

Criopreservação de células tronco e suas aplicações

Cryopreservation of stem cells and their applications

Marcelo Alves Timóteo⁽¹⁾; Wesley Botelho Sousa⁽¹⁾; Isabel Cristina Rezende Lopes⁽²⁾; Valdo José Dias da Silva⁽³⁾

(1) Bacharelado em Biomedicina pela Universidade de Uberaba; email: wesley-415@hotmail.com

(2) Mestre em Patologia Clínica. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Bioquímica Clínica e Casos Clínicos. Universidade de Uberaba

(3) Pós-doutor em Fisiologia. Universidade Federal do Triângulo Mineiro

RESUMO: Cada classe de células tronco possui seu grau potencial de diferenciação, sendo do tipo totipotentes, pluripotentes, multipotentes e paucipotentes. Células tronco extraídas do corpo humano podem ser transplantadas para tratamento ou armazenadas para uso futuro. Para esta última faz-se necessário a criopreservação. A criopreservação de células da medula óssea é um procedimento comum que tem sido empregada com sucesso em transplantes autólogos. A conservação de células, tecidos ou qualquer amostra biológica, em temperatura negativa utilizando um crioprotetor, mantendo a amostra íntegra para ser utilizada posteriormente é denominada de criopreservação. Maximiza-se a viabilidade celular durante e após o congelamento, adicionando à solução utilizada, substâncias que agem protegendo a célula da formação do gelo intracelular. Obter informações sobre técnicas de criopreservação de células tronco com ênfase em células tronco obtidas através do sangue do cordão umbilical, medula óssea e células do sangue periférico descrevendo os procedimentos técnicos usados na criopreservação de células tronco são objetivos deste trabalho. Este estudo será baseado em revisão bibliográfica dos últimos doze anos. Mais de 50% dos protocolos de criopreservação utilizados por diversos pesquisadores demonstraram que o dimetilsulfóxido é o crioprotetor mais usado nas técnicas de congelamento, diluído na solução ou associado a outros crioprotetores, como: albumina humana, nitrogênio líquido e hidroxietil amido, além de açúcares, como: trealose e sacarose, sendo que estes protocolos apresentam sucesso na conservação celular. Dos protocolos analisados na criopreservação a técnica mais utilizada é com 10% dimetilsulfóxido sob uma taxa de congelamento equivalente a $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, devido à alta viabilidade celular.

Termos de indexação: células tronco, criopreservação, transplantes autólogos.

ABSTRACT: *Each class of stem cells has the potential degree of differentiation with the type totipotent pluripotent multipotent and paucipotentes . Stem cells extracted from the human body can be transplanted for treatment or stored for future use. For the latter it is necessary to cryopreservation . Cryopreservation of cells of the bone marrow is a common procedure that has been successfully employed in autologous transplants . The preservation of cells tissue or biological sample negative temperature using a cryoprotectant keeping the entire sample to be used later is called cryopreservation. Maximizes cell viability during and after freezing adding to the solution used substances that act to protect the cell from formation of intracellular ice. Information on the cryopreservation of stem cells with emphasis on stem cells obtained from umbilical cord blood bone marrow and peripheral blood cells techniques describing the technical procedures used in cryopreservation of stem cells are objectives of this work . This study is based on literature review of the last twelve years. More than 50% of cryopreservation protocols used by several researchers have shown that most cryoprotectants dimethylsulfoxide is used in freezing techniques diluted in solution or associated with other cryoprotectants such as human serum albumin hydroxyethyl starch and liquid nitrogen and sugars as trehalose and sucrose and these protocols have successfully in cell preservation. Protocols analyzed in cryopreservation is the most used technique with 10% dimethyl sulfoxide under a freezing rate equivalent to $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ due to high cell viability .*

Index terms: *Stem cells cryopreservation autologous transplants*

INTRODUÇÃO

Células tronco são todas as células que possuem a capacidade de se transformarem em qualquer tecido através de estímulos ainda não bem esclarecidos, ou seja, uma única célula pode se tornar um neurônio ou um cardiomiócito, por exemplo. Cada classe de células tronco possui seu

grau potencial de diferenciação. As células tronco totipotentes são as mais poderosas células tronco, pois sozinhas, mesmo se separada do grupo de 8 células formadas durante o período de desenvolvimento do embrião, têm o poder de gerar um novo ser. Logo após este estágio, as células se tornam pluripotentes e passam a ser chamadas de células tronco embrionárias, que estão em voga nos

dias atuais em meio a discussões bioéticas e religiosas, por terem a capacidade de se diferenciar em qualquer tecido do corpo. Depois desse estágio elas se tornam multipotentes, paucipotentes ou unipotentes com a capacidade limitada apenas a alguns poucos ou apenas um tecido formado por células somáticas. (ZATZ, 2004).

A descoberta de novas fontes de células multipotentes adultas tornou-se crucial para o prosseguimento dos estudos, devido fato de existirem muitos problemas bioéticos envolvendo as células tronco embrionárias (ARAÚJO et al., 2005). Nosso corpo está repleto de células tronco, na sua grande maioria, paucipotentes ou unipotentes, como por exemplo as células da camada basal da pele e as células base dos folículos pilosos. Porém, existem locais onde ainda é possível obter células tronco multipotentes adultas direcionadas à formação tecidual específica, como as células multipotenciais primitivas da medula óssea, que dão origem aos vários hemoderivados (DEL CARLO, 2005), além disso existem outros lugares onde essas células tronco adultas podem ser encontradas como o fígado, cérebro e tecido adiposo. (ARAÚJO et al., 2005).

Acredita-se que essas células multipotentes permaneçam adormecidas sem sofrerem mitose no tecido que a alberga até que algo propicie a sua ativação como traumas, substâncias químicas, infecções e doenças e que estejam lá como forma de “estoque” para reposição de células velhas, através da circulação sanguínea indo para onde forem requisitadas. (ARAÚJO et al., 2005).

Está em estudo a utilização do sangue do cordão umbilical em substituição à medula óssea em transplantes para o tratamento de leucemias e outros problemas hematológicos desde o estudo de Broxmeyer no final da década de 80, quando este demonstrou ao mundo as propriedades de regeneração e hematopoiese do sangue do cordão umbilical. (CÓRDOVA-CABALLERO et al., 2002). O sangue do cordão umbilical é rico em células tronco hematopoiéticas, porém enfrenta um sério problema em termos práticos de transplante para medula óssea de adultos, já que o volume obtido na extração pós-parto é muito pequeno e pode não ser suficiente para a cura desejada, sendo necessário a criação de protocolos de expansão *in vitro* para células mononucleares pluripotentes hematopoiéticas (YAO et al., 2004). Entretanto estas células apresentam algumas grandes vantagens, segundo Córdoba-Caballero e colaboradores (2002), como a já citada riqueza de células multipotentes, o grande número de doadores potenciais, a possibilidade de criação de um banco de cordão umbilical baseado nas origens étnicas de cada população, baixos riscos para a criança doadora do cordão, baixa prevalência de infecções, particularmente pelo citomegalovírus.

O uso das células tronco do cordão umbilical em transplantes, tem se expandido de tratamentos de doenças hematológicas para as

doenças auto-imunes, imunodeficiências, disfunções metabólicas, entre outras. (YAO et al., 2004; BERZ et al., 2007). No protocolo de transplante atual, as células tronco são retiradas do cordão umbilical no momento em que a criança nasce em um volume que varia de 50 a 100 mililitros para serem utilizadas posteriormente. Esse sangue contém em média 30 células multipotentes hematopoiéticas por microlitro. (CÓRDOVA-CABALLERO et al., 2002). O transplante destas células pode ser executado em até 72 horas após o instante da coleta. Após este período é necessário que se obedeça protocolos para o armazenamento dessas células. Rotineiramente a amostra do cordão umbilical colhida é conservada em bancos de cordão umbilical, onde são feitos registros de possíveis beneficiários que podem usufruir desta amostra futuramente. (BERZ et al., 2007).

