Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Juliana Pessanha Rodrigues Motta

Avaliação da trealose como crioprotetor natural de Células-Tronco Hematopoiéticas de sangue de cordão umbilical e placentário

Rio de Janeiro

2012

Juliana Pessanha Rodrigues Motta

Avaliação da trealose como crioprotetor natural de Células-Tronco Hematopoiéticas de sangue de cordão umbilical e placentário

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luis Cristóvão Moraes Sobrino Pôrto

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M921 Motta, Juliana Pessanha Rodrigues.
Avaliação da trealose como crioprotetor natural de células-tronco hematopoiéticas de sangue de cordão umbilical e placentário / Juliana Pessanha Rodrigues Motta. – 2012.
65f.

Orientador: Luís Cristóvão Moraes Sobrino Pôrto.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1.Genética humana - Teses. 2. Células-tronco – Criopreservação - Teses. 3. Trealose - Teses. 4. Lipossomos. I. Pôrto, Luís Cristóvão Moraes Sobrino. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 575

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura Data

Juliana Pessanha Rodrigues Motta

Avaliação da trealose como crioprotetor de Células-Tronco Hematopoiéticas de sangue de cordão umbilical e placentário

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de agosto de 2012.

Banca Examinadora:

_____

Dr. Luis Cristóvão de M. S. Porto (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Dra. Cristiana Solza
Hospital Universitário Pedro Ernesto - UERJ

_____

Dr. Flávio Henrique Paraguassú-Braga
Instituto Nacional do Câncer

_____

Dra. Andreza Alice Feitosa Ribeiro
Hospital Israelita Albert Einstein

_____

Dr. Hélio dos Santos Dutra
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2012

AGRADECIMENTOS

A Deus que me permitiu chegar até esta etapa, sempre me abrindo portas e me socorrendo nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Dr. Luís Cristóvão Pôrto, pelo incentivo profissional e apoio à realização deste trabalho.

Ao Flávio Henrique Paraguassú-Braga, supervisor do Banco de Sangue de Cordão Umbilical do INCa (BSCUP), pelo acolhimento, pela paciência e inestimável ajuda na realização deste trabalho.

Ao Dr. Luís Fernando Bouzas, por abrir as portas do INCa, para realização deste projeto.

Aos amigos do BSCUP e do Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação da UERJ, pelo incentivo e por tornar o dia a dia no laboratório mais descontraído.

À minha amiga Carla Lira, por toda força e companheirismo nos “megas” experimentos que duravam o dia todo.

Às enfermeiras do BSCUP, pelas coletas dos cordões umbilicais nas maternidades.

A toda minha família, pelo incentivo, pelo carinho, pela paciência que tiveram nos meus momentos de estresse, muito obrigada, amo todos vocês.

Ao meu esposo Rodolpho, pelo amor, companheirismo e paciência, além de todos bons momentos de alegria.

Ao meu filho João Henrique que com apenas 1 ano já me incentiva e me da a força que preciso para continuar a luta de todos os dias.

A todos os meus amigos, que cada um a sua maneira me incentivou na realização deste trabalho.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

MOTTA, Juliana Pessanha Rodrigues. *Avaliação da trealose como crioprotetor natural das Células-Tronco Hematopoiéticas de sangue de cordão umbilical e placentário*. 2012. 65 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O sangue do cordão umbilical e placentário (SCUP) tem sido usado como fonte de células-tronco hematopoiéticas (CTH) para reconstituir a função medular (hematopoiese). A maioria das vezes, esta modalidade de transplante requer a criopreservação das CTH, que permanecem congeladas até uma possível utilização futura. Na criopreservação de CTH, o reagente químico dimetilsulfóxido (DMSO) tem sido utilizado como um crioprotetor. No entanto, tem sido provado que DMSO tem efeitos tóxicos para o corpo humano. Muitos organismos na natureza possuem uma capacidade de sobreviver ao congelamento e à desidratação acumulando dissacarídeos, como a trealose e sacarose, por isso a trealose, tem sido investigada como um crioprotetor alternativo para diversos tipos celulares. Outro dano muito comum durante o congelamento é a formação de espécie reativas de oxigênio (ERO) que diminui a viabilidade celular, por isso a adição de bioantioxidantes na solução de criopreservação das células é passo muito importante. Este estudo foi dividido em duas fases na primeira foram avaliados os resultados obtidos com a adição de antioxidantes na solução de criopreservação das células de SCUP e na segunda fase avaliou-se a hipótese que a solução de criopreservação contendo trealose intracelular e extracelular melhora a recuperação e a viabilidade das células-tronco do SCUP, após a criopreservação**.** SCUP foi processado e submetido à criopreservação em soluções contendo na primeira fase: soluções com diferentes concentrações de DMSO (10%, 5% e 2,5%), assim como as combinações de DMSO (5%, 2,5%) com um dos dissacarídeos (60mmol/L) e ácido ascórbico e/ou catalase (10mg/mL); e na segunda fase: soluções contendo diferentes concentrações de DMSO (10% e 2,5%), assim como as combinações de DMSO (2,5%) com trealose intra (a trealose foi introduzida na célula por meio de lipossomas) e extracelular e soluções contendo trealose intra e extracelular sem DMSO, armazenados por duas semanas em N_2L, e descongeladas. As células descongeladas foram avaliadas por citometria de fluxo, pelo ensaio metabólico pelo MTT e de unidades formadoras de colônias (UFC). Na primeira fase do estudo, a catalase, melhorou a preservação das células CD34+ e CD123+, a UFC e a viabilidade celular, em comparação com a solução padrão de criopreservação. Já na segunda fase do estudo, após as análises de todos os testes vimos que a solução que continha trealose intra/extracelular e DMSO mostrou uma capacidade de manutenção da viabilidade/integridade celular superior a todas as outras testadas. A solução que continha trealose intra e extracelular sem DMSO, obteve um resultado comparável com seu controle (2,5%DMSO), porém quando avaliamos a solução que continha apenas trealose intracelular não obtivemos resultados satisfatórios. A catalase pode atuar sobre a redução dos níveis ERO na solução de criopreservação das CTH de SCUP, diminuindo os danos por ele causados e a trealose deve estar presente em ambos os lados das células durante o processo de congelamento. Portanto, em testes clínicos futuros, ela poderá ser um potencial crioprotetor das células-tronco de SCUP, podendo substituir totalmente o DMSO da solução de criopreservação, minimizando com os efeitos colaterais provenientes da infusão de produtos criopreservados nos pacientes.

