisular.<sup>4,9</sup> Su acción es más notoria a temperaturas mayores de -40° C, especialmente entre -20° C y -25° C; y en tejidos con células muy comprimidas.<sup>9</sup>

La descongelación lenta y espontánea maximizará la recrystalización y el daño mecánico, y aumentará la destrucción celular. Mientras se derriten los cristales de hielo, la solución EC permanece levemente hipotónica, motivo por el cual el agua ingresa a la célula dañada y aumenta de volumen, produciendo ruptura de membrana o estallido celular.<sup>4,13</sup>

La recrystalización, que aumenta aún más la concentración de los electrolitos IC, permite que las organelas culminen con su ruptura previamente iniciada. Con esta última se liberan proteasas lisosomales que provocan otros dos procesos letales para las células:<sup>4</sup> 1) las enzimas rompen las uniones de los péptidos, disgregando las proteínas, y 2) los péptidos liberados alteran la tensión osmótica IC. Por cada unión peptídica rota, una molécula de agua (inestable por la acción del frío) se rompe y sus componentes se unen al aminoácido. Esto disminuye la concentra-

ción IC de agua y aumenta la de electrolitos.

Después de la completa descongelación, el tejido previamente congelado permanece hipotérmico durante varios minutos, y el tejido dañado está sujeto a deterioro metabólico continuo durante este tiempo.<sup>3</sup>

La velocidad de descongelación también influye en el grado de injuria, donde largos períodos de descongelación se asocian a una mayor lesión por acumulación de electrolitos IC. Además, la repetición del ciclo de congelación-descongelación produce mayor destrucción.<sup>16</sup> Cuando la descongelación es rápida, algunas células pueden seguir siendo hipertónicas a temperatura corporal e induce daño metabólico adicional.<sup>4</sup>

**2. Efecto Vascular.** La estasis vascular, principalmente a nivel de la micro circulación (sitio de entrega de oxígeno y nutrientes), es el resultado de una serie de cambios producidos en la circulación durante los ciclos de congelación y descongelación de un tratamiento crioquirúrgico.<sup>3,6</sup> Mientras el tejido se congela, el efecto en los vasos sanguíneos puede oscilar desde la interrupción temporal de la circulación ("estasis transitoria con reperfusión tisular") hasta una oclusión vascular irreversible ("estasis permanente") y necrosis tisular. La estasis permanente y la necrosis tisular son consideradas los principales mecanismos de lesión en criocirugía.<sup>9,10</sup>

La respuesta inicial de un tejido sometido a bajas temperaturas es la vasoconstricción y la disminución del flujo sanguíneo, el cual cesa cuando la temperatura entra en rangos de congelación.<sup>9</sup> Los cristales de hielo formados durante la congelación de los vasos sanguíneos, sitio primario de crecimiento de hielo, afectan su contenido (sangre) y su pared (células endoteliales).

Como en todo proceso de congelación de solución acuosa, ésta se expande y rechaza solutos, que son acumulados en el límite entre la región congelada y no congelada.<sup>4</sup> Al estar los vasos sanguíneos llenos con una solución acuosa (sangre), el hielo se forma y se propaga, siguiendo la dirección de los gradientes de temperatura, por dentro y a lo largo de los vasos sanguíneos, ya que no hay barrera que impida la propagación de hielo.<sup>4,25,29</sup>

La presencia de hielo dentro de la luz vascular somete a las células endoteliales a una diferencia de potencial químico a lo largo de la membrana celular, ocasionando deshidratación, aumento de concentración de electrolitos y cambio de la forma celular.<sup>29</sup>

Morfológicamente, las células endoteliales se mantienen unidas por:<sup>29</sup> 1) microtúbulos y filamentos de actina, que constituyen el citoesqueleto y dan la forma celular; 2) unión de células endoteliales entre sí; 3) adherencias focales mediadas por integrina, que une las células endoteliales a la matriz extracelular. Estas proteínas son frío-sensibles y, por el efecto de la congelación, altera sus funciones y producen: pérdida de adherencia endotelial a la matriz extracelular, cambios de la forma celular y separación de las células endoteliales.<sup>29</sup> Efectos que se suman a los daños producidos por la presencia

de hielo intravascular.

El cambio de la forma de las células endoteliales por acción de la deshidratación determina una alteración en el eje corto y en el espesor celular; mientras que por el daño de las proteínas (integrina, microtúbulos, actina), hay alteración del eje largo de la célula.<sup>29</sup> Todo lleva a un encogimiento celular, ruptura de las conexiones célula-célula y separación de las células endoteliales de la matriz extracelular (pared del vaso).

Durante la descongelación hay dos efectos adicionales de daño, que son: la recristalización y la vasodilatación. Durante la primera, y por el crecimiento de los pequeños cristales, la pared del vaso sanguíneo (ya dañada) se expande y, al superar su capacidad elástica, produce fragmentación mecánica de las células endoteliales.<sup>25</sup> Durante la descongelación hay vasodilatación compensatoria, que determina hiperperfusión tisular e induce la formación de radicales libres de oxígeno, los que causan injuria endotelial por peroxidación de los lípidos de membrana.<sup>21</sup>

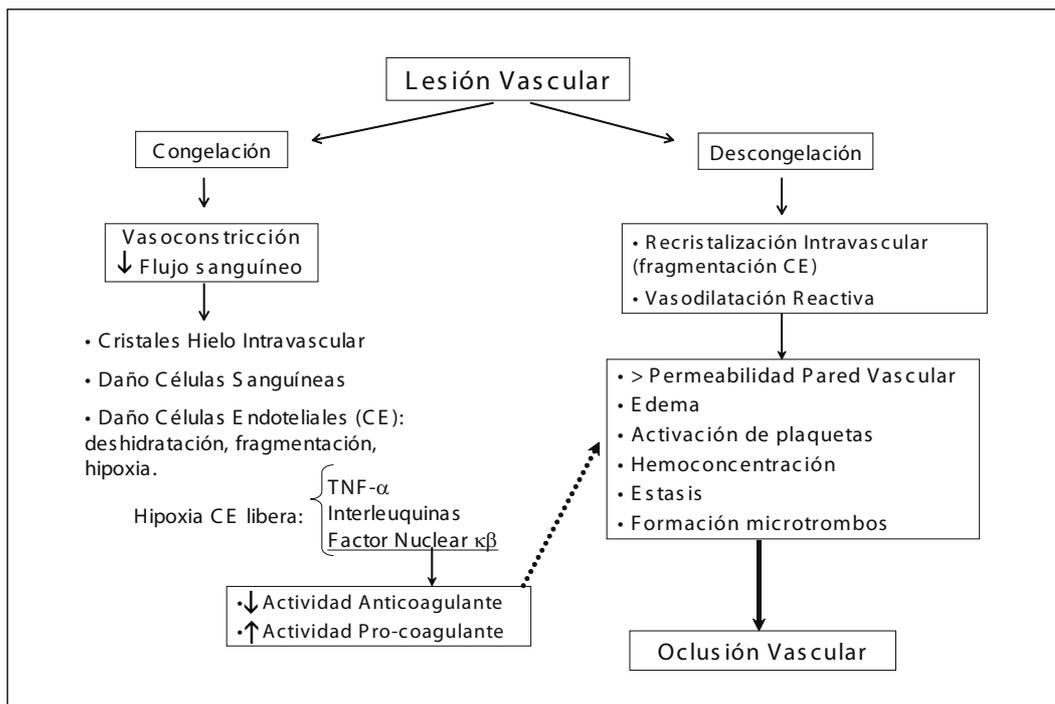
Durante la fase de vasodilatación, y por el daño endotelial ocasionado durante la congelación (pérdida de forma y separación de células endoteliales), hay aumento de la permeabilidad de la pared vascular (filtración de glóbulos rojos, de plasma y proteínas al intersticio), edema, adherencia de plaquetas al subendotelio, agregación plaquetaria, liberación de factores plaquetarios que promueven la coagulación y la inflamación, reclutamiento de leucoci-