As células tronco usadas nos transplantes não são encontradas somente no cordão umbilical, mas também na medula óssea e no sangue periférico de doadores tratados com fatores estimulantes, como por exemplo o fator estimulante de colônias granulocíticas (G-CSF). A preparação destas células tem se tornado comum, principalmente a seleção específica das células tronco hematopoiéticas CD34⁺ como forma de redução de casos de rejeição ou como uma tentativa de se evitar a reinfusão de células neoplásicas que possam se encontrar na medula óssea no instante da coleta, o que poderia ocasionar uma expansão destas, e conseqüentemente provocar a recidiva da neoplasia ou dano medular. (HUBEL, 1997; KOIZUMI et al., 2000). O CD34⁺ é um antígeno glicoprotéico situado na membrana plasmática das células tronco hematopoiéticas, tendo função regulatória, sendo que as células que expressam uma quantidade maior deste antígeno em sua superfície contêm alto potencial de formação de colônias. (YAO et al., 2004).

Da mesma forma que para as células do cordão umbilical, células CD34⁺ extraídas da medula óssea adulta podem ser transplantadas para tratamento ou armazenadas para uso futuro. Para esta última faz-se necessário a criopreservação das células.

Criopreservação celular

No início, o sangue completo era congelado com hidroxietilamido ou pentamido e conservado em nitrogênio, entretanto os fracos resultados de sobrevida celular no pós-congelamento levaram ao abandono dessa técnica. Em 1950, Dr. A. U. Smith realizou a criopreservação de hemácias usando como crioprotetor o glicerol a -80°C usando gelo seco e álcool (VALERI & RAGNO, 2005).

A conservação de células, tecidos ou qualquer amostra biológica, em temperatura negativa utilizando um crioprotetor, com o objetivo de manter a amostra íntegra para ser utilizada em

situações posteriores, é denominada de criopreservação. Atualmente a criopreservação de células da medula óssea é um procedimento comum que tem sido empregada com sucesso em transplantes autólogos. Através da criopreservação é possível o armazenamento e o transporte de células tronco em dose terapêutica criopreservadas sem danificá-las para o local onde serão utilizadas clinicamente, reduzindo o tempo e elevando a qualidade na realização do procedimento. (HUBEL, 1997; FLEMING & HUBEL, 2006).

Para maximizar a viabilidade celular durante e após o processo de congelamento são adicionados, junto com solução extracelular, substâncias químicas que agem interna ou externamente protegendo a célula da formação do gelo intracelular. A forma como o crioprotetor age é muito complexa, pois o seu efeito protetor geralmente está ligado à sua habilidade de se unir às moléculas de água ou diretamente na célula alvo para evitar a formação de gelo intracelular. (CÓRDOVA-CABALLERO et al., 2002). O crioprotetor mais estudado e utilizado em diversos protocolos de criopreservação é o dimetilsulfóxido (Me_2SO ou DMSO), devido às suas características higroscópicas que age retirando a água de dentro da célula. (RODRIGUES et al., 2008).

Estudos têm pesquisado a viabilidade das células tronco do cordão umbilical na criopreservação após um período de armazenamento de 6 meses. Diversos métodos têm sido usados para medir a capacidade ativa de regeneração das células congeladas e depois descongeladas. Estudos demonstraram que células hematopoiéticas permaneceram com atividade satisfatória mesmo sendo criopreservadas por 8 ou até 11 anos. (BERZ et al., 2007).

As células tronco são resfriadas de modo gradativo em temperaturas abaixo de zero para impedir a formação de cristais de gelo no citoplasma celular. Em adição, as células são suspensas em um meio hipertônico o qual remove a água de dentro da célula, desidratando-a. Com pouca água em seu interior a probabilidade de formação de gelo intracelular se reduz consideravelmente. Quando expostas a altas taxas de resfriamento de forma rápida, além da formação de gelo extracelular, ocorre também a formação de gelo intracelular, pois não há tempo para a que a água que existe dentro do citoplasma seja removida por diferença de concentração, fazendo com que esta água intracelular congele-se culminando com a morte celular. O resfriamento e descongelamento celular são de extrema importância para estabelecer a viabilidade das células, pois durante o início do processo de congelamento elas se encontram hidratadas e em estágio de equilíbrio com o conteúdo a sua volta, além de estarem sujeitas a mudanças térmicas e químicas. Nas células tronco em que ocorrem a formação de gelo intracelular, o aquecimento gradativo pode fazer com que os cristais de gelo aumentem de tamanho, intra e extracelularmente levando à danos letais.

Entretanto, estudos demonstram que células que foram congeladas de modo lento sem a criação de gelo no seu interior, não se danificaram com o aquecimento no pós-descongelamento. (HUBEL, 1997). Este processo está esquematizado pela Figura 1:

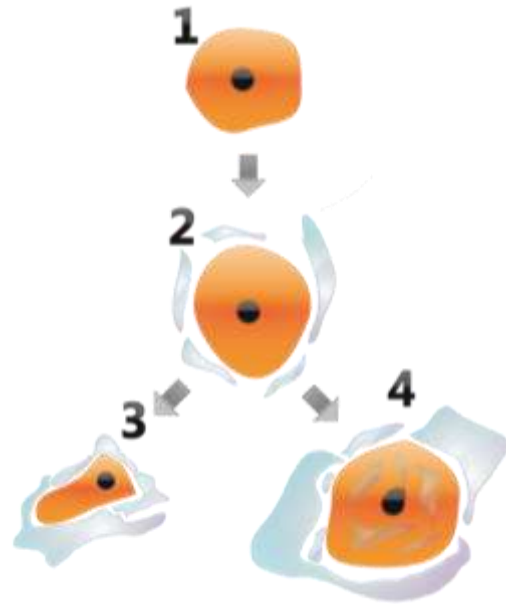


Figura 1: Processo de congelamento celular onde 1 é a célula não congelada, 2 é a formação de gelo extracelular, 3 é o processo de congelamento lento com desidratação celular e 4 é o processo de congelamento rápido com formação de gelo intra celular. (HUBEL, A., 1997, p. 225, modificado mai. 2009).

Nos últimos anos para a realização do processo de criopreservação foram utilizadas principalmente as temperaturas de -196°C (fase líquida de nitrogênio), -156°C (vapor de nitrogênio) e -80°C (congeladores). Além disso, tem sido examinado a capacidade de armazenamento de células do cordão umbilical em temperatura de supra congelamento correspondente a -4°C . (BERZ et al., 2007).

Usando um criomicroscópio acoplado a uma potente câmera de vídeo capaz de registrar de 8000 até 16000 *frames* por segundo (fps), Stott e Karlsson (2009) descreveram a cinética da formação de gelo intra e extracelular e suas interferências na célula, usando células endoteliais de artérias bovinas, sem crioprotetores por nitrogênio líquido.

Descobriu-se que além da formação de gelo intracelular, o gelo extracelular formado tem a capacidade de penetrar na célula, um fenômeno descrito como penetração de gelo paracelular, que pode ser visto na Figura 2. Mais tarde, analisando as imagens gravadas do processo de congelamento celular em câmera lenta sob intensidades diferentes de iluminação do criomicroscópio, descobriu-se que a -50°C todas as células sofrem danos pela formação de gelo intracelular, como demonstrado na Figura 3. (STOTT & KARLSSON, 2009).