Palavras-chave: Sangue de cordão. Trealose. Criopreservação. Lipossomas. DMSO.

ABSTRACT

The umbilical cord blood (UCB) has been used as a source of primitive hematopoietic stem cells (HSC) to reconstitute the hematopoiesis. Most often, it is required the cryopreservation of HSC, which remain frozen in banks for possible future use. For cryopreservation of HSC, the chemical reagent dimethylsulfoxide (DMSO) has been used as a cryoprotectant. Many organisms in nature have a capacity of survive freezing and dehydration by accumulating disaccharides, so the trehalose, has been actively investigated as an alternative cryoprotector, other damage which is very common during freezing is oxygen free radicals formation which decreases the cellular viability after thawing, so the addition of bioantioxidants in the solution of cryopreservation of cells is very important. This study was divided into two phases: first, we evaluated the results obtained with the addition of antioxidants in the solution for cryopreservation of cord blood cells and the second phase: evaluate the hypothesis that the cryopreservation solution containing intracellular and extracellular trehalose improves recovery and viability of cord blood stem cells after cryopreservation. UBC was processed and subjected to cryopreservation solutions containing for the first phase: solutions with different concentrations of DMSO (10%, 5% and 2.5%), as well as combinations of DMSO (5%, 2.5 %) with a disaccharide (60 mmol/L), ascorbic acid and/or catalase (10mg/mL), and for the second phase: solutions containing different concentrations of DMSO (10% and 2.5%), as well as combinations of DMSO (2.5%) with intracellular trehalose (trehalose was introduced into the cell by means of liposomes) and solutions containing extra and intracellular trehalose without DMSO, stored for two weeks in N2L, and thawed. The thawed cells were assessed by flow cytometry, MTT and colony forming units (CFU) assays. In the first phase of the study our analysis showed catalase improved the preservation CD34+ and CD123+ cells, cell viability and CFU compared to standard cryopreservation solution. In the second phase, after testing of all test we observed that the solution containing intra/extracellular trehalose and DMSO showed superior capacity of maintaining the cell viability/integrity in relation to the others, the solution containing intra-and extracellular trehalose without DMSO, obtained a result that can be compared with its control (2.5% DMSO), and that the solution containing only intracellular trehalose did not generate satisfactory results. The catalase can act on reducing the levels of reactive oxygen species in the solution for cryopreservation of HSC of UCB reducing the damage it caused, trehalose must be present on both sides of the cells during the freezing process. Future clinical trials are needed to confirm that it may be a potential cryoprotectant of stem cells from cord blood, which can totally replace the DMSO in cryopreservation solution, eliminating the side effects from the infusion of cryopreserved products in patients already suffering from the disease base.

Keywords: Cord blood. Trehalose. Cryopreservation. Liposome. DMSO.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fórmula molecular da trealose..... 22

Figura 2 Citometria de fluxo das células de SCUP pós-descongelamento com ácido ascórbico - avaliação das células positivas para CD45/CD34 33

Figura 3 Citometria de fluxo das células de SCUP pós-descongelamento com ácido ascórbico avaliação das células positivas para CD34/CD123 34

Figura 4 Citometria de fluxo das células de SCUP pós-descongelamento com catalase avaliação das células positivas para CD45/CD34..... 35

Figura 5 Citometria de fluxo das células de SCUP pós-descongelamento com catalase avaliação das células positivas para CD34/CD123 36

Figura 6 Ensaio metabólico pelo MTT amostras congeladas com catalase..... 37

Figura 7 Citometria de Fluxo das células de SCUP pós-descongelamento, viabilidade pela marcação do 7AAD..... 41

Figura 8 Citometria de fluxo das células de SCUP pós-descongelamento com trealose intra e extracelular avaliação das células positivas para CD45/CD34 42

Figura 9 Ensaio metabólico pelo MTT amostras congeladas com trealose intra e extracelular 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Preparação das diferentes soluções crioprotetoras - fase 1 28

Tabela 2 Preparação das diferentes soluções crioprotetoras – fase 2 28

Tabela 3 Capacidade clonogênica das células de SCUP congeladas com ácido ascórbico..... 39

Tabela 4 Capacidade clonogênica das células de SCUP congeladas com catalase..... 39

Tabela 5 Capacidade clonogênica das células de SCUP congeladas com trealose intracelular e extracelular 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA – Albumina de Soro Bovino
BFU-E – Unidades Formadoras de *Burst* – Eritróide
CAT - Catalase
CD – *Cluster Differentiation*
CEMO – Centro de Transplante de Medula Óssea
CFC – Células Formadoras de Colônias
CPAM – Células Progenitoras Adultas Multipotentes
CO_2 – Dióxido de Carbono
CTH – Células-Tronco Hematopoiéticas
DECH – Doença Enxerto Contra Hospedeiro
DMSO – Dimetilsulfóxido
ERO – Espécie Reativas de Oxigênio
GSH - Glutationa
GVL – Graft versus Leukemia
HLA – *Antigen Leucocyte Human* – Antígeno Leucocitário Humano
HES – *Hidroxietil Starch*
INCa – Instituto Nacional de Câncer
ISCT – Sociedade Internacional de Terapia Celular
kDa – Quilodaltons
mL – Mililitro
MTT – Brometo de 3- (4,5)-dimetiltialzolil-2,5 difeniltetrazolio
N_2L – Nitrogênio Líquido
NaCl – Cloreto de sódio
RDC – Resolução de Diretoria Colegiada
REDOME - Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea
SCUP – Sangue de Cordão Umbilical e Placentário
SOD – Superóxido Dismutase
Thy – Timidina
UFC-B – Unidades Formadoras de Colônias do Baço
UFC – Unidades Formadoras de Colônias
UFC-E – Unidades Formadoras de Colônias - Eritróide
UFC-F – Unidades Formadoras de Colônias do tipo Fibroblastos
UFC-GEMM – Unidades Formadoras de Colônias Eritróide-Granulócitos-Macrófago-Megacariócito
UFC-GM – Unidades Formadoras de Colônias de Granulócitos-Macrófago
PHSC – Células- Tronco Hematopoiéticas Pluripotencial
HSC – Células-Tronco Hematopoiéticas