tos (liberan factores que aumentan la reacción inflamatoria), estasis vascular, formación de micro-trombos (no afectados por heparina) y oclusión vascular.<sup>3,4,7,9,25,30</sup> La disminución de la temperatura, a su vez, actúa directamente sobre las plaquetas, activando una cascada de eventos que culminan en la agregación de plaquetas y obstrucción de los vasos sanguíneos en la región frío-tratada.<sup>4</sup>

La hipoxia de las células endoteliales, por reducción de la perfusión, libera mediadores inflamatorios responsables de la adherencia y migración de leucocitos en vénulas post-capilares.<sup>31</sup> Estos leucocitos generan citoquinas (Ej.: TNF- $\alpha$ , IL-1, Factor Nuclear  $\kappa\beta$ ) que, al actuar directamente en el endotelio, producen: disminución de la actividad anticoagulante, aumento de la actividad pro-coagulante y aumento de la producción de otras citoquinas inflamatorias (IL-8, 6 y PDGF).<sup>32</sup>

La interacción de todos estos mecanismos produce estasis y oclusión vascular (Figura 2). Ambos privan a las células de cualquier oportunidad de supervivencia y producirán lesión isquémica secundaria y necrosis coagulativa uniforme del tejido, excepto en la periferia del volumen tisular previamente congelado. Este mecanismo de destrucción tisular explica el por qué las células parecen incluso haber sucumbido a la criocirugía en áreas en que los parámetros de congelación normalmente no causarían la muerte celular.<sup>4,13</sup> La isquemia presenta 3 insuficiencias aditivas y diferentes: de oxígeno, de nutrientes y de remoción de detritus celulares.

**Figura 2.** Diagrama del mecanismo de Lesión Vascular.



La isquemia local tiene un efecto beneficioso en la práctica clínica y es empleado para controlar el sangrado de la superficie de un tumor. El daño primario en un tumor, luego de una criocirugía, es debido principalmente a la estasis vascular. La pérdida de oxígeno y nutrientes, entre otros, causa daño isquémico al tumor y comienza poco después que el tejido se descongela. Las células tumorales son metabólicamente muy activas y no sobreviven mucho tiempo sin aporte sanguíneo. Sin vasos sanguíneos cercanos funcionalmente activos también se previene e impide la invasión, limitando el poder del tumor de metastatizar, aún cuando todas las células no se mueran.<sup>25</sup> La criocirugía probablemente es la primera técnica quirúrgica que ha usado la angiogenesis para tratar el cáncer.<sup>4</sup>

La repetición de un ciclo de rápida congelación y de lenta descongelación potencia este daño, el cual es directamente proporcional a la intensidad de la congelación.<sup>10</sup>

Las vénulas y los capilares, sitio de mayor daño vascular, están completamente trombosados entre 3 y 4 horas de finalizado el ciclo de congelación-descongelación. Las arteriolas pueden permanecer permeables hasta 24 horas de la finalización del ciclo, ya que la velocidad del flujo sanguíneo y la transferencia de calor son mucho más altas en éstas, y así retrasan la estasis y trombosis.<sup>9,33</sup> La región con estasis vascular permanece necrótica a los 3 días luego de la congelación, lo que indica la contribución del daño vascular en la necrosis del tejido o tumor.<sup>30</sup>

**3. Apoptosis.** Desde el punto de vista molecular se identifica un tercer mecanismo de muerte celular asociado con la criocirugía, aditivo al daño celular y vascular, que es la apoptosis o muerte celular regulada por genes, descrito por Kerr y col, en 1972.<sup>2,34</sup>

Los efectores de la apoptosis son un grupo de cisteín-proteasas denominadas "caspasas", sintetizadas como proenzimas inactivas (procaspasas) y activadas por clivaje.<sup>34,35</sup> Hay diferentes caspasas (iniciadoras y ejecutoras), siendo la de mayor interés la caspasa-3 (ejecutora), porque su activación determina daño celular irreversible y su nivel de expresión es usado para detectar la actividad de la apoptosis.

Las células apoptóticas, morfológicamente se caracterizan por:<sup>2,34,36</sup> *blebbling* de membrana plasmática, condensación celular y nuclear, agregación de cromatina, degradación del ADN, pérdida de potencial de membrana mitocondrial, dilatación del retículo endoplásmico, pérdida de contacto con células vecinas por alteración de las moléculas de adhesión de la membrana plasmática, reorganización de membrana (inversión de fosfolípidos y despliegue de señales fagocíticas para macrófagos tisulares), fragmentación celular en cuerpos apoptóticos.

Los factores que estimulan el inicio de la apoptosis incluyen:<sup>2,3,4</sup> fragmentación y degradación de ADN, hipotermia, hipotermia, inflamación y liberación de citoquinas, hipoxia de células endoteliales, isquemia, niveles elevados de calcio, estiramiento celular físico, hiperosmolaridad, aumento de la

permeabilidad de membrana celular, exposición a superóxido, activación de receptores de muerte como el FasL y el TNF-R $\alpha$ , hormonas, radiación, drogas antitumorales, mecanismos inmunológicos (ej.: reclutamiento de macrófagos), etc. Muchos de estos factores están presentes durante el procedimiento criocirúrgico.