De modo geral, o método de criopreservação de células tronco hematopoiéticas

segue os seguintes itens, segundo Berz (2007): Colheita das células tronco hematopoiéticas do doador; adição dos crioprotetores; escolha do método de congelamento; examinam-se as condições das células tronco com 72 horas de congelamento; processo de descongelamento; lavagem e preparo das células tronco doadas para serem reutilizadas.

As técnicas de congelamento têm se demonstrado de extrema importância para a preservação das células tronco, e seu controle é necessário devido a quantidade de calor que é liberada no momento do resfriamento que pode levar ao prejuízo da população dessas células tronco. (BERZ et al., 2007).

Para a criação de um protocolo eficaz de criopreservação, devem-se considerar fatores importantes principalmente relacionados à permeabilidade da membrana e volume e concentrações totais que as células CD34⁺ conseguem tolerar. (SOLVES et al., 2008).

A melhor técnica utilizada hoje para a criopreservação de células estaminais do sangue do cordão umbilical é o método lento de congelamento com dimetilsulfóxido a uma taxa de -1°C por minuto, que segundo Hubel é ótima para células mononucleares, porém letal para as hemácias. (HUBEL, 1997; SOLVES et al., 2008).

A quantidade total de células congeladas e o volume e concentração dos crioprotetores adicionados a elas têm sido relacionados com as toxicidades decorrentes dos transplantes destas ao receptor. Com isso, foi sugerido a diminuição da concentração destas células sendo inferior a 2×10^7 /mL. (BERZ et al., 2007).

O processo de lavagem de células estaminais da medula óssea para a retirada do crioprotetor utilizado após ser realizado o descongelamento têm sido um método frequente, devido à suposta toxicidade do DMSO. De modo geral, a lavagem celular tem beneficiado a amostra, pois reduz a toxicidade do crioprotetor que está diretamente relacionado com o volume contido no enxerto destas células. (BERZ et al., 2007).

Estima-se que a taxa de mortalidade observada em pacientes no pós transplante de células, estão ligadas a agentes infecciosos relacionados ao processo, como por exemplo: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus epidermidis*. No geral, o índice de contaminação destes agentes, foi de 0 a 4,5% dos casos. Entretanto este fato representa um risco aos pacientes imunodebilitados. (BERZ et al., 2007).

Relatos demonstram que células tronco provenientes da medula óssea possuem maior tendência em ser contaminadas por agentes microbiológicos, devido ao método como é realizada sua coleta. (BERZ et al., 2007).

Agentes crioprotetores

Para maximizar a viabilidade celular durante e após o processo de congelamento são

adicionados, junto com solução extracelular, substâncias químicas que agem interna ou externamente protegendo a célula da formação do gelo intracelular. A forma como o crioprotetor age é muito complexa, pois o seu efeito protetor geralmente está ligado à sua habilidade de se unir às moléculas de água para evitar a formação de gelo intracelular, além de sua capacidade de reduzir os danos das altas concentrações de solutos presentes para realizar a desidratação celular a fim de promover a não formação de gelo no interior da célula. (CÓRDOVA-CABALLERO et al., 2002). O crioprotetor mais estudado e utilizado em diversos protocolos de criopreservação é o dimetilsulfóxido (DMSO), devido suas características higroscópicas que age retirando a água de dentro da célula. Suas características foram descritas originalmente por Lovelock e sua equipe em 1959. (RODRIGUES et al., 2008).

O DMSO é um composto orgânico, límpido, semi-oleoso, sem cheiro quando puro, descoberto em 1867 por fabricantes de papel. Deriva-se da lignina, substância que dá rigidez às células vegetais. Manteve-se sem utilização específica até a segunda guerra mundial, quando passou a ser utilizado como solvente até que em 1961 foi utilizado como fármaco pela primeira vez por Stanley W. Jacob, a fim de conseguir preservar órgãos para transplantes. A molécula do DMSO, C₂H₆SO é solúvel tanto em meio aquoso quanto em meios orgânicos, possuindo grande capacidade de penetrar em órgãos, tecidos e células. (Melo et al., 2008) Mais tarde o dimetilsulfóxido foi utilizado pela indústria farmacêutica como anti-inflamatório e introduzido para tratamento de doenças auto-imunes. (BERZ et al., 2007).

Além do dimetilsulfóxido, existem outras substâncias crioprotetoras como o glicerol, o hidroxietilamido, o 1,2-propanodiol (ótimo para tecidos, principalmente pele) e alguns açúcares que protegem a membrana celular de danos mecânicos internos e externos. Para utilização na criopreservação de células tronco, os crioprotetores mais utilizados são o dimetilsulfóxido e o hidroxietilamido. (CÓRDOVA-CABALLERO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2008; FLEMING & HUBEL, 2006)

O hidroxietilamido é um fármaco utilizado como expansor plasmático para tratamento de hipovolemias e choque e como agente sedimentante de hemácias e usado para separação de granulócitos. O hidroxietilamido é uma macromolécula com reduzido teor osmótico comparado ao seu peso molecular, o que impede que este se difunda para o interior celular, e por isso é denominado como substância crioprotetora não-penetrante. O modo como o hidroxietilamido protege a célula ainda não é devidamente esclarecido, mas acredita-se que ele favoreça a vitrificação do espaço extracelular, e que quando associado à algum crioprotetor intracelular, reduz a intensidade das lesões provocadas pela desidratação celular e pela pressão mecânica do gelo extracelular. Também

nota-se que o uso do hidroxietilamido amplia as possibilidades de uso de taxas e velocidades de congelamento, sem muito risco para as células e por causa disto, têm se utilizado esse composto em protocolos onde a taxa de congelamento é do tipo temperatura não programada em congeladores mecânicos a -80°C . Entretanto, o uso do hidroxietilamido e seus derivados podem levar a possíveis danos à membrana celular, como acontece com hemácias. (DE SANTIS & PRATA, 2009)

Temperatura

Nos últimos anos para a realização do processo de criopreservação foram utilizadas principalmente as temperaturas de -196°C (fase líquida de nitrogênio), -156°C (vapor de nitrogênio) e -80°C (congeladores). Estudos têm demonstrado uma proliferação de agentes infecciosos nos recipientes de nitrogênio líquido. Devido a este fato, pesquisas revelam resultados satisfatórios na criopreservação das células tronco utilizando vapor de nitrogênio em -156°C . Além disso, tem sido examinada a capacidade de armazenamento de células do cordão umbilical em temperatura de supra congelamento correspondente a 4°C . (BERZ et al., 2007).

Taxa de congelamento

A técnica de congelamento tem se demonstrado de extrema importância para a preservação das células tronco, e seu controle é necessário devido a quantidade de calor que é liberada no momento do resfriamento, prejudicando a população dessas células tronco.

Na taxa de congelamento controlado, as células tronco do cordão umbilical, medula óssea e as células do sangue periférico, sofrem queda de $1-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até atingirem a temperatura de -40°C . Após esta temperatura, a taxa de congelamento diminui de forma mais rápida ($3-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$), até chegar a uma temperatura de -120°C . (BERZ et al., 2007).

Na taxa de congelamento descontrolada as células são resfriadas a -4°C , e logo após, congeladas a temperatura de -80°C em congelador mecânico. Relatórios demonstraram que este processo é seguro e apresenta resultados que se comparam a taxa de métodos controlados de células tronco. (BERZ et al., 2007).

Durabilidade

Estudos têm pesquisado a viabilidade das células tronco do cordão umbilical na criopreservação após um período de armazenamento de 6 meses. Diversos métodos têm sido usados para medir a capacidade ativa de regeneração das células congeladas e depois descongeladas. Análises têm relatado que a unidade formadora rápida de eritrócitos (BFU-E) e a unidade formadora de colônias granulocíticas e

monocíticas (CFU-GM) são prejudicadas precocemente no congelamento, entretanto, células nucleadas e $\text{CD}34^{+}$ conservam-se por um período de tempo maior sem sofrer danos. A avaliação executada no Hospital de Birghan demonstrou que células hematopoiéticas permaneceram com atividade satisfatória mesmo sendo criopreservadas por até 11 anos. Outro estudo realizado em Seattle, revelou uma recuperação completa dos pacientes transplantados com células sanguíneas hematopoiéticas após as mesmas terem sido armazenadas por 8 anos, sem qualquer indício de lesão celular. (BERZ et al., 2007).