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	12
1	**REVISÃO DA LITERATURA**.....	13
1.1	**Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas**.....	13
1.2	**Fontes de Células-Tronco.**.....	14
1.3	**Marcadores de Células-Tronco**.....	16
1.4	**Criopreservação**.....	18
1.4.1	Crioprotetores	19
2	**OBJETIVOS**.....	26
2.1	**Objetivo geral**	26
2.2	**Objetivos específicos**.....	26
3	**MATERIAIS E MÉTODOS**.....	27
3.1	**Processamento do SCUP**.....	27
3.2	**Aliquotagem dos crioprotetores e congelamento**.....	27
3.3	**Descongelamento das CTH**.....	29
3.4	**Citometria de Fluxo**.....	29
3.4.1	Quantificação de Células CD45/CD34/CD123 - fase 1	29
3.4.2	Quantificação de Células CD45/CD34/7AAD – fase 2	30
3.5	**Ensaio das unidades formadoras de Colônias (UFC)**.....	30
3.6	**Ensaio pelo MTT**	31
3.7	**Preparação dos lipossomas contendo trealose**.....	31
3.8	**Quantificação da trealose**.....	31
3.9	**Análise estatística**.....	32
4	**RESULTADOS**.....	33
4.1	**Citometria de Fluxo – fase 1**.....	33
4.2	**Ensaio de Viabilidade pelo MTT – fase 1**.....	38
4.3	**Ensaio de Unidades Formadoras de Colônias – fase 1**.....	39
4.4	**Análise da Citometria de Fluxo – fase 2**.....	41
4.5	**Ensaio de Viabilidade pelo MTT – fase 2**.....	44
4.6	**Ensaio de Unidades Formadoras de Colônias – fase 2**.....	45
5	**DISCUSSÃO**.....	47
6	**CONCLUSÃO**.....	53
	REFERENCIAS.....	54
	ANEXO A – Carta de Aceite do Comitê de Ética.....	63
	ANEXO B – Termo de consentimento Livre e esclarecido.....	64

INTRODUÇÃO

As células do sangue de cordão umbilical (SCU) são fonte alternativa e eficaz de células-tronco hematopoiéticas (CTH) para transplante e têm sido usadas com frequência crescente tanto para crianças como para adultos com doenças hematológicas malignas ou benignas e que não possuem doadores aparentados ou não aparentados HLA idênticos. Atualmente, observamos importante desenvolvimento do transplante de sangue de cordão umbilical. Mais de 10 mil transplantes já foram realizados no mundo, tanto em crianças como em adultos, principalmente nos últimos seis anos. Estima-se que haja mais de 552 mil unidades de SCU congeladas no mundo, em mais de 40 bancos.

A maioria das vezes, esta modalidade de transplante requer a criopreservação e armazenamento das CTH, para posterior infusão. No congelamento desse tipo celular, o reagente químico mais utilizado é o dimetilsulfóxido (DMSO), porém efeitos colaterais são observados em pacientes que recebem produtos criopreservados na presença do mesmo. Por essa razão pesquisas de novos protocolos de congelamento é um campo em expansão em todos os centros transplantadores.

Muitos organismos na natureza possuem uma capacidade de sobreviver ao estresse do congelamento e da desidratação, sintetizando e acumulando dissacarídeos, como a trealose, sendo assim esse açúcar tem sido ativamente investigado como um crioprotetor alternativo para diversos tipos celulares com resultados promissores.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH)

O TCTH tem como objetivo restabelecer a função medular (hematopoiese), corrigindo as síndromes de falência da medula óssea, erros inatos do metabolismo, imunodeficiências, doenças auto-imunes, neoplasias hematológicas e tumores sólidos (Armitage 1994; Edwards and Hollands 2007; Bensinger 2011).

O TCTH pode ser dividido em três modalidades, dependendo do doador das células progenitoras:

- **Alogênico:** quando as células progenitoras são provenientes de um doador geneticamente distinto, seja compatível ou não para os antígenos leucocitários humanos (HLA), relacionado ou não. Em algumas situações, é preciso a substituição completa da medula do paciente pela de um doador saudável, habitualmente um familiar com compatibilidade no sistema HLA. Este tipo de transplante apresenta complicações relacionadas a reações imunológicas entre receptor e doador, desde a rejeição até a doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH). As reações imunológicas atuam, também, sobre as células neoplásicas residuais – efeito antitumor (*graft-versus leukemia ou* GVL) – que contribui para a menor tendência de recaída da doença neste tipo de transplante.
- **Autogênico:** quando as células progenitoras utilizadas são do próprio paciente. Este procedimento se realiza, fundamentalmente, em doenças neoplásicas, tanto hematológicas, quanto em alguns tipos de tumores sólidos. Em determinadas fases destas doenças, podem ser indicadas altas doses de quimioterapia com o objetivo de erradicar completamente a doença de base. Esta quimioterapia tão intensa produz, normalmente, aplasia medular irreversível ou muito prolongada. A infusão de células progenitoras, coletadas previamente, reduz o tempo de aplasia medular e reestabelece a hematopoiese, minimizando as complicações do tratamento. Este tipo de transplante tem menos risco que o alogênico por não existir nenhum tipo de reação imunológica entre receptor e doador; por isso, pode ser usado em pacientes mais idosos. Entretanto, como o efeito antitumoral é menor, o índice de recidivas é maior.
- **Singênico:** quando realizado entre gêmeos idênticos. A identidade antigênica entre doador e receptor é absoluta e não se espera, portanto, nenhuma complicação imunológica. (Appelbaum, Herzig et al. 1978; Garcia-Castro, Segovia et al. 2000).

1.2 **Fontes de Células-Tronco**

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) podem ser coletadas diretamente na crista ilíaca, através de múltiplas punções e aspirações da medula óssea; do sangue periférico, através de realização de aférese com um equipamento específico; ou do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP). O termo transplante de medula óssea é mantido apesar de genérico, já que a aspiração de medula óssea não é mais a única maneira de se obter CTH.

Na coleta com aspiração de medula óssea, o doador é hospitalizado, e o procedimento é realizado sob anestesia geral. Depois de posicionado em decúbito ventral, são realizadas diversas punções nas cristas ilíacas posteriores da qual é aspirada a quantidade de medula óssea necessária para o transplante, usualmente estimada em 10 ml/kg de peso do receptor (Thomas and Storb 1970), que geralmente corresponde a um número adequado de células progenitoras suficiente para permitir a pega (*engraftment*) do enxerto, também denominada enxertia. O material coletado é injetado em uma bolsa apropriada ou *Becker* contendo anticoagulante e, posteriormente, filtrada para a remoção de espículas ósseas. O índice de complicações graves deste procedimento é baixo, girando em torno de 0,4% (Bortin and Buckner 1983; Armitage 1994). A queixa mais frequente é dor no local da punção, que cede com analgésicos comuns.