Por acción del efecto celular hay aumento de permeabilidad de membrana, hiperosmolaridad, aumento de concentración de iones (principalmente calcio), estiramiento celular y, entre otros, desnaturalización de proteínas.<sup>33</sup> Las organelas afectadas con mayor importancia en la apoptosis son el retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria. El RE, principal fuente de procesamiento de proteínas y de almacenamiento de calcio intracelular, por acción de la criocirugía, altera su estructura e impide el correcto procesamiento de proteínas y libera grandes cantidades de calcio al citoplasma. La mitocondria, fuente de producción de energía de la célula, por acción de la hipotermia, se despolariza y pierde la integridad de su membrana, que permite la liberación al citoplasma del "citocromo C".<sup>21</sup> El calcio del RE activa la procaspasa 12 y el citocromo "C" la procaspasa 9.<sup>21</sup> Ambas iniciadoras de la ejecutora caspasa-3. Yang et al, confirmaron que la apoptosis inducida por criocirugía estaba asociada con la disrupción de la integridad mitocondrial.<sup>2,21</sup>

La acción del efecto vascular determina hipoxia de células endoteliales y, por liberación de mediadores inflamatorios y adherencia de leucocitos, hay aumento local de TNF- $\alpha$ , IL (1, 3, 6) y factor nuclear  $\kappa\beta$ .<sup>15</sup> El factor nuclear  $\kappa\beta$  determina apoptosis de las células endoteliales a través de la disminución del factor antiapoptótico bcl-2<sup>15</sup> y aumenta la transcripción del TNF- $\alpha$  y de las IL-1, 2, 6 y 8.<sup>38</sup> El TNF- $\alpha$ , a través del TNF-R $\alpha$  de membrana, activa la caspasa 8,<sup>34</sup> mientras que la activación del FAS resulta en una disfunción mitocondrial (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Efectos determinantes de la apoptosis crío-inducida.

Efecto Celular:	Efecto Vascular:
> $\uparrow$ Permeabilidad membrana	> $\uparrow$ Permeabilidad pared vascular
> Hiperosmolaridad	> Hipoxia Células Endoteliales (FN $\kappa\beta$ )
> $\uparrow$ Concentración iones (Ca <sup>+</sup> )	> Liberación citoquinas inflamatorias
> Estiramiento celular	> Activación de TNF- $\alpha$ R y Fas-L
> Desnaturalización proteica	> Isquemia celular / tisular
> Liberación Citocromo "C"	

La apoptosis es un importante mecanismo de muerte celular cuando la temperatura no es lo suficientemente baja como para destruir las células a través de ruptura directa por el hielo o por necrosis. La apoptosis se produce en células que fueron parcialmente dañadas a una temperatura relativamente elevada (ej.: lejos del crío-instrumento),<sup>35</sup> y se encuentran en la periferia de la lesión criogénica.

La inducción de la apoptosis dependiente de temperatura alcanza su máximo nivel a temperaturas de  $-15^{\circ}\text{C}$  (rango:  $-6^{\circ}\text{C}$  a  $-36^{\circ}\text{C}$ ).<sup>21,33</sup> El amplio rango de temperatura se debe a la diferente susceptibilidad de las células sometidas a la acción del frío. Yang y col<sup>38</sup> y Hanai y col,<sup>39</sup> demostraron que las células eran susceptibles de entrar en estado apoptótico a las 8 horas de la finalización del ciclo congelación-descongelación, alcanzando un máximo a las 24 hs.<sup>15</sup> La apoptosis aumenta la efectividad terapéutica de un procedimiento criquirúrgico, sobre todo "en" y "cerca" de la periferia de la zona congelada.<sup>15,40</sup>

**4. Inmunológico.** El principal objetivo de la criocirugía es la destrucción localizada de un tejido patológico determinado. Hay evidencias que muestran que la destrucción celular por acción de la congelación es acompañada por formación de antígenos autólogos del tejido congelado, a través de la liberación de lipoproteínas de la membrana celular (crioestímulo),<sup>21</sup> desarrollándose una respuesta inmune (crioimmunológica) por parte del huésped, de tipo humoral y mediada por células.<sup>7,41</sup>

La respuesta inmune, huésped y tisular específica (criosensibilidad), comprende uno de los principales mecanismos de la criodestrucción, y contribuye a la eliminación y erradicación de lesiones benignas, malignas y, en varios casos, previene las metástasis o sus recurrencias.<sup>7,41</sup>

La criocirugía puede estimular el sistema inmune mediante dos mecanismos: la formación de anticuerpos anti-tumor y la muerte celular mediada por células "T" citotóxicas (CTL).<sup>21,42,43</sup> En ambos mecanismos participan las células dendríticas (DC), las que adquieren su forma madura (activa) al ser activadas por diferentes señales.<sup>44</sup>

Las DC son células presentadoras de antígenos que se hallan en casi todos los tejidos periféricos, así como en órganos linfoides primarios (timo, médula ósea) y secundarios [SLOs] (ganglios linfáticos, placa de Peyer, bazo).<sup>45</sup> Son generadas a partir de células progenitoras CD34+ en médula ósea o de monocitos diferenciados de sangre periférica en presencia de GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony-stimulating factor*) o de interleuquina 4 ó 13 (IL-4, IL-13).<sup>45,46</sup> Su función es recolectar material antigénico en la periferia y, por acción de distintos estímulos que determinan su maduración, lo transportan a los SLOs, donde inician una respuesta inmune al activar las células "T" *naïve*.<sup>44-46</sup> La proliferación de las células "T" *naïve* genera células efectoras "T" y "B" (células citotóxicas y células "T" *helper*; y células plasmáticas secretantes de anticuerpos) y células memoria "T" y "B".<sup>44,47</sup> Las células "T" *helper* se las divide según el tipo de citoquinas liberadas. Las de tipo 1 (Th1) liberan IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$ ; inhiben las células "T" *helper* tipo 2 y están involucradas en la inmunidad mediada por células (activación de macrófagos y células "T" citotóxicas). Las de tipo 2 (Th2) secretan IL-4, IL-5, IL-6 y IL-13; inhibe las células "T" *helper* tipo 1 y están involucradas en la inmunidad humoral (producción de anticuerpos por las células "B").<sup>47,48</sup>

Acerca de la producción de anticuerpo anti-tumor, la hipótesis es que el tumor congelado dejado *in situ* produce y libera detritus celulares tumorales y libera antígenos sin destruir. Así, la presentación de antígenos y detritus celulares por los fagocitos induce, a través de la activación de las DC, anticuerpos contra estos antígenos, contra los detritus y contra las proteínas de superficie específicas del tumor. Estos anticuerpos pueden unirse a la misma proteína de membrana en la superficie de otras células tumorales viables. De ahí, los anticuerpos inducen la fijación y quimiotaxis de neutrófilos, con la resultante de un medio tóxico para las células tumorales. Estos anticuerpos son llamados "anticuerpos citotóxicos".<sup>21,33,42</sup>

El segundo mecanismo de acción del sistema inmune es la muerte de células tumorales mediada por células "T" citotóxicas. La destrucción de células tumorales altera la morfología de la interacción célula-célula, altera la membrana celular y libera factores que, a través de las DC, sensibilizan las células "T" y las activan hacia un fenotipo tipo Th 1 (CTL y Natural Killer) e inducen una respuesta citotóxica antitumoral.<sup>21,42,46</sup>