Entretanto, acredita-se que materiais biológicos em geral podem ser armazenados indefinidamente, já que o dano ao DNA dessas células, quando criopreservadas corretamente, pode levar de 5000 a 10000 anos para acontecer. Como se trata de células humanas, usadas para terapias em humanos, não é recomendável utilizar células "velhas" congeladas. (CÓRDOVA-CABALLERO et al., 2002).

Dependendo do protocolo de criopreservação, alguns outros tipos celulares podem ser preservados por muito mais tempo, especialmente as células anucleares, como por exemplo as hemácias, que se criopreservadas com glicerol a 40% v/v a -80°C , podem ser estocadas por até 37 anos, e as plaquetas, se preservadas com 6% de DMSO a -80°C , por até 2 anos. (VALERI & RAGNO, 2005).

Concentração celular

A quantidade total de células congeladas e os criopreservantes adicionados a elas têm sido relacionados com as toxicidades decorrentes dos transplantes destas ao receptor. Com isso, foi sugerido a diminuição da concentração destas células sendo inferior que $2 \times 10^7/\text{mL}$. Entretanto pesquisas demonstraram que volumes maiores de células troncos armazenadas obtiveram resultados positivos e não ocasionaram efeitos adversos para as mesmas. (BERZ et al., 2007).

Processo de descongelamento e lavagem

O processo de lavagem de células estaminais da medula óssea para a retirada do crioprotetor utilizado após ser realizado o descongelamento tem sido um método frequente, devido à suposta toxicidade do DMSO. De modo geral, a lavagem celular tem beneficiado a amostra, pois reduz a toxicidade do crioprotetor que está diretamente relacionado com volume contido no enxerto destas células. (BERZ et al., 2007).

O processo padrão atual segue duas fases de descongelamento, onde as células tronco são descongeladas com 2,5% de albumina humana, a segunda utiliza-se 5% de dextran 40, no qual centrifuga-se a 10°C por 10 min. Ao sobrenadante são colocados mais duas vezes a albumina humana e dextran, de modo a atingir uma concentração final

de 1,7% de DMSO. A solução final deve ser infundida a quanto antes. Este procedimento foi feito para ser confiável e seguro, porém pode apresentar erros com perda celular. (BERZ et al., 2007).

Agentes infecciosos

Estima-se que a taxa de mortalidade observada em pacientes no pós transplante de células, estão ligadas a agentes infecciosos relacionados ao processo. No geral, o índice de contaminação destes agentes, foi de 0 a 4,5% dos casos. Entretanto este fato representa um risco aos pacientes imunodebilitados. Ocorrências de sepse após o transplante de células estaminais são baixas e o desenvolvimento de casos febris é controlado com administração de antibióticos. (BERZ et al., 2007).

Relatos demonstram que células tronco provenientes da medula óssea possuem maior tendência em ser contaminadas por agentes microbiológicos, devido ao método como é realizado sua colheita. (BERZ et al., 2007).

Um surto de casos de Hepatite B em pacientes pós transplante, foi documentado, onde posteriormente foi realizado o uso de crioprotetores que estavam no mesmo recipiente. A análise identificou um aumento de crescimento do agente infeccioso na fase líquida dos crioprotetores. Como medida de prevenção do aparecimento de casos de infecções em pacientes que receberam doação de células estaminais da medula, algumas atitudes devem ser atendidas como o acompanhamento as normas de preservação de maneira rígida a realização e diagnóstico das possíveis infecções antes da infusão das células no paciente e a proteção e armazenamento da amostra em que foi identificado algum agente infeccioso. (BERZ et al., 2007)

A Tabela 1 mostra a incidência com que os agentes infecciosos foram cultivados em quatro unidades de diferentes doadores, abordando a contaminação bacteriana de amostras de células estaminais. (BERZ et al.; 2007)

Tabela 1: Culturas de Organismos – Incidência de Culturas Positivas

Organismos Cultivados	Incidência Global de culturas positivas (%)
<i>Staph. edipermidis</i> e outro coagulase negativo	3 – 11,7
<i>Staphylococcus</i> (CNS)	
<i>Propionibacterium acni</i>	0,6 – 2,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 – 1,6
<i>Bacillus cereus</i> e outros <i>Bacillus sp.</i>	0,6 – 0,35
<i>Pseudomonas sp.</i>	0,1 – 0,8
<i>Corynebacterium sp.</i>	0 – 0,3
<i>Arpergillus fumigatus</i>	0 – 0,3
Culturas Mistas	0,1 – 1,6

Fonte: (BERZ et al., 2007, p. 467) modificado em maio 2009

Possíveis aplicações

Devido ao seu alto poder de diferenciação celular e baixo risco de formação de tumores, as células tronco adultas provenientes da medula óssea e do sangue do cordão umbilical estão sendo visadas atualmente para tratamento de desordens hematológicas, imunogênicas, isquemias, restauração de tecidos lesionados como o tecido coronariano entre outros. (VOLTARELLI, 2002, 2003; MURAD-NETTO et al., 2004; ARAÚJO et al., 2005; SIMÕES et al., 2007)

Em seu estudo, Araújo e sua equipe (2005) verificaram a eficácia da injeção de células tronco endoteliais proveniente da medula óssea para estimular uma neo-formação vascular (vasculogênese e ateriogênese) em áreas dos membros inferiores lesadas pela isquemia e promover a neomiogênese e neoangiogênese para tratar o músculo necrosado.

Recentemente, Simões e seus colaboradores (2007) avaliaram os benefícios e os riscos no transplante de células tronco hematopoiéticas com a finalidade de curar a anemia falciforme, assim como suas várias formas de apresentação. Em todos os estudos avaliados, houve melhora e estabilização de sintomas nos pacientes transplantados. Porém, no Brasil, a experiência foi realizada apenas com sete pacientes, sendo que um veio a óbito em decorrência do procedimento, um se manteve em estado controlado, quatro não apresentaram mais os sintomas da doença (SIMÕES et al., 2007).

Quanto ao uso de sangue do cordão umbilical o tratamento para doenças hematológicas de ordem genética pode ser somente alcançado através do transplante de células tronco hematopoiéticas. (SIMÕES et al.; 2007).

As células tronco adultas do sangue do cordão umbilical, medula óssea e sangue periférico após estimulação também estão sendo utilizadas em pesquisas para a cura de doenças auto-imunes desde a década de 70. (VOLTARELLI, 2002). O princípio é o mesmo do que o transplante de células progenitoras para a promoção da cura em pacientes falcêmicos, pois há a tentativa de substituir as células brancas produtoras de anticorpos auto-imunes por células saudáveis. Os benefícios dessa técnica estariam ligados à melhora de sintomas como os causados pelo pênfigo e problemas renais causados pelo lúpus eritematoso sistêmico (LES). (VOLTARELLI, 2003). Pacientes com LES tratados nesse regime, por seleção celular através da coleta da medula óssea ou por aférese após estimulação, apresentaram melhoras significativas em suas funções renais, com queda dos níveis de creatinina, proteinúria, fator anti-nuclear (FAN) e anti-DNA nativo, mostrando que o transplante de células autólogas pode ser considerado um procedimento terapêutico alternativo. Entretanto, notou-se que a melhora era mais evidente em pacientes com menos tempo de instalação da doença. (VOLTARELLI, 2003).