As CTH periféricas são coletadas com o auxílio de equipamentos de aférese, após a mobilização das mesmas da medula óssea para o sangue periférico, com a utilização de fatores estimuladores de colônias de granulócitos; no caso de pacientes submetidos a transplante autogênico, pode ser combinada a uma quimioterapia prévia. Foi durante a década de 80 que a coleta de células do sangue periférico se consagrou (Elliott, Samson et al. 1996), sendo utilizada em mais de 90% dos transplantes autogênicos.

A primeira experiência bem sucedida no uso do (SCUP) como fonte de células para reconstituição de medula óssea ocorreu em 1988, quando a Dra. Eliane Gluckman, na França, tratou com sucesso um paciente portador de anemia de Fanconi, utilizando o SCUP de seu irmão para reconstituir a função medular após quimioterapia mieloablativa (Gluckman 1989). Após esse transplante, estabeleceu-se o SCUP como uma excelente fonte de CTH e opção à utilização das células provenientes da medula óssea nos transplantes alogênicos e/ou não aparentados, o que gerou o interesse pelo armazenamento das células nele contidas. O primeiro Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário de caráter público foi fundado em Nova York, em 1992 (Rubinstein, Adamson et al. 1999; Rubinstein and Stevens 2000) encorajando o estabelecimento de outros serviços ao redor do mundo. O SCUP é coletado

logo após o nascimento da criança, sendo posteriormente processado e mantido congelado em nitrogênio líquido até a infusão (Rubinstein, Carrier et al. 1998). O SCUP possui propriedades muito interessantes como menor probabilidade de induzir DECH aguda e crônica, mesmo quando a tipagem HLA não for totalmente idêntica. Isto pode estar relacionado com a imaturidade do sistema imune logo após o nascimento, onde os linfócitos alorreativos possuem seu potencial reduzido (Eapen, Rubinstein et al. 2007).

Uma das desvantagens na utilização do uso do SCUP no TCTH é a baixa quantidade de células existente em uma unidade. Em particular, para utilização em adultos, que necessita de uma quantidade maior de células por causa do peso, por isso o uso de dois cordões é um procedimento que vem crescendo nos centros transplantadores (Koo and Ahn 2012).

Para a utilização dessa fonte de células-tronco em transplante há uma necessidade de se criopreservar as mesmas para posterior infusão, após a identificação de um receptor. A criopreservação é uma etapa muito importante no transplante, onde as células ficam congeladas, porém viáveis até o dia da sua utilização.

O Transplante de SCUP tem sido utilizado para tratar uma variedade de desordens hematológicas e doenças malignas (Gluckman 2001; Rocha, Cornish et al. 2001) e essa fonte de CTH necessita de congelamento e estocagem para seu uso futuro. No Brasil foi lançada uma rede de bancos de cordões com o objetivo de aumentar a quantidade de SCUP coletados em todo o Brasil (BRASILCORD), com grande investimento de Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES). Foram criados 13 novos bancos de cordões em todo país e a pesquisa de novos protocolos para a manutenção da qualidade dessas células é um importante passo no desenvolvimento desse empreendimento, além de promover uma melhor aceitação durante a infusão desse produto criopreservado em pacientes. (Câncer 2012)

De acordo com levantamento realizado com base nas informações do Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME), a chance de um brasileiro localizar doador em território nacional é 30 vezes maior em relação à possibilidade de encontrá-lo no exterior, por conta das características genéticas. Com a inauguração do Banco Público de Sangue de Cordão Umbilical em Curitiba, em dezembro de 2011, a Rede BrasilCord amplia a cobertura existente em todas as regiões do país. Essa é a décima segunda das 13 unidades planejadas para funcionar até 2012 no país e será inaugurado outra em Belo Horizonte (MG). Os outros onze bancos de sangue de cordão em funcionamento estão distribuídos da seguinte maneira: quatro em São Paulo, um no Rio de Janeiro (no INCA), um no Distrito Federal, um em Santa Catarina, um no Rio Grande do Sul, um no Ceará, um no Pará e um em Pernambuco. Atualmente, o país conta com cerca de 10 mil unidades de cordão armazenadas.

E os treze bancos juntos terão capacidade de armazenar até 65 mil bolsas de material genético da população brasileira - quantidade considerada ideal para a demanda de transplantes no país, somada à colaboração dos doadores voluntários de medula. Outro benefício é levar desenvolvimento tecnológico, servindo de base para novos centros realizarem transplantes. O investimento médio em cada banco da expansão da Rede foi de R$ 3,5 milhões (Câncer 2012).

1.3 **Marcadores de células-tronco**

A CTH mais primitiva é multipontencial, com grande capacidade de auto-renovação e diferenciação, dando origem a CTH comprometidas com as linhagens eritroblásticas, granulocíticas, monocíticas, megacariocítica, e células linfopoiéticas (Nagasawa 2006). Constituem de 0,05% a 0,1% da medula óssea humana e das células hematopoiéticas circulantes. No microambiente do estroma medular, encontramos também, dois tipos de células-tronco, com a capacidade de se diferenciar em múltiplos tecidos de origem mesodermal (Waller, Olweus et al. 1995): as células-tronco mesenquimais (CTMs) e as células progenitoras adultas multipotentes (CPAMs).

Na medula óssea de camundongos e humanos, existem as CPAMs, que igualmente as CTMs são CD34 e CD45 negativas. Esse tipo celular expressa CD133VEGFR-2, possui baixa expressão de CD44 e não expressa CD117 (c-Kit), molécula HLA-classe I e HLA-DR (Reyes, Dudek et al. 2002). Essas células não possuem apenas a capacidade de derivar todos os tipos celulares da linhagem mesenquimal, mas também possuem a habilidade para contribuir na formação de tecidos derivados das três camadas do folheto embrionário como o fígado derivado da camada endodérmica, o cérebro da camada ectodérmica, músculo e sangue da camada mesodérmica (Bunting and Hawley 2003).