Dos mecanismos dominantes de la citotoxicidad mediada por linfocitos son la muerte mediada por las perforinas / granzimas, y la muerte mediada por los receptores de muerte. La vía dependiente de perforinas es dominante en las células *Natural Killer* y CD8+ CTL. La vía mediada por los receptores de muerte es más activa en las células *Natural Killer*, siendo mayor en las CD4+, especialmente en las del fenotipo tipo Th 1. Los gránulos citoplasmáticos de las *Natural Killer* y las "CTL" activadas contienen perforinas (proteínas formadoras de poros) y granzimas "B" (proteína citotóxica).<sup>49</sup> Luego de unirse los CTL a una célula patológica (por los receptores CTL y las moléculas HMC presentadoras de antígenos en las células patológicas), el contenido de los gránulos se libera en el espacio intercelular donde las perforinas crean poros en la membrana de la célula patológica, a través de los cuales penetran las granzimas "B".<sup>49,50</sup> La segunda vía, característica de las *Natural Killer*, yace en los receptores de activación y de inhibición de muerte. El receptor activado de muerte reconoce diferentes moléculas presentes en la superficie de células nucleadas, mientras que los receptores de inhibición de muerte reconocen las moléculas de MHC tipo 1. Si los receptores de muerte celular son activados, emiten una señal de "muerte" a las células *Natural Killer*; pero esta señal normalmente está anulada por una señal inhibitoria emitida por los receptores inhibitorios de muerte al reconocer las moléculas MHC tipo 1.<sup>44</sup> La ausencia de MHC tipo 1 permite que las *Natural Killer* actúen a través de las perforinas y granzimas en forma similar a los CTL. Así, las granzimas B, liberadas por los CTL y *Natural Killer*, destruyen las células por su acción citotóxica.<sup>44</sup>

Algunos de los estímulos que permiten la maduración de las DC son: citoquinas inflamatorias, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , factor nuclear  $\kappa\beta$ , lipoproteínas y lipopolisacáridos (LPS), antígenos tumorales, sub-pro-

ductos de daño tisular, células necróticas, disrupción de contacto célula-célula, quemoquinas tumorales y la inhibición de la liberación de productos tumorales.<sup>38,44-47</sup>

Todos estos estímulos son producidos por la acción de la criocirugía sobre un tejido; en consecuencia, se liberan citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ), quemoquinas y antígenos tumorales. A su vez, el criógeno modifica la estructura celular que altera el contacto célula-célula, libera lipoproteínas, libera productos intracelulares (por ruptura de la membrana), y finalmente produce la necrosis celular. Sumado a esto, y en cuanto a las células tumorales, inhibe la liberación de citoquinas propias del tumor (ej.: IL-10, el factor de crecimiento vascular endotelial [VEGF] y el TGFB [*Transforming Growth Factor*]) que inhibirían la maduración de DC y la diferenciación de monocitos a DC 43,47,51. Resumiendo, la criocirugía permite la liberación de varios estímulos que determinan la maduración de DC y así obtener una respuesta crioinmunológica.<sup>43,46,47,51</sup>

### **Ciclos de congelación y descongelación**

La óptima comprensión de la técnica de criocirugía requiere examinar, brevemente, el ciclo de congelación-descongelación y sus componentes. Aunque es difícil valorar con precisión las diferentes fases por separado, se ha demostrado que cualquier parte del ciclo de congelación-descongelación puede ser perjudicial y merece una descripción individual. En cualquier volumen de tejido a ser congelado la historia termal varía considerablemente. La congelación indiscriminada no necesariamente destruye todos los tejidos patológicos, y la destrucción tisular depende de las condiciones termales durante la congelación.<sup>52</sup>

Hay varios parámetros interrelacionados que se pueden controlar durante los ciclos de congelación-descongelación en un procedimiento crioquirúrgico. Los componentes a examinar del ciclo son: la velocidad de congelación, la temperatura del tejido, la duración de la congelación, la velocidad de la descongelación, la repetición del ciclo congelación-descongelación, el intervalo entre ciclos de congelación-descongelación.

**A. Velocidad de congelación.** Para poder lograr el efecto deseado en criocirugía, es importante considerar la velocidad de congelación. En diversos estudios, se demostró que la rápida congelación es más destructiva.<sup>3,53</sup> Por esta razón, en criocirugía, a mayor velocidad de congelación, mayor es la tendencia de formación de microcristales de hielo intracelular.<sup>5,54</sup> Además de la rápida FHI, hay un brusco aumento de la concentración de electrolitos IC que produce mayor daño intracelular durante la congelación y descongelación.<sup>7</sup>

El hielo intracelular se desarrolla en una amplia gama de velocidades de congelación que varía desde 3° c/min a más de 50° C/min.<sup>5,55</sup> Con ambas velocidades hay daño celular, pero no es probable que velocidades de enfriamiento de esta magnitud formen un volumen uniforme significativo de hielo intracelular, ya que, por ejemplo, el tumor, al ser una

masa termal con una población de células heterogénea, tiene diferentes velocidades óptimas de congelación.<sup>25</sup> El hielo intracelular se forma cerca del crióinstrumento donde la velocidad de congelación es alta ( $\geq 50^\circ \text{C/min.}$ ) y, mientras más se aleja del crióinstrumento, la velocidad de enfriamiento es menor y hay más formación de hielo extracelular y de células deshidratadas.<sup>3</sup>

Se considera que la rápida formación de cristales de hielo intracelular (velocidades de congelación rápida) es más eficaz para producir necrosis celular; por lo tanto, es importante recordar que la velocidad de congelación debe ser tan rápida como sea posible para lograr la máxima destrucción tisular.<sup>5,25,54</sup>

**B. Temperatura del Tejido.**<sup>3,5,25</sup> La técnica crioquirúrgica eficaz, sobre todo para tratar tumores, requiere que se logre en la totalidad del sitio a tratar, una temperatura indiscutiblemente letal para las células. La temperatura del tejido es un factor primario responsable de la muerte celular.

La temperatura a la que el tejido es sometido es la variable más fácilmente medida del ciclo congelación-descongelación y, de hecho, es la medición estándar por la que se define un protocolo y se controla la crioterapia. No obstante, la adecuada temperatura para lograr la necrosis tisular es incierta, pues la susceptibilidad a la lesión celular por congelación depende de la propia característica del tejido y del individuo;<sup>1</sup> pero se sabe que las células se mueren en un número progresivamente mayor mientras la temperatura desciende a través de una velocidad de congelación mayor. Cada línea celular tiene un tipo de umbral termal único.