Dentro da área da reconstituição celular, a terapia com células tronco mostra-se extremamente promissora, principalmente no campo da cardiologia, em reabilitação de pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio. Uma equipe de médicos no Rio de Janeiro liderados por Murad-Netto (2004) desenvolveu uma nova técnica de infusão de células progenitoras da medula óssea selecionadas pelo marcador CD34⁺ na região lesionada, através de perfusão coronariana retrógrada, que se mostrou extremamente viável com boa recuperação do paciente.

Ainda há muitas outras possíveis aplicações para essa terapêutica, entretanto é necessário ainda muito estudo e pesquisa para que se alcance um patamar biologicamente seguro para o uso dessas células, considerando os riscos já conhecidos, como formação de tumores e tecidos diferentes do local de implantação.

Para todas estas aplicações pode se tornar necessário o armazenamento destas células para uso futuro, tornando a criopreservação um procedimento essencial para o adequado armazenamento de células tronco.

REVISÃO TEÓRICA

Este estudo tem como objetivo obter informações sobre as técnicas de criopreservação de células tronco, com ênfase em células tronco obtidas através do sangue do cordão umbilical, medula óssea e células do sangue periférico, assim como descrever detalhadamente os procedimentos técnicos mais usados e eficazes na criopreservação de células tronco sendo baseado em revisão bibliográfica dos últimos quinze anos realizada através da utilização de bases de dados como: Scielo, Bireme, Lilacs, Pub Med, além de publicações científicas pertinentes ao tema como Stem Cells, Cell, Cell Stem Cell, Nature, Nature Medicine, Science, PNAS, Cryobiology, entre outras. É de extrema importância conhecer as melhores técnicas de criopreservação de células tronco, pois os campos da citogenética, biologia celular e molecular e terapia celular estão em evidência e progressivo crescimento. O processo de conservação celular faz parte de todas essas linhas de pesquisa e ação, além de se expandir a outras áreas disponíveis ao trabalho do profissional biomédico como, por exemplo, a reprodução humana.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar melhor os protocolos de criopreservação, utilizamos como critério de inclusão, artigos científicos de prática de experimentos, excluindo os artigos de revisão de literatura para termos uma melhor acuidade frente aos dados obtidos, uma vez que os pesquisadores que realizaram experimentos atestaram os seus próprios resultados. Os resultados estão separados e expostos nas Figuras 4,5 e 6.

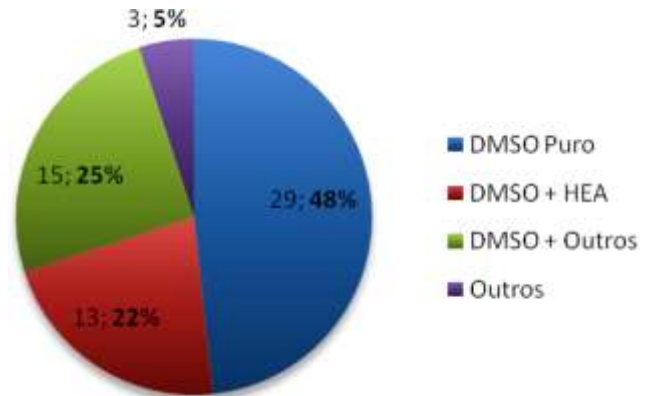


Figura 4: Representação quantitativa do número de protocolos aplicados ou citados segundo o crioprotetor utilizado.

Na Figura 4, foram analisados 60 protocolos de criopreservação de células tronco pesquisados ou citados na literatura, sendo que 29 (48%) utilizaram como crioprotetor o DMSO (dimetilsulfóxido) de forma isolada ou pura, 13 (22%) utilizaram o DMSO combinado com hidroxietil amido (HEA), 15 (25%) usaram o DMSO associado com outros criopreservantes ou substâncias estabilizadoras do processo e 3 (5%) utilizaram em seus protocolos outros crioprotetores. Portanto a maioria dos protocolos estudados utilizou no processo de criopreservação o DMSO de forma pura (48%).

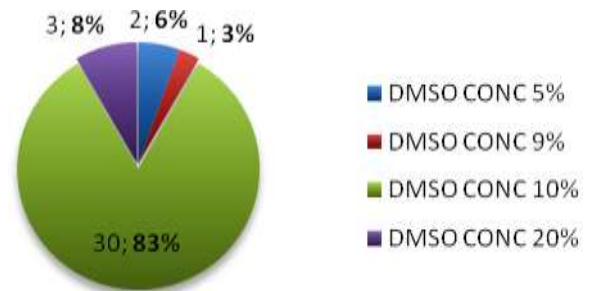


Figura 5: Representação quantitativa de protocolos baseados no crioprotetor dimetilsulfóxido segundo a concentração do mesmo.

Na Figura 5, foram analisados 36 protocolos de criopreservação descritos na literatura que utilizaram DMSO isoladamente, sendo que 30 (83%) trabalharam com uma concentração de 10% de DMSO, (38%) fizeram suas pesquisas com concentração de 20% de DMSO, 2 (6%) utilizaram 5% DMSO, e 1 (3%) usou o DMSO na concentração de 9%. Portanto a maioria dos protocolos que utilizaram o DMSO puro trabalharam na concentração de 10% no processo de

criopreservação demonstrando-se bem a frente das demais concentrações citadas acima.

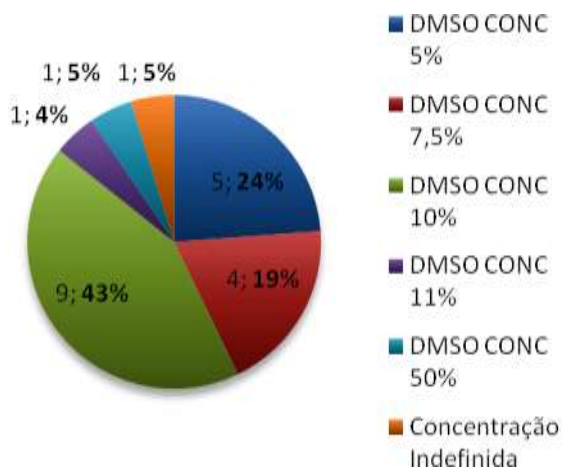


Figura 6: Representação quantitativa dos protocolos de criopreservação com base no dimetilsulfóxido combinado a algum outro aditivo (HEA, açúcares, etc) segundo a concentração do mesmo.

Na Figura 6, foram analisados 21 protocolos de criopreservação de células tronco que utilizaram DMSO associado com outras substâncias crioprotetoras, sendo que 9 (43%) usaram o DMSO na concentração de 10% juntamente com outra substância, 5 (24%) pesquisaram com 5% DMSO associado com outra substância, 4 (19%) utilizaram 7,5% DMSO mais uma substância, 1 (5%) trabalharam com o DMSO á 50% associado com outro componente, 1 (5%) utilizaram 11% de DMSO associado a outro componente e 1 (4%) não tiveram sua concentração definida no estudo citado na literatura. Portanto a maioria dos protocolos que inseriram em sua pesquisa o DMSO, utilizaram-no na concentração de 10%, em uma frequência muito maior do que as demais concentrações trabalhadas.