Além das células que já foram citadas acima, existem evidências que na medula óssea, além das CTH (CD45+), exista uma população rara de células-tronco não-hematopoiéticas (CD45-). Essas células não-hematopoiéticas expressam diversos marcadores de células-tronco pluripotentes e são encontradas na medula óssea no começo do desenvolvimento fetal, mostrando heterogenicidade e a plasticidade das células do compartimento medular (Kucia, Reca et al. 2005).

O fenótipo da célula tronco hematopoiética inclui a expressão dos antígenos CD34 e CD90 (Thy-1). O antígeno CD34 funciona como uma molécula de adesão e o Thy-1 parece

estar envolvido na sinalização da transdução gênica (Humeau, Bardin et al. 1996). O anticorpo CD34 é largamente utilizado como marcador específico para caracterizar e isolar células-tronco humanas (Civin, Strauss et al. 1984; Cicuttini, Begley et al. 1992). Esse anticorpo também é expresso em algumas células endoteliais e fibroblastos embrionários. Os níveis de expressão do antígeno CD34 na membrana celular diminuem de acordo com a maturidade das células dentro do compartimento medular e as células CD34+ são cerca de 10 vezes menos frequentes em sangue periférico do que na medula óssea (Civin 1992).

Em estudos anteriores, animais que receberam infusão de células CD34+ purificadas após irradiação, foram capazes de reconstituírem a hematopoiese, enquanto animais, que receberam a fração celular CD34- não readquiriram esta capacidade (Berenson, Andrews et al. 1988). Células hematopoiéticas primárias expressam altos níveis de CD34, essa expressão diminui com o amadurecimento da célula (Andrews, Singer et al. 1989; Civin 1992). Através da utilização de híbridos somáticos humanos, o gene que codifica a molécula CD34, foi localizado no braço longo do cromossomo número 1. Este gene codifica uma glicoproteína de peso molecular de aproximadamente 115kDa. A sequência deste gene é conhecida e o produto proteico está relacionado à sinalização celular, adesão e/ou transdução (Gratama, Sutherland et al. 2001).

Muitos laboratórios desenvolveram estudos relacionados ao anticorpo monoclonal CD34, devido ao fato do mesmo reconhecer antígenos específicos presentes na membrana de 1 a 3% das células da medula óssea humana, incluindo células blásticas imaturas, mas não são expressos nas células maduras incluindo linfócitos, granulócitos, hemácias e plaquetas (Andrews, Singer et al. 1986). Estudos posteriores mostraram que, o antígeno CD34 é encontrado em todas as células hematopoiéticas comprometidas, que são medidas em ensaios com culturas de células formadoras de colônias, incluindo progenitores eritróides (BFU-E), progenitores de granulócitos-monócitos (UFC-GM) e progenitores que resultam de colônias com linhagens mistas Unidades Formadoras de Colônias Eritróide-Granulócitos-Macrófago-Megacariócito (UFC-GEMM) (Berenson, Andrews et al. 1988).

Além disso, o antígeno CD34 também regula negativamente a indução de citocinas que promovem a diferenciação e proliferação das células CD34+. Estudos com camundongos *knockout* para CD34 revelaram uma hematopoiese normal, porém ocorre um profundo atraso na reconstituição hematopoiética, quando esses camundongos sofrem uma irradiação subletal. Em resumo, a expressão de CD34 representa um estado específico do desenvolvimento hematopoiético, que pode alterar as propriedades aderentes, e a potencialidade de expansão e diferenciação, tanto em condições *in vivo* ou *in vitro* (Gangenahalli, Singh et al. 2006).

A detecção da expressão do antígeno CD34 dentro da população de leucócitos CD45+ é muito utilizada para identificar células progenitoras hematopoiética da linhagem linfoide e também da linhagem mieloide (Allan, Keeney et al. 2002).

O antígeno CD45 (antígeno comum leucocitário), é uma única e ubíqua glicoproteína de membrana com uma massa de aproximadamente 200kDa, é expresso em todas as células hematopoiéticas, com exceção dos eritrócitos maduros (Nakano, Harada et al. 1990). Alterações na expressão das moléculas de CD45 são conhecidas por ocorrer durante o desenvolvimento normal das células hematopoiéticas humanas, onde apresentam características de células mais primitivas e são definidas pela co-expressão da molécula de CD34 (Lansdorp, Sutherland et al. 1990).

O crescimento das células-tronco progenitoras hematopoiéticas depende de uma hierarquia de fatores de crescimento, entre os quais a interleucina 3 (IL-3) que é uma citocina que possui capacidade de estimular o crescimento das células comprometidas com as linhagens específicas. IL-3 sozinha ou em combinação com outros fatores de crescimento hematopoiéticos, tais como fator de células-tronco (SCF), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), também são responsáveis em ajudar o crescimento e proliferação das multilinhagens *in vitro* (Ahmed, Khokher et al. 1999; Kawada, Ando et al. 1999; Pierelli, Scambia et al. 1999). IL-3 exerce as suas atividades biológicas através da ligação a receptores específicos de superfície celular. Uma única classe de receptores de elevada afinidade para IL-3 é detectado em diferentes células humanas, incluindo as células-tronco progenitoras, granulócitos, monócitos, megacariócitos e linfócitos B (Kitamura, Sato et al. 1991). O receptor da cadeia alfa da IL-3 humana foi designado CD123, e consistem em três domínios extracelulares, um domínio transmembranar e um domínio intracelular curto. (Barry, Korpelainen et al. 1997). Estudos da expressão do CD123 podem fornecer informações importantes sobre o efeito da IL-3 em células progenitoras primitivas e linhagens comprometidas e por essa razão esse receptor deve ser bem preservado em protocolos de criopreservação.

1.4 **Criopreservação**

A criopreservação utiliza temperaturas ultrabaixas para preservação de células e/ou tecidos para transplante. (Begin, Bhatia et al. 2003). Esse é o caso no TCTH. O princípio é simples e envolve mais conceitos bioquímicos e termodinâmicos do que fisiológicos: em temperaturas ultrabaixas (-196ºC) praticamente todas as reações estão paralisadas, somente ocorrendo aquelas de

foto-decomposição. Logo, em teoria, colocando um sistema biológico a essas temperaturas, pode-se preservá-lo por um tempo indeterminado (Mazur 1984).