La temperatura tisular letal es de extrema importancia en criocirugía. Hasta una temperatura de  $-5^\circ \text{C}$  no se congelan los sistemas biológicos debido a la alta concentración de las sustancias diluidas, independiente de la velocidad de congelación elegida. Entre los  $-5^\circ \text{C}$  y  $-15^\circ \text{C}$  se forman cristales de hielo extracelulares y el espacio intracelular estará enfriado, pero no congelado. Se consideraba que una temperatura tisular de  $-20^\circ/-30^\circ \text{C}$  era adecuada para provocar un daño tisular extenso, pero la destrucción celular no es completa o segura porque hay células (ej.: neoplásicas) que son resistentes a la lesión por congelación.

Diversos estudios<sup>3</sup> demostraron que la línea de demarcación entre el tejido necrótico y el tejido vivo (temperatura crítica) se encontraba entre  $-2^\circ \text{C}$  y  $-70^\circ \text{C}$ . Como se comprende, la sensibilidad celular a la temperatura varía. Por ejemplo, las células musculares y los melanocitos son muy sensibles a la congelación, pero los queratinocitos y la grasa resisten las temperaturas de congelación.<sup>1,9</sup> También existen diferencias en la sensibilidad de células malignas, algunas son resistentes a la lesión por frío a temperaturas de  $-40^\circ$  a  $-70^\circ \text{C}$ .<sup>1,53</sup>

Neel y col, trabajando con tumores de animales, fijan la temperatura letal a  $-60^\circ \text{C}$  requiriendo, además, congelación repetitiva.<sup>40</sup> Considerado el margen de error en la aplicación clínica y la diferencia en la sensibilidad a la lesión por congelación de cé-

lulas normales y neoplásicas, es más seguro producir una temperatura de punto final  $\geq$  de  $-50^{\circ}\text{C}$  (rango:  $-40^{\circ}\text{C}$  a  $-70^{\circ}\text{C}$ ) en todo el tejido (principalmente tumoral) como meta apropiada en criocirugía, para la cual la destrucción tisular debe ser ciertamente producida por la congelación.<sup>55</sup>

**C. Duración de la congelación.**<sup>3,25,54,56,57</sup> La mayoría de los informes están de acuerdo con la opinión actual según la cual el conocimiento de la duración de la congelación no es tan significativo, porque, aunque se mencione el "tiempo específico de tratamiento para ciertas lesiones", éste sólo sirve como una valoración imperfecta de la duración de la congelación. La duración óptima de la congelación, es decir, cuánto tiempo el tejido se debe mantener en estado congelado, no es conocida. Es específico para cada célula y tejido, y para cada individuo; es indiscutible que haya diferencia de opiniones.

A pesar de la facilidad con que este parámetro puede ser controlado, este error probablemente es perpetuado debido a la creencia de que la isoterma crítica es un indicador de muerte celular. La destrucción celular está aumentada cuando se mantienen los tejidos en un estado de congelación a temperaturas en el rango en el cual ocurre la deshidratación y la recristalización. Una vez que la temperatura del tejido alcanza un cierto nivel, se puede lograr más destrucción celular prolongando la congelación a esta temperatura.<sup>13</sup>

La duración de la congelación es determinada por el tamaño de la bola de hielo,<sup>57</sup> la cual depende de la cantidad de criógeno aplicado a una lesión. A mayor cantidad de criógeno (ej.: nitrógeno líquido) aplicado a un área dada, mayor es el diámetro de la bola de hielo desde el margen de la punta del crioinstrumento.<sup>56</sup> El tejido cercano al crioinstrumento se congela más rápido, pero el tejido en una localización periférica se enfría despacio y a una temperatura más alta.<sup>5</sup>

Para determinar la suficiencia del tratamiento de la criocirugía es mejor medir la extensión lateral superficial de la congelación<sup>32</sup> y no el tiempo en segundos o minutos.

**D. Velocidad de la descongelación.**<sup>4,5,7,16,25,54</sup> La lenta descongelación es un factor destructivo primario. La velocidad deseable de la descongelación es opuesta a la de la congelación y no se debe acelerar. Debe ser completa y tan lenta como sea posible, y se hace mejor permitiendo a los tejidos que se descongelen sin ayuda de fuentes externa de calor. La fuente interna de calor (mecanismo primario para descongelar el tejido) es la circulación y el metabolismo del tejido circundante, y no siempre se puede evitar.

A mayor duración de la descongelación, mayor el daño celular; debido al aumento del "efecto soluto", al prolongado estrés oxidativo y a la recristalización. La "recristalización caliente" crea fuerzas de cizallamiento que producen disrupción celular mecánica y rompen la estructura de los tejidos.

La descongelación lenta permite al próximo ciclo lograr una congelación intracelular y destrucción celular completa más rápida. Los cristales de hielo

intracelular son más grandes en el segundo ciclo de congelación y los cambios disruptivos ultraestructurales en las células están aumentados con la repetición de la congelación.

La rápida descongelación, que aumenta la supervivencia celular, es utilizada como tratamiento de la congelación excesiva o no deseada de ciertas zonas vitales.<sup>5</sup>

**E. Repetición del ciclo congelación-descongelación.**<sup>3,5,25</sup> Para un adecuado tratamiento crioquirúrgico de neoplasias, se enfatiza la necesidad de realizar congelaciones repetitivas. La repetición de un ciclo de congelación-descongelación, después de permitir que la bola de hielo se derrita completamente, produce congelación y destrucción tisular más rápida, más extensa y con mejor resultado del procedimiento. El segundo ciclo somete al tejido a cambios fisicoquímicos deletéreos adicionales al atravesar condiciones termales perjudiciales durante este período.

Con cada ciclo sucesivo el tejido se congela más rápido, el volumen tisular congelado aumenta un 10-20% entre el primer y segundo ciclo, y los bordes de la frío-destrucción se mueven más cerca de la periferia del volumen congelado. Aumentando así la extensión de la necrosis, llegando a incluir el 80% del volumen previamente congelado. Esto es porque la temperatura inicial del segundo ciclo es mucho más baja que la temperatura inicial del primer ciclo.

La ruptura de la arquitectura de membranas y elementos celulares en el primer ciclo, sumado a la recristalización, el edema tisular y a que las células que se vuelven menos tolerantes a la congelación (por lesión sub-letal sufrida durante la primera congelación), pueden ser responsables del evidente aumento en la conductibilidad termal en el tejido durante el segundo ciclo.

El mayor efecto letal de la repetición de los ciclos se ve en el borde del tejido congelado, donde la temperatura no es suficiente ( $-20^{\circ}$ / $-30^{\circ}\text{C}$ ) para lograr una destrucción celular completa con un solo ciclo. Por esta razón, la repetición del ciclo de congelación-descongelación es crítica en el tratamiento de todos los tumores,<sup>1,5,58</sup> porque aumenta el efecto destructivo de un procedimiento crioquirúrgico. En la práctica clínica el número de ciclos puede ser manipulado, pero siempre se debe conservar las bases fundamentales de la técnica.