As soluções crioprotetoras são preparadas seguindo protocolos estudados previamente e geralmente alcançam temperaturas abaixo dos 15°C antes que aconteça qualquer formação de gelo extracelular. Esse fenômeno é chamado de super resfriamento e acontece devido à liberação de calor latente pelos componentes. Para células embrionárias esse fenômeno não é favorável, sendo necessários "semear" o gelo na solução com pinças resfriadas na parte externa dos recipientes criogênicos quando esta se encontra a -7°C (ÁVILA-PORTILLO et al., 2006). Protocolos de criopreservação de células pluripotentes e multipotentes geralmente são realizados utilizando solução fisiológica acrescida de 10% de DMSO e 1% de albumina humana. O problema enfrentado por esse protocolo é que mesmo com a amostra descongelada e lavada, a infusão desse material pode levar a sérios efeitos colaterais no paciente receptor, como revelou um inquérito feito em 97 centros de transplantes, onde náuseas e vômitos foram observadas em 2,2% dos casos, problemas

cardiovasculares acometeram 27%, eventos respiratórios em 17%, disfunções no sistema nervoso central representou 5% e insuficiência renal foi relatado em 5% dos casos, houve ainda casos de hipertensão, bradicardia, hemólise intravascular e choque anafilático. (Berz et al., 2007; Rodrigues et al., 2008). Centros de transplante de células tronco hematopoiéticas para correção de desordens hematológicas responderam a um questionário formulado por Windrum e sua equipe (2005), a fim de investigar a incidência de reações adversas relacionadas com a infusão de células criopreservadas com DMSO. Como resultado, obteve-se resposta de 97 centros analisados, sendo que 95 deles usavam apenas o DMSO como crioprotetor, variando a sua concentração de centro para centro. Dessa forma, pôde-se avaliar a incidência de toxicidade do DMSO relacionando-o a concentração utilizada e com os procedimentos realizados, esquematizados na Figura 7. Sendo assim, é possível observar que nos procedimentos com concentração de 10% de DMSO e amostra não lavada no descongelamento apresentou incidência maior da toxicidade, quando comparado as concentrações de 5%-10% (conjugados) e 5% DMSO.

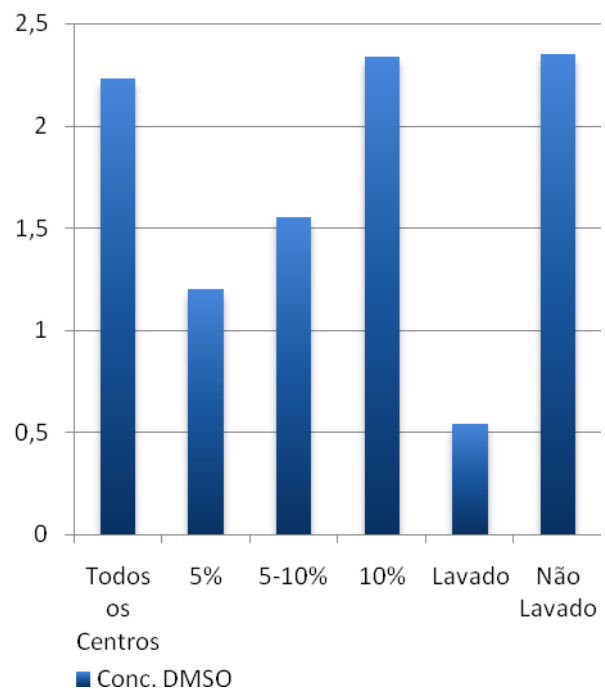


Figura 7: Incidência da toxicidade relacionada à concentração utilizada e ao procedimento de lavagem celular. **Fonte:** (WINDRUM et al., 2005, p. 602) modificado em maio 2010

Para a criação de um protocolo eficaz de criopreservação, devem-se considerar fatores importantes principalmente relacionados à permeabilidade da membrana e volume total que as células CD34⁺ conseguem tolerar. Com isso, foi realizado um estudo para avaliar a permeabilidade e

danos as células utilizando água e solução de dimetilsulfóxido (DMSO) (10% v/v) a temperaturas iniciais de $-1,5^{\circ}\text{C}$ e -20°C . Os valores demonstraram que houve uma maior condutividade pela membrana celular da solução de DMSO, porém, a ação de ambas as soluções trouxe prejuízo a capacidade de crescimento e diferenciação das células tronco CD34^{+} somente quando submetidas a elevação de volume de 0,6 a 4 vezes o volume padrão. (HUNT et al., 2003a, 2003b). A diminuição do volume de células do cordão umbilical aumenta o espaço de armazenamento e também ameniza a toxicidade da concentração aumentada de DMSO. (SOLVES et al., 2008).

A melhor técnica utilizada hoje para a criopreservação de células estaminais do sangue do cordão umbilical é o método lento de congelamento com DMSO a uma taxa de -1°C por minuto, que segundo Hubel é ótima para células mononucleares, porém letal para as hemácias. (HUBEL, 1997; SOLVES et al., 2008).

A taxa de congelamento escolhida é um fator muito importante para melhorar os resultados de recuperação celular pós-descongelamento. Podemos visualizar a importância da velocidade de congelamento aliado à concentração escolhida no estudo de Charles Hunt e colaboradores (2003) no qual o experimento conduzido, onde foi realizada a criopreservação com várias concentrações de DMSO em várias taxas de congelamento, mostrou que as células criopreservadas a uma concentração de 10% DMSO a $-1,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ tem uma melhor recuperação de unidades CD34^{+} e unidades formadoras de colônia, como esquematizado na figura 8 e 9. Vemos claramente que o melhor protocolo para maximizar a viabilidade celular é realmente o que leva a concentração de 10% de DMSO com taxa de resfriamento a $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, como descrito por vários pesquisadores anteriormente (HUNT et al., 2003b; HUBEL, 1997; SOLVES et al., 2008; FLEMING & HUBEL, 2006).

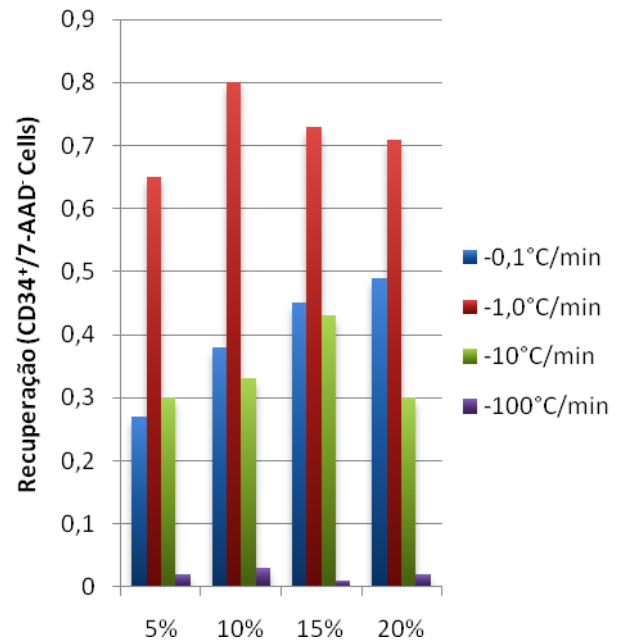


Figura 8: Viabilidade celular medida via citometria de fluxo 7-AAD para pesquisa de marcadores CD34^{+} , indicadores de potencial de diferenciação. Vemos um predomínio da barra correspondente à taxa de $-1,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ à concentração de 10% DMSO. **Fonte:** (HUNT et al., 2003b, p. 82) modificado em maio 2010.

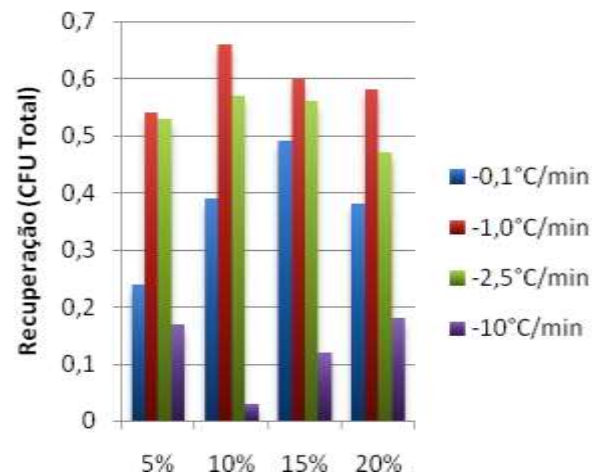


Figura 9: Viabilidade celular medida via contagem de unidades formadoras de colônias. Vemos que a barra representativa da taxa de $-1,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na concentração de 10% DMSO é a mais produtiva, indicando melhor potencial clonogênico. **Fonte:** (HUNT et al., 2003b, p. 82) modificado em maio 2010.