A perfeita criopreservação é guiada pela velocidade de congelamento, que não deve ser nem muito rápida (-20° C/min.), nem muito lenta (-0,5^{o} C/min.). Quando uma suspensão celular é congelada muito lentamente, o meio externo congela primeiro ao meio interno (intracelular), promovendo a criação de um gradiente osmótico transmembranar. Esse gradiente osmótico, onde a concentração dos solutos é maior fora das células, aumenta a atividade da água intracelular, que sai da célula, desidratando-a. Essa desidratação é danosa à célula, e é mais aguda quão mais lento é esse congelamento (Mazur 1984; Berz, McCormack et al. 2007).

Por outro lado, quando uma célula é congelada muito rapidamente, ocorre à formação de cristais de gelo intracelulares, que expandem o volume celular, levando à destruição da célula (Mazur 1984).

O meio termo, ou seja, o equilíbrio desses dois fatores pode ser atingido a uma velocidade de congelamento ideal, que de maneira controlada pode garantir a viabilidade das células. Obviamente, a velocidade ideal de congelamento também é uma função do tipo celular em questão, que tem suas próprias características de atividade da água intracelular, permeabilidade de membranas à água e solventes, entre outros fatores (Acker and McGann 2003). Contudo, não basta apenas uma velocidade de congelamento ideal. Na prática corrente, fazemos uso de moléculas acessórias que denominamos crioprotetores (Mazur 1984; Berz, McCormack et al. 2007).

1.4.1 Crioprotetores

Os crioprotetores são reagentes que alteram a distribuição da água no processo de congelamento, evitando os efeitos destrutivos da desidratação e da formação de cristais de gelo.

Os crioprotetores normalmente são divididos em duas classes:

i) Crioprotetor Intracelular – com baixo peso molecular que permeiam pelas membranas celulares e são eficazes para minimizar os danos do congelamento atuando em ambos os lados das células (intra e extracelular). Ex. DMSO e Glicerol.

ii) Crioprotetor Extracelular – possui o peso molecular relativamente alto, maior ou igual à sacarose (342 Dalton), não penetra nas células e por isso, são mais eficazes na proteção contra os danos do congelamento no meio extracelular, atuando diretamente na membrana da célula. Ex. Trealose, Sacarose e HES.

No TCTH, o crioprotetor mais utilizado é o dimetilsulfóxido (DMSO) (Rowley and Anderson 1993). O DMSO é um componente polar higroscópico desenvolvido originalmente como solvente químico. Sua propriedade crioprotetora foi descrita primeiramente em 1959 (Lovelock and Bishop 1959). O DMSO age reduzindo o dano celular causado pelos efeitos da concentração de sais no meio de congelamento e possui estrutura que lhe permite fazer ligações (ponte de Hidrogênio) com molécula de água, diminuindo assim a formação de cristais de gelo, reduzindo o aumento de tamanho desses cristais e diminuindo a concentração de solutos nos meios extra e intracelulares. (Sauer-Heilborn, Kadidlo et al. 2004).

Durante o congelamento, a tolerância osmótica dos granulócitos é muito menor do que dos linfócitos ou das CTH maduras, e por isso, os granulócitos são destruídos durante o processo de congelamento. As hemácias sofrem lise quando o produto é descongelado. Assim, o produto das CTH descongeladas possui debris de granulócitos (ex. fragmentos de membranas e enzimas), fantasma de hemácias e hemoglobina livre, que contaminam o produto a ser infundido (Davis, Rowley et al. 1990).

No organismo, o DMSO é convertido em dimetilsulfona e dimetilsulfida e eliminado pela urina. A excreção renal corresponde a 44% da dose de DMSO administrada (Egorin, Rosen et al. 1998). No soro a meia-vida do DMSO é de aproximadamente de 20 horas. A metabolização renal do dimetilsulfona é de 72 horas (Willhite and Katz 1984). Uma pequena porção do DMSO é convertida em dimetilsulfida, que é expelido direto pelo pulmão aproximadamente em 24h, esse é o odor característico do hálito de pacientes que receberam a infusão das CTH. (Sauer-Heilborn, Kadidlo et al. 2004).

O maior problema com os crioprotetores, e esse é o caso do DMSO, é sua toxicidade. Efeitos colaterais em produtos criopreservados com essa substância são os efeitos colaterias gerados nos pacientes. Os sintomas mais frequentes são: náuseas, vômitos, hipertensão, hipotensão e bradicardia. Mas também foram relatados dor de cabeça, cólicas abdominais, rubor, diarréia, calafrios, febre e aperto no peito (Stiff, Koester et al. 1987; Kessinger, Schmit-Pokorny et al. 1990; Zambelli, Poggi et al. 1998)

Estudos também têm mencionado complicações nervosas, gastroentéricas e principalmente cardiovasculares com pacientes submetidos a transplante autogênico e alogênico com CTH criopreservadas. Essas complicações têm sido sempre associadas à quantidade de DMSO infundida via intravenosa, haja vista a toxicidade relativa ao DMSO (Alessandrino, Bernasconi et al. 1999).

Esses efeitos ficam mais evidenciados nos transplantes de SCUP, onde o receptor, geralmente criança e, portanto com baixo peso, recebe maiores quantidades de DMSO por kg de peso. As complicações mais comuns durante e imediatamente após a infusão das células são

náuseas, vômitos, febre, dispneia, anafilaxia, hematúria e dor abdominal, mas também são relatados bradicardia e parada cardiorrespiratória as quais são relacionadas à presença do DMSO no produto da infusão (Corso, Vukelja et al. 1993; Dhodapkar, Goldberg et al. 1994; Zambelli, Poggi et al. 1998; Alessandrino, Bernasconi et al. 1999; Benekli, Anderson et al. 2000).

Apesar de o DMSO ser um crioprotetor que atende às necessidades de proteger as células contra os danos causados pelo congelamento, os efeitos colaterais que ele causa nos pacientes que recebem produtos criopreservadas e a toxicidade apresentada nas células, fazem com que a busca de novos crioprotetores para a prática clínica em terapia celular, seja um campo em expansão.

Alguns protocolos utilizam menores concentrações de DMSO associado ao hidroxietilamido (HES, um crioprotetor extracelular), promovendo a criopreservação a temperaturas subótimas (-80ºC) por médio prazo entre 1 e 2 anos (Egorin, Rosen et al. 1998), outros protocolos lavam o DMSO das células criopreservadas, antes da infusão nos pacientes (Rubinstein, Dobrila et al. 1995; Fraser, Cairo et al. 1998), porém relatam que a perda celular e o risco de contaminação são muito maiores, prejudicando a enxertia e aumentando o risco de mortalidade (Rubinstein, Dobrila et al. 1995).