**F. Intervalo entre ciclos de congelación-descongelación.**<sup>3,5,7</sup> Al intervalo entre los ciclos, factor importante en la lesión tisular, se le ha dado poca atención. Un período de descongelación más largo mantiene la vasoconstricción completa en los vasos sanguíneos más grandes, determina el crecimiento continuo de los cristales de hielo y el daño osmótico se torna más extenso. Un intervalo prolongado después de la descongelación, pero antes del segundo ciclo de congelación, deja al tejido en estado de hipotermia y da tiempo para que falle la microcirculación.

Todas las fases del ciclo congelación-descongelación causan lesión tisular. La repetición del ciclo es

un importante factor para un tratamiento adecuado. Los estudios de microscopía electrónica mostraron que con un segundo ciclo de congelación-descongelación, aumenta el grado de injuria celular, y más aún con 3 ciclos.

**Lesión criogénica.**<sup>3,5,25,56</sup> Finalizado un procedimiento criquirúrgico, el tejido crío-tratado parece casi normal y no se puede predecir la "dimensión del daño" por su apariencia macroscópica, pues presenta cambios progresivos en el tiempo.

El cuadro macroscópico resultante de la acción del frío en los diferentes órganos casi siempre es idéntico. Luego de la descongelación el tejido ha recobrado su color y consistencia casi original. En las siguientes horas, la zona tratada aumenta de tamaño por edema y congestión, y está rodeada por una abrupta línea de demarcación alrededor del tejido sano. Después de 3-4 días se forma un área central de superficie gris descolorida completamente necrosada. Varios días después el proceso de regeneración comienza con el desprendimiento del tejido necrótico y, aproximadamente a las 4 semanas, el cráter necrótico profundo es completamente reemplazado por tejido de granulación.

Con la microscopía óptica se aprecia, en el centro de la lesión una disociación celular con sangrado intersticial, congestión vascular, microtrombos, infarto hemorrágico y necrosis por coagulación. Rodeando a esta lesión, hay una zona de transición de necrosis parcial y células vivas. Con el tiempo, y al desprenderse la región necrótica, aparecen fibroblastos que, desde el borde, comienzan a regenerar la zona e inician la cicatrización. Los cambios observados con microscopía electrónica presentan, junto con la presencia de cristales de hielo, tumefacción de organelas, fragmentación y vacuolización de membrana plasmática y nuclear, engrosamiento y fragmentación de los núcleos.

En la zona central de la lesión, con un dispositivo de rápida congelación, la muerte celular es uniforme (debido a la congelación intracelular); pero en la zona periférica, donde la temperatura es de 0 a -20° C, la supervivencia de las células varía. Algunas células sobreviven, otras están muertas, y otras están en equilibrio entre la vida y muerte. En esta zona periférica se aprecia la presencia de células apoptóticas.<sup>5</sup>

Resumiendo, la lesión criogénica se caracteriza por 3 zonas distintas, dependiendo del grado de injuria por congelación. La primera zona, llamada "zona de muerte completa", es central y está localizada alrededor del crío-instrumento; presenta necrosis de coagulación uniforme y demarcada. La segunda zona, "zona de muerte incompleta", es la región desde el borde de la primera zona al borde externo de la bola de hielo (isoterma de 0° a -40° C), y se observan células viables (30-60%) y dañadas. La última zona, "zona viva", es la región por fuera de la bola de hielo donde la mayoría de las células son viables (>95%).<sup>3,56,59</sup> Estas células viables son las que darán origen al crecimiento de la nueva matriz para la cicatrización de la lesión.

Diversos estudios ecográficos y termográficos<sup>60</sup> demostraron que el volumen de tejido que se necrosa es siempre menor que el volumen de tejido congelado. Así, por ejemplo, en congelación de hígado y piel de rata sólo presentaban necrosis el 80% y 70% del volumen congelado, respectivamente. De esto se comprende que la congelación inicial puede no ser lo suficientemente agresiva para destruir las células tumorales (que son más resistentes a la congelación), pero la lesión secundaria por frío o la apoptosis, y los ciclos reiterados de congelación-descongelación, deben culminar con la necrosis del tejido anormal designado (el 100% del volumen congelado), si se quiere que el procedimiento sea exitoso.

**Factores determinantes de la crionecrosis.** La crionecrosis tisular reconoce varios factores que son significativos en la determinación de la calidad y cantidad de la respuesta a la aplicación de un agente criogénico<sup>3,7,9,10,13,56,58</sup> (Cuadro 2).

### *Cuadro 2. Factores determinantes de crionecrosis.*

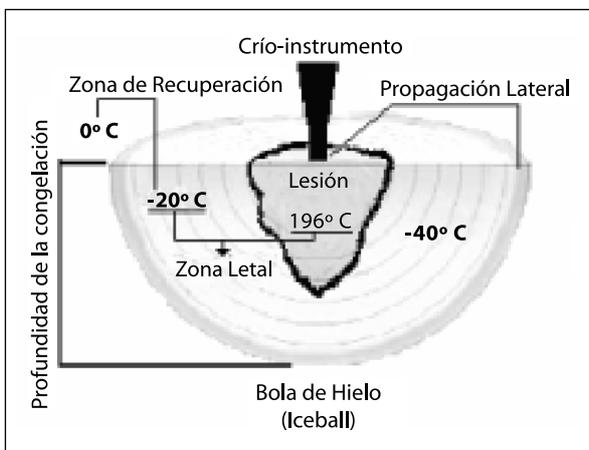
- 
1. Conductibilidad termal del tejido a ser congelado:
    - a. Grosor o densidad del tejido (piel {normal, hiperqueratósica}, mucosa, músculo, hueso, etc.).
    - b. Tipo de células sometidas al frío (melanocitos, queratinocitos, hepatocito, etc.).
    - c. Contenido de agua y/o aire del tejido. Las células grasas tienen menor concentración de agua y por lo tanto menor conductibilidad; el pulmón, al contener aire, también tiene baja conductibilidad termal.
    - d. Calor específico tisular (capacidad del tejido de absorber la cantidad de calor/frío administrada).
    - e. Fuente interna de calor (velocidad del flujo sanguíneo en el área subyacente al tejido a congelar).
    - f. Volumen y profundidad del tejido a congelar (tipo, tamaño, ubicación y profundidad de la lesión).
- 
2. Tipo de criógeno empleado (temperatura de ebullición).
- 
3. Métodos empleados para la transferencia de calor/frío (sondas, spray, etc.):
    - I. Tamaño de la punta criogénica / orificio de la boquilla del dispositivo de spray.
    - II. Temperatura alcanzada en la punta criogénica.
    - III. Área real de contacto entre el crío-instrumento y el tejido designado.
- 
4. Componentes del ciclo: - Velocidad de congelación; - Duración de la congelación; Temperatura del tejido (isoterma crítica); Velocidad de descongelación; - Número de ciclos; - Intervalo entre ciclos.
- 

**Isotermas.** El objetivo de la criocirugía y del crío-cirujano es lograr una isoterma crítica en un volumen de tejido designado para lograr la necrosis completa del tejido patológico y minimizar en el tejido sano circundante el daño causado por la bola de hielo. Para esto hay que comprender la geome-

tría de la bola de hielo y las diferentes temperaturas de la isoterma.