Apesar dos ótimos resultados obtidos por Hunt e sua equipe, outros estudos como o realizado por Akkok e colaboradores (2008) compararam o congelamento utilizando 5% e 10% de DMSO em células progenitoras do sangue periférico após o transplante autólogo. O resultado obtido não revelou alterações quanto ao número de células brancas e plaquetas após infusão em pacientes tratados para remissão de linfoma de Hodgkin e mieloma múltiplo.

Um método de criopreservação realizado pela Fundação de Acreditação de Terapia de Células Hematopoiéticas (FAHCT), usou uma dosagem de células de $2,5 \times 10^6$ a 5×10^6 células CD34⁺ por quilograma de peso. Após a passagem por várias etapas que incluem, por exemplo, centrifugação e reliquificação, foi acrescido ao processo solução heparinizante e 10% de DMSO. Inicialmente estas células foram resfriadas a -4°C e posteriormente congeladas a temperatura de -156°C (a amostra é armazenada em estado de vapor) e a -196°C (quando a amostra estava em estado líquido). (BERZ et al., 2007).

Rowley e colaboradores (2003), compararam o efeito de criopreservação de dois tipos de protocolos. O primeiro utilizou 10% de DMSO de forma isolada e o segundo utilizou 5% de DMSO juntamente com 6% de HEA (hidroxietil amido). Ambos métodos de análise teve o acréscimo de 8% de albumina humana. Na comparação das soluções crioprotetoras contidas no transplante de células tronco do sangue periférico em 294 pacientes, onde percebeu-se que os pacientes em que foram infundidas células congeladas da combinação de DMSO e HEA, tiveram recuperação de suas células brancas um dia mais rápido que os pacientes que receberam células armazenadas somente com o DMSO a 10%. O tempo de administração de antibióticos para pacientes submetidos ao transplante autólogo foi menor quando combinou DMSO com HEA no congelamento das células tronco transplantadas.

Grande parte dos transplantes de células do cordão umbilical segue o método desenvolvido pelo Centro de Cordão Umbilical de Nova York que utiliza como um bom crioprotetor, a solução de hidroxietilamido na criopreservação destas células, porém outros estudos têm feito sucesso na associação deste mesmo composto com DMSO para reforçar o efeito criopreservante. (HUBEL, 1997; BERZ et al., 2007; SOLVES et al., 2008).

Em seu procedimento, Koizumi e colaboradores (2000) realizaram duas criopreservações, sendo que uma com células CD34⁺ não purificadas, e a segunda com células CD34⁺ purificadas (retiraram-se as células anômalas). Estas células CD34⁺ foram criopreservadas com um composto contendo 4% albumina humana sérica (AHS), 6% hidroxietilamido (HEA) e 5% DMSO, onde foram colocadas em um freezer a -80°C e armazenadas em nitrogênio líquido.

Rodrigues e sua equipe (2008) analisaram a eficácia da adição de dois açúcares como crioprotetores naturais, com a finalidade de reduzir a concentração de DMSO utilizada no protocolo convencional (DMSO 10% v/v) para que se obtivesse a mesma eficiência crioprotetora do DMSO sozinho, porém com menor quantidade dessa substância a fim de minimizar os efeitos colaterais provocados após infusão dessas células. Concluíram que com a adição de trealose e sacarose, dois crioprotetores naturais muito

utilizados por diversos organismos para se manterem inertes em temperaturas abaixo de zero, além de reduzirem em 50 a 75% a concentração de DMSO, unidos a ele, separadamente, possuíram poder crioprotetor similar a ele sozinho com concentração 10%.

Na pesquisa realizada por Scheinkonig e equipe (2004), as PBSC foram congeladas através de dois tipos de métodos distintos: 10% de DMSO e trealose a 1, 0,5 e 0,25M com ou sem insulina. O uso da insulina combinada com a trealose é uma tentativa de aumentar a absorção do açúcar pelas células, resultado comprovado em insetos. As células criopreservadas com DMSO apresentaram as melhores taxas de viabilidade celular no pós descongelamento, sendo comparável apenas com os resultados obtidos com 0,5M de trealose sem insulina. Notou-se que a ausência ou presença da insulina no método não teve diferença significativa.

Outro estudo pesquisou-se a eficiência da criopreservação de células tronco através de 10% de DMSO e 0,2M de trealose sendo incorporado intra e extracelularmente, com um volume final de 1 mL de uma substância chamada RPMI que se assemelha a um ágar. Foi adicionada à solução de trealose uma proteína chamada H5 presente no *Staphylococcus aureus* que age na membrana celular elevando a porosidade e conseqüentemente tornando-a mais permeável à entrada da trealose, que ameniza os danos celulares no momento do congelamento. O conteúdo foi congelado em taxa controlada e colocado em um freezer a -80°C. A análise do método demonstrou que as concentrações com ausência de trealose extracelular apresentaram uma redução para 42-62% na viabilidade celular, e após adição do açúcar no meio anteriormente à adição da proteína H5, esta viabilidade se elevou a 87%. O estudo revelou que a trealose pode ser usada como único criopreservante, estando presente nos meios intra e extracelular. A trealose se mostrou capaz de estabilizar as proteínas celulares, sendo responsável por promover ligações de hidrogênio nos agrupados de fosfolípidios, preservando a membrana durante o congelamento. O processo de proteção deste açúcar foi semelhante, senão melhor aos métodos de DMSO, já que não são conhecidos os efeitos adversos que a utilização desse açúcar possam causar. (BUCHANAN et al, 2004).

Outro processo alternativo para a criopreservação de células é a utilização do propilenoglicol, um composto formado por alfa tocoferol, catalase e ácido ascórbico. Dados estatísticos da Alemanha demonstram que a ativação das caspases no descongelamento pode fazer com que as células tronco entrem em apoptose ocasionando morte celular. Assim, um inibidor de caspases tem sido estudado de modo a evitar danos celulares. (BERZ et al., 2007).