Muitos organismos como as leveduras, esporos de bolores, cistos de crustáceos, alguns nematódeos e outros estão fisiologicamente aptos a responder e sobreviver por longos períodos ao estresse da desidratação (Lao, Polayes et al. 2001; Meyers 2006). Essa propriedade está geralmente relacionada à síntese e acúmulo de dissacarídeos, como a sacarose e a trealose (Pellerin-Mendes, Million et al. 1997; Crowe and Crowe 2000; Meyers 2006).

Em nossos estudos anteriores (Rodrigues, Paraguassu-Braga et al. 2008) sugerimos que a concentração de DMSO pode ser reduzida para 1/4 daquela utilizada normalmente nos centros de transplantes, quando adicionamos a essa solução, 10% de um dos dissacarídeos (trealose e sacarose), sem afetar o número total das células progenitoras com habilidade de formar colônias – UFC e sem afetar as células formadoras de colônias do tipo granulócito-macrófago, com mais de 1000 células - UFC-GM. O uso de concentrações reduzidas de DMSO em associações com dissacarídeos não afetam à viabilidade celular e a clonogenicidade das CTH de SCUP, e provavelmente quando utilizadas em pacientes irá amenizar os efeitos colaterais, observados em pacientes que são submetidos ao transplante, utilizando essas células criopreservadas.

A trealose (Figura 1) consiste em um dissacarídeo, não redutor, isomérico a maltose, (duas moléculas de glicose unidas covalentemente por uma ligação osídica em seus respectivos carbonos 1), muito comum em leveduras como o *S. cereviseae*, com propriedades de conferir resistência à anidrobiose, ou seja, ao estresse da desidratação (Ohtake, Schebor et al. 2006). Como o processo

de criopreservação leva a uma desidratação que é danosa às células, os dissacarídeos como a trealose poderiam atuar na criopreservação dessas, tornando-se um crioprotetor natural. A trealose tem sido efetivamente aplicada para a preservação de células humanas e órgãos tais como as hemácias do sangue, plaquetas, oócitos, pele fetal humana dentre outros sem apresentar toxicidade (Beattie, Crowe et al. 1997; Eroglu, Russo et al. 2000; Wolkers, Walker et al. 2001; Erdag, Eroglu et al. 2002; Eroglu, Lawitts et al. 2003).

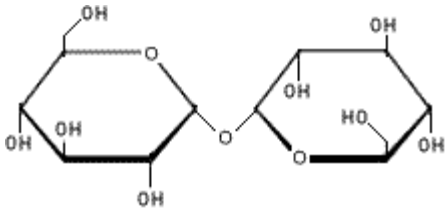

Figura 1. Trealose é um dissacarídeo constituído por duas moléculas de glicose: glicose-α (1→1)-glicose.

Diversos estudos mostraram que dissacarídeos, como sacarose e trealose auxiliam na proteção de membranas celulares e proteínas, durante o processo de desidratação (Wolkers, Walker et al. 2001; Wolkers, Tablin et al. 2002) e que muitos organismos na natureza sobrevivem a esse tipo de estresse devido ao acúmulo e síntese dessas moléculas (Oliver, Leprince et al. 2001; Ohtake, Schebor et al. 2005). Outros trabalhos utilizam a trealose na preservação da integridade dos fosfolipídios de lipossomas (Ohtake, Schebor et al. 2005).

Esses dissacarídeos são excelentes agentes vitrificadores, processo através do qual a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo e metaestável (Fahy, MacFarlane et al. 1984; Kasai and Mukaida 2004), além disto, não apresentam toxicidade para as células mesmo quando se acumulam em grande quantidade. Dissacarídeos mostram alta eficiência na estabilização das membranas celulares durante o congelamento, em comparação com os crioprotetores tradicionais. Seu efeito protetor está supostamente associado à vitrificação das membranas celulares no citoplasma (Hirsh 1987; Koster 1991).

Além de suas propriedades crioprotetoras, a trealose faz parte da dieta natural humana, tendo como principais fontes cogumelos e plantas. Diversos mamíferos possuem atividade trealásica no soro, rins, fígado e intestino, dissociando a trealose em glicose (Van Handel 1968; Arola, Koivula et al. 1999). Estudos farmacocinéticos da trealose injetada por via intravenosa em modelos animais revelou que, dependendo do modelo, a trealose é dissociada de maneira eficiente, elevando os níveis séricos de glicose, se normalizando após 90 min. pós-infusão (Sato, Okamoto et al. 1999). Quando não dissociada, mais uma vez dependendo do modelo, a trealose pode ser encontrada na urina, sendo expelida de maneira eficiente (Demelier, Labat et al. 1975).

Tais estudos, voltados à ideia da utilidade da trealose como crioprotetor, nos indicariam que a infusão de células com trealose em pacientes seria facilmente metabolizada e tolerada pelos mesmos, diferente do DMSO, que depende da difusão e diluição no corpo para excreção, além do fato que a trealose, possivelmente, não causaria nenhum efeito colateral nos pacientes que receberiam as CTH criopreservadas.

A trealose é inodora, incolor, ligeiramente doce e não tóxica o que a torna um conservante ideal. Sua capacidade de preservar materiais biológicos à temperatura ambiente, fora do gelo, abre perspectivas importantes. O sangue, por exemplo, pode ser liofilizado por um processo que usa trealose o que permite guardá-lo à temperatura ambiente, sem necessidade de refrigeração, facilitando seu transporte para lugares inóspitos (Pellerin-Mendes, Million et al. 1997).

Por outro lado, as campanhas de vacinação dependem em grande escala de freezer para conservação e transporte das vacinas, devido às distâncias e ao nosso clima tropical, grandes quantidades são perdidas, desperdício este que poderia ser evitado se as vacinas fossem preparadas em presença de trealose (Colaco, Sen et al. 1992).

Conservação de órgãos para transplante é outro aspecto interessante. Os japoneses já mostraram o uso da trealose na preservação de pulmões caninos. Aplicações na conservação de alimentos desidratados também têm um aspecto econômico importante e já se sabe que a trealose preserva o aroma dos alimentos (Patist and Zoerb 2005).