Cuando la unidad criquirúrgica es activada y contacta con el tejido, se observa un área de tejido congelado o "bola de hielo" (*iceball*), que se extiende en forma radial y longitudinal desde el crío-instrumento,<sup>56</sup> y es de tipo elipsoidal u ovalada. La temperatura de la bola de hielo difiere según la zona en que se mida, siendo mucho más baja en el centro que en la periferia. A esto se lo denomina "gradiente termal o isoterma (o capas termo-gradientes)" (Figura 3). A mayor volumen congelado, mayor la distancia entre las isotermas.

**Figura 3.** Geometría de la bola de hielo.



La extensión lateral (horizontal) del hemisferio de la superficie plana congelada se aproxima a la profundidad de la congelación en una proporción de 1:1.3.<sup>56</sup> Pero esta proporción varía según la forma del crío-instrumento y de la presión que se ejerza al aplicarlo sobre la lesión. Así, el tamaño de la bola de hielo formada alrededor de la punta criogénica proporciona una buena estimación de la profundidad de la congelación; a mayor presión de aplicación, mayor profundidad de congelación.<sup>56</sup> El evaluar la "extensión o propagación lateral", nos permite respaldar la adecuada destrucción tisular en profundidad (método visual de control de la crionecrosis). Por eso para un tratamiento eficaz se requiere que la congelación sea adecuada en dirección horizontal y vertical.

La "propagación lateral" representa la distancia entre el margen del crío-instrumento y la isoterma de 0°C. La interfase entre la bola de hielo y el tejido no congelado, representa la "isoterma de 0°C". A mayor duración de la congelación, más lejos se irradia la bola de hielo desde el margen del crío-instrumento, y más lejos se encuentra la isoterma de 0°C.<sup>56</sup> La profundidad de la isoterma de 0°C desde la punta criogénica es la "profundidad de la congelación". La región que ocupa el volumen de tejido entre la isoterma -20°C y la punta del crío-instrumento (-196°C) se llama "zona letal",<sup>56,57</sup> la cual incluye la zona de muerte incompleta y la zona de muerte completa. Las células que se encuentran en el borde externo de

la bola de hielo (0°C y -20°C) pueden sobrevivir a la congelación (dependiendo del tipo de células) y representan la llamada "zona de recuperación".<sup>56</sup>

Conclusión. Desafortunadamente, la criocirugía no se enseña en las escuelas médicas como parte de un programa tradicional de estudios. Es considerada como una técnica oscura y tiende a ser menospreciada por otros procedimientos terapéuticos. En algunos países es considerada como un nuevo descubrimiento, mientras que en otros está siendo nuevamente adoptada y aplicada a diferentes campos médicos incorporándola como un arma más del arsenal terapéutico para diversas enfermedades, principalmente neoplasias.<sup>58</sup>

Se deben respetar las bases de la técnica para lograr un óptimo resultado. Todas las fases del ciclo congelación-descongelación causan daño tisular. La velocidad de congelación debe ser tan rápida como sea posible. La menor temperatura tisular es el principal factor de muerte celular y debe ser  $\geq -50^\circ\text{C}$  en tejido neoplásico. La duración óptima de la congelación no es conocida, pero la congelación prolongada aumenta la destrucción tisular. La velocidad de descongelación es otro factor principal de destrucción tisular, y debe ser completa y tan lenta como sea posible.

## Bibliografía

1. Turjansky E, Stolar E. Lesiones de Piel y Mucosas. Técnicas terapéuticas. Buenos Aires, EDAMA 1995;19-44.
2. Baust JG, Gage AA, Clarke D, et al. Cryosurgery - a putative approach to molecular-based optimization. Cryobiology 2004;48:190-204.
3. Gage AA, Baust JG. Review. Mechanisms of Tissue Injury in Cryosurgery. Cryobiology 1998;37:171-186.
4. Rubinsky B. Cryosurgery. Annu Rev Biomed Eng 2000; 02:157-187.
5. Baust JG, GAGE AA. The molecular basis of cryosurgery. BJU INTERNATIONAL 2005;95:1187-1191.
6. Hoffmann NE, Bischof JC. The cryobiology of cryosurgical injury. Urology 2002;60:40-49.
7. Kuflik EG. Cryosurgery updates. J Am Acad Dermatol 1994;31:925-944.
8. Kuwahara RT. Cryotherapy. Last Updated: January 6, 2003. eMedicine.
9. Theodorescu D. Cancer Cryotherapy: Evolution and Biology. Rev Urol 2004;6:S9-S19.
10. Carvalhal EF, Novick AC, Gill IS. Renal Cryoablation Application in Nephron-Sparing Treatment. Braz J Urol 2000;26:558-570.
11. Arakawa T, Prestrelski SJ, Kenney WC, et al. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. Adv Drug Delivery Rev 1993;10:1-28.
12. Fowler A, Toner M. Cryo-injury and Biopreservation. Ann N Y Acad Sci 2006;1066:119-135.
13. Lam JS, Shvarts O, Beldegrun AS. A new era for cryotherapy of prostate cancer? Contemp Urol 2004;16:1-12.
14. Guzman Mariano H. Criocirugía dermatológica. Rev San Mil Arg 1992;1:37-43.
15. Schacht V, Becker K, Szeimies RM, Abels C. Apoptosis and leucocyte-endothelium interactions contribute to the delayed effects of cryotherapy on tumours in vivo. Arch Dermatol Res 2002;294:341-348.
16. Apt P, Muñoz P, Zemelman V. Criocirugía en dermato-