CONCLUSÃO

Dos protocolos analisados, constatamos que a maioria utilizava, ou citava como a melhor técnica de criopreservação de células tronco o método onde se utiliza dimetilsulfóxido a 10% v/v sob uma taxa de congelamento equivalente a -1°C/min, decrescendo até a temperatura de estocagem escolhida, que varia de acordo com as possibilidades do laboratório onde foi realizada a pesquisa, como por exemplo -80°C. Ainda assim, há presença de procedimentos considerados antigos, porém eficazes, que utilizam hidroxietilamido como coadjuvante juntamente com uma concentração menor de dimetilsulfóxido (por exemplo, 5% v/v) a fim de facilitar a eluição do DMSO e reduzir os efeitos colaterais na infusão dessas células ao doador, e novos estudos têm considerado o uso de açúcares (trealose e sacarose) como aditivos para maximizar a técnica e diminuir o uso do DMSO pelo mesmo motivo citado anteriormente.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J. D. et al. A terapia celular no tratamento da isquemia crítica nos membros inferiores. **Jornal Vascular Brasileiro**, Porto Alegre, v. 4, n. 4, p. 357-365, dez. 2005.
- ÁVILA-PORTILLO, L. M. Fundamentos de Criopreservación. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecologia**, Caracas, v. 57, n. 4, p. 291-300, out. 2006.
- BERZ, D. et al. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells. **American Journal of Hematology**, Estados Unidos, v. 82, p. 463-472, jan. 2007.
- BUCHANAN, S. S. et al. Cryopreservation of stem cells using trehalose: Evaluation of the method using a human hematopoietic cell line. **Stem Cells and Development**, Estados Unidos, v. 13, n. 3, p. 295-305, jul. 2004.
- CÓRDOVA-CABALLERO, M. S. et al. Transplantes de células progenitoras hematopoyéticas, **Gaceta Médica de México**, Cidade del México, v. 138, n. 1, mar./abr. 2002.
- DE SANTIS, G. C.; PRATA, K. L. Criopreservação de células-progenitoras hematopoiéticas. **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP**, Ribeirão Preto, v.42, n.1, p.36-47, jan./mar. 2009.
- DEL CARLO, R. J. Células Tronco: Células da Esperança. **Revista CFMV**, Brasília, v. 11, n. 35, p. 60-68, maio-ago, 2005.
- FLEMING, K.K.; HUBEL, A. Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells. **Tranfusion and Apherisis Science**, Estados Unidos, v. 34, n. 3, p. 309-315, jun. 2006.
- HUBEL, A. Parameters of Cell Freezing: Implications for the Cryopreservation of Stem Cells. **Tranfusion Medicine Reviews**, Estados Unidos, v. 11, n. 3, p. 224-233, jul. 1997.
- HUNT, C. J. et al. Cryopreservation of umbilical cord blood: 1. Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity and permeability of CD34⁺ cells to dimethyl sulphoxide. **Cryobiology**, Estados Unidos, v. 46, n. 1, p. 61-75, nov. 2003a.
- HUNT, C. J. et al. Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34⁺ cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing. **Cryobiology**, Estados Unidos, v. 46, n. 1, p. 76-87, nov. 2003b.
- KOIZUMI, K. et al. Large scale purification of human blood CD34⁺ cells from cryopreserved peripheral blood stem cells, using a nylon-fiber syringe system and immunomagnetic microspheres. **Bone Marrow Transplantation**, Estados Unidos, v. 26, n. 7, p. 787-793, out. 2000.
- MELO, J. U. S. et al. Efeitos do dimetilsulfóxido no estresse oxidativo e na regeneração hepática pós-hepatectomia em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 2, abr. 2008.
- MURAD-NETTO, S. et al. Terapia de Células-tronco do Infarto Agudo do Miocárdio, Através de Perfusão Coronariana Retrógrada. Uma Nova Técnica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 83, n. 4, p. 349-351, out. 2004.
- RODRIGUES, J.P. et al. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical Cord blood. **Cryobiology**, Estados Unidos, v. 56, n. 2, p. 144-151, abr. 2008.
- ROWLEY, S. D. et al. A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch. **Bone Marrow Transplantation**, Estados Unidos, v. 31, n. 11, p. 1043-1051, jun. 2003.
- SCHEINKONIG, et al. Adoption of long-term cultures to evaluate the cryoprotective potential of trehalose for freezing hematopoietic stem cells. **Bone Marrow Transplantation**, Estados Unidos, v. 34, p. 531-536, mai. 2004.
- SIMÕES, B. P. et al. Transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) em doenças falciformes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 327-330, jul./set. 2007.

SOLVES, P. et al. Influence of volume reduction and cryopreservation methodologies on quality of thawed umbilical cord blood units for transplantation. **Cryobiology**, Estados Unidos, v. 56, n. 2, p. 152-158, fev. 2008.

STOTT, S. L.; KARLSSON, Jens O.M. Visualisation of intracellular ice formation using high-speed video cryomicroscopy. **Cryobiology**, Estados Unidos, v. 58, n. 1, p. 84-95, fev. 2009.

VALERI, C. R.; RAGNO, G. Cryopreservation of human blood products. **Transfusion and Apheresis Science**, Estados Unidos, v. 34, n. 3, p. 271-287, nov. 2005.

VOLTARELLI, J. C. Transplantes de células tronco hematopoiéticas para doenças auto-imunes no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São José do Rio Preto, v. 24, n. 3, p. 9-13, mar. 2002.

VOLTARELLI, J. C. et al. Transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas para nefrite lúpica: resultados brasileiros iniciais. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 65-72, jan./fev./mar. 2003.

WINDRUM, P. et al. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT

centres. **Bone Marrow Transplantation**. Estados Unidos, v. 36, n. 7, p. 601-603, out. 2005.

YAO, C.-L. et al. A systematic strategy to optimize ex vivo expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells. **Experimental Hematology**, Estados Unidos, v. 32, n. 8, p. 720-727, ago. 2004.

ZATZ, M. Clonagem e células-tronco. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 18, n. 51, p. 247-256, ago. 2004.

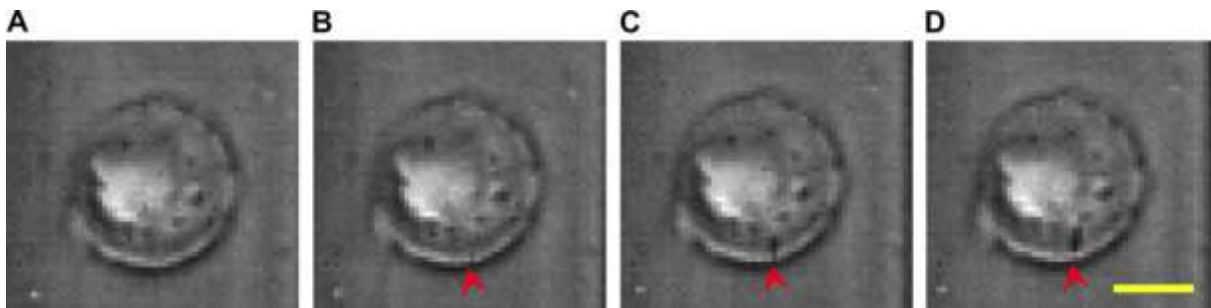


Figura 2: Microfotografias dos *frames* capturados representando a penetração de gelo paracelular durante a taxa de congelamento elevada em células endoteliais arteriais bovinas a $-14,5^{\circ}\text{C}$ (A), $-14,9^{\circ}\text{C}$ (B), $-15,6^{\circ}\text{C}$ (C) e $-16,1^{\circ}\text{C}$ (D). Os pontos escuros são cristais de gelo e a seta vermelha indica a penetração de um cristal no citoplasma da célula para seu interior. A escala amarela indica o equivalente a $10\ \mu\text{m}$. (STOTT & KARLSSON, 2009)

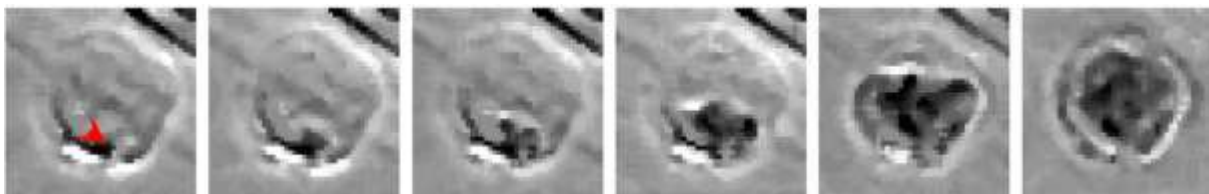


Figura 3: Microfotografias de uma gravação de alta velocidade a 8000 fps representando a formação de gelo intracelular de modo gradativo à medida da queda de temperatura até -50°C sem crioprotetores exposto em ordem da esquerda para a direita. A seta vermelha indica o início da cristalização e as imagens subseqüentes indicam a evolução do processo até o total preenchimento e conseqüente morte da célula. (STOTT & KARLSSON, 2009)