- logía. *Rev Hosp Chile* 2001;12:235-240.
17. Yu TH, Liu J, Zhou YX. Selective freezing of target biological tissues after injection of solutions with specific thermal properties. *Cryobiology* 2005;50:174-182.
  18. Gao D, Critser JK. Cryobiology of Embryos, Germ Cells, and Ovaries. *Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells*. ILAR Journal V41(4) 2000.
  19. Chua KJ, Chou SK, Ho JC. An analytical study on the thermal effects of cryosurgery on selective cell destruction. *J Biomech* 2007;40:100-116.
  20. Takamatsu H, Rubinsky B. Viability of deformed cells. *Cryobiology*.1999;39:243-251.
  21. Forest V. International Society of Cryosurgery. Basic Science Section. <http://www.societyofcryosurgery.org/>
  22. Nadler SF, Weingand K, Kruse RJ. The Physiologic Basis and Clinical Applications of Cryotherapy and Thermotherapy for the Pain Practitioner. *Pain Physician* 2004;7:395-399.
  23. Rabin Y, Olson P, Taylor MJ, et al. Gross damage accumulation in frozen rabbit liver due to mechanical stress at cryogenic temperatures. *Cryobiology* 1997;34:394-405.
  24. Barbee KA. Mechanical Cell Injury. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1066:67-84.
  25. Muldrew K. Cryobiology - A Short Course. [www.ulcargary.ca/kmuldrew/cryo\\_course](http://www.ulcargary.ca/kmuldrew/cryo_course).
  26. Bischof JC, He X. Thermal stability of proteins. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1066:12-33.
  27. Irimia D, Karlsson JOM Kinetics and Mechanism of Intercellular Ice Propagation in a Micropatterned Tissue Construct. *Biophysical Journal* 2002;82:1858-1868.
  28. Irimia D, Karlsson JOM. Kinetics of Intracellular Ice Formation in One-Dimensional Arrays of Interacting Biological Cells. *Biophysical Journal* 2005;88:647-660.
  29. Zhang A, Xu LX, Sandison GA, Cheng S. Morphological study of endothelial cells during Freezing. *Phys Med Biol* 2006;51:6047-6060.
  30. Shen Y, Liu P, Zhang A, et al. Tumor Microvasculature Response to Alternated Cold and Heat Treatment. *Engineering in Medicine and Biology* 2005;1-4:6797-6800.
  31. Michiels C, Arnould T, Remacle J. Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. *Biochim Biophys Acta* 2000;1497:1-10.
  32. Han B, Iftekhar A, Bischof JC. Improved Cryosurgery by Use of Thermophysical and Inflammatory Adjuvants. *TCRT* 2004;3:103-111.
  33. Johnston MH. Cryotherapy and other newer techniques. *Gastrointest Endoscopy Clin N Am* 2003;13:491-504.
  34. Elinos-Báez CM, Maldonado V, Meléndez-Zajgla J. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac Méd Méx* 2003;139:493-499.
  35. Forest V, Peoc'h M, Campos L, et al. Effects of cryotherapy or chemotherapy on apoptosis in a non-small-cell lung cancer xenografted into SCID mice. *Cryobiology* 2005;50:29-37.
  36. Stockmeyer B, Beyer T, Neuhuber W, et al. Polymorphonuclear Granulocytes Induce Antibody-Dependent Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *J Immunology* 2003;171:5124-5129.
  37. Ng KK, Lam ChM, Poon RT, et al. Comparison of Systemic Responses of Radiofrequency Ablation, Cryotherapy, and Surgical Resection in a Porcine Liver Model. *Ann Surg Oncol* 2004;11:650-657.
  38. Yang WJ, Addona T, Nair DG, et al. Apoptosis induced by cryoinjury in human colorectal cancer cells is associated with mitochondrial dysfunction. *Int J Cancer* 2003;103:360-369.
  39. Hanai A, Yang WL, Ravikumar TS. Induction of apoptosis in human colon carcinoma cells HT29 by sublethal cryoinjury: medication by cytochrome C release. *Int J Cancer* 2001;93:26-33.
  40. Baust JG, Gage AA. Progress toward optimization of cryosurgery. *Techn Cancer Res Treat* 2004;3:95-101.
  41. Weshahy AH, Rateb AA, Shahin ZA, et al. The Immunological Role of Cryosurgery in the Treatment of Viral Warts. *European Society of Cryosurgery – CRYOSURGERY*. Issue 7 / July 2002 /pp 10-14.
  42. Hoffmann NE, Coad JE, Huot ChS, et al. Investigation of the Mechanism and the Effect of Cryoimmunology in the Copenhagen Rat. *Cryobiology* 2001;41:59-68.
  43. Joosten JJA, Muijen GNPV, Wobbes Th, et al. In Vivo Destruction of Tumor Tissue by Cryoablation Can Induce Inhibition of Secondary Tumor Growth: An Experimental Study. *Cryobiology* 2001;41:49-58.
  44. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *NEJM* 2000;343:37-50.
  45. Bonasio R, von Andrian UH. Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2006;18:1-9.
  46. Bertho N, Adamski H, Toujas L, et al. Efficient migration of dendritic cells toward lymph node chemokines and induction of TH1 responses require maturation stimulus and apoptotic cell interaction. *Blood* 2005;106: 1734-1741.
  47. Machlenkin A, Goldberger O, Tirosh B, et al. Combined Dendritic Cell Cryotherapy of Tumor Induces Systemic Antimetastatic Immunity. *Clin Cancer Res* 2005;11: 4955-4961.
  48. Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and Autoimmunity. *NEJM* 2001;344:655-664.
  49. Mahajan SD, Aalinker R, Schwartz SA, et al. Effector cell mediated cytotoxicity measured by intracellular Granzyme B release in HIV infected subjects. *Biol Proced Online* 2003;5:182-188.
  50. Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, et al. Natural Killer (NK) Cell-mediated Cytotoxicity: Differential Use of TRAIL and Fas Ligand by Immature and Mature Primary Human NK Cells. *J Exp Med* 1998;188:2375-2380.
  51. Allavena P, Marchesi F, Mantovani A. The Role of Chemokines and their Receptors in Tumor Progression and Invasion: Potential New Targets of Biological Therapy. *Curr Can Ther Rev* 2005;1:81-92.
  52. Deng ZS, Liu J. Numerical simulation of selective freezing of target biological tissues following injection of solutions with specific thermal properties. *Cryobiology* 2005;50:183-192.
  53. Tatsutani K, Rubinsky B, Onik G, et al. The effect of thermal variables on frozen human prostatic adenocarcinoma cells. *Urology* 1996;48:441-447.
  54. Jester DM. Cryotherapy of dermal abnormalities. *Primary care*. 1997;24:269-280.
  55. Bischof JC, Smith D, Pazhayannur PV, et al. Cryosurgery of Dunning AT-1 rat prostate tumor: thermal, biophysical, and viability response at the cellular and tissue level. *Cryobiology* 1997;34:42-69.
  56. Ferris DG, Ho JJ. Cryosurgical equipment: a critical review. *J Fam Pract* 1992;35:185-93.
  57. Hocutt JE, Jr. Skin cryosurgery for the family physician. *Am Fam Physician* 1993;48:445-452.
  58. Turjansky E. 13º Curso Anual Teórico y Práctico de Criocirugía Médico Quirúrgico y Radiofrecuencia. *Asociación Médica Argentina*, 2005.
  59. Han B, Grassl ED, Barocas VH, et al. A cryoinjury model using engineered tissue equivalents for cryosurgical applications. *Ann Biomed Eng* 2005;33:972-982.
  60. Dilley AV, Dy DY, Warlters A, et al. Laboratory and animal model evaluation of the Cryotech LCS 2000 in hepatic cryosurgery. *Cryobiology* 1993;30:74-85.