Por ser um dissacarídeo de alto peso molecular (378.33 g/mol), a trealose torna-se um crioprotetor extracelular, estudos já demonstram que para se obter uma viabilidade eficiente, torna-se necessário que esse açúcar esteja presente em ambos da membrana celular durante o congelamento (Eroglu, Russo et al. 2000; Acker, Lu et al. 2003), sendo essa introdução de forma ativa.

A atividade intracelular da trealose está reduzida nas células de mamíferos por essas, não possuírem a capacidade de sintetizar e acumular esse dissacarídeo naturalmente. Alguns estudos vêm desenvolvendo técnicas para introduzir a trealose nessas células, tais como engenharia genética com proteínas mutantes que formam poros nas células (Eroglu, Russo et al. 2000; Acker, Lu et al. 2003) variações de temperaturas para formar poros (Wolkers, Walker et al. 2001), modificações genéticas (Guo, Puhlev et al. 2000), eletroporação (Mussauer, Sukhorukov et al. 2001) e permeabilização utilizando laser de alta intensidade (Kohli, Acker et al. 2005). Como todas essas técnicas tem se mostrado com várias limitações técnicas e práticas, nós investigamos o uso de lipossomas como uma estratégia de permeabilização para introduzir a trealose nas células.

Os lipossomas são vesículas esféricas sintéticas, microscópicas, composta por uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas. Podem formar-se espontaneamente, quando as moléculas

anfipáticas são colocadas em meio aquoso (Lasic 1988). O foco inicial da pesquisa de lipossomas estava na área da bioquímica da membrana. Os lipossomas foram primeiramente avaliados como análogo sintético de membranas naturais, o que facilitou a sua utilização no estudo das propriedades da membrana celular, tais como a estrutura e fluidez. No entanto, ao longo das duas últimas décadas, os lipossomas ganharam reconhecimento como um meio útil de entrega para substâncias não penetrantes nas células, incluindo drogas, enzimas, hormônios e material genético (Poste and Papahadjopoulos 1976; Banerjee 2001).

Uma tendência semelhante pode ser observada na pesquisa bioproteção. Crowe foi pioneiro no uso de lipossomas como modelo de membranas para estudar os mecanismos pelos quais a trealose protege as membranas celulares durante a liofilização (Crowe, Crowe et al. 1988), ao passo que, outros investigadores também utilizaram lipossomas como ferramentas para a caracterização do comportamento das células durante o congelamento e descongelamento e a vitrificação (Anchordoguy, Rudolph et al. 1987; Anchordoguy, Cecchini et al. 1991). Mais recentemente, os lipossomas têm atraído à atenção no campo bioproteção, sendo utilizado como veículo de entrega de trealose em hemácias humanas, com o mínimo de danos às membranas celulares (Holovati, Gyongyossy-Issa et al. 2009).

Além da formação de cristais de gelo e a desidratação, a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante o processo de congelamento é outro problema que prejudica ainda mais a viabilidade celular (Katkov, Katkova et al. 1998; Kearney 1998). Alguns estudos já mostraram que a adição de certos antioxidantes na solução de criopreservação, melhora a recuperação da viabilidade celular pós-descongelamento (Limaye 1997).

Os antioxidantes são moléculas ou substâncias capazes de converter as ERO em água, com a finalidade de prevenir a sua superprodução (Agarwal, Prabakaran et al. 2005). Em baixas concentrações, os antioxidantes retardam ou inibem a oxidação de um determinado substrato oxidável de maneira eficaz (Sies and Stahl 1995). Nas células, os antioxidantes podem atuar por meio de dois sistemas: o sistema enzimático e o sistema não enzimático. Os antioxidantes enzimáticos são também conhecidos como antioxidantes naturais e constituem o primeiro sistema a agir. Esse sistema é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD); peroxirredoxinas, glutationa (GSH), glutationa redutase (GSH redutase), glutationa peroxidase (GSH peroxidase) e catalase (CAT). O sistema não enzimático inclui vários compostos hidrofílicos e lipofílicos, como vitamina C (ácido ascórbico ou ascorbato) e vitamina E (α-tocoferol), além de diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (Nordberg and Arner 2001). O sistema de defesa antioxidante da célula pode atuar reparando a lesão ocorrida, como fazem o ácido ascórbico, a GSH redutase e a GSH peroxidase, ou ainda, de forma mais eficaz,

removendo as ERO antes destas causarem a lesão, como é o caso da CAT e do α-tocoferol (Agarwal, Saleh et al. 2003).

Dessa forma, nesse estudo, nós pretendemos avaliar o efeito antioxidante do ácido ascórbico e da catalase na solução de criopreservação das células de SCUP e avaliar a potencialidade da trealose intra e extracelular como crioprotetor das CTH de SCUP.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Testar a utilização da trealose como crioprotetor de CTH de SCUP.

2.2 Objetivos específicos

Na fase 1 do projeto ou Bioantioxidantes e Criopreservação:

- Avaliar a utilização da catalase e ácido ascórbico, como bioantioxidantes, na solução de criopreservação das células do sangue de cordão umbilical contendo dissacarídeos como a trealose e sacarose e baixas concentrações de DMSO, para esse objetivo, utilizamos os seguintes testes:
    - Citometria de fluxo para CD45/CD34/CD123
    - Unidades formadoras de colônias (UFC)
    - Viabilidade celular pelo MTT

Na fase 2 do projeto ou Adição de trealose intra e extracelular:

- Avaliar a combinação da utilização da trealose intracelular e extracelular, na criopreservação das células do sangue de cordão umbilical, para esse objetivo, utilizamos os seguintes testes:
    - Citometria de fluxo para CD45/CD34/7AAD
    - Unidades formadoras de colônias (UFC)
    - Viabilidade celular pelo MTT

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para fase 1 e 2 - Foram utilizadas 3 bolsas de sangue de cordão, que foram coletadas após consentimento das gestantes nas maternidades conveniadas com o Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Instituto Nacional de Câncer (INCa). Esse projeto foi aceito pelo comitê de ética do mesmo (nº 15/05 – anexo 1).

Para a coleta de todos os SCUP, adotaram-se os seguintes procedimentos:

- Triagem das gestantes segundo a legislação vigente
- Assinatura do termo de consentimento
- Nascimento da criança e entrega do cordão e placenta a enfermeira responsável
- Coleta do SCUP, por gravidade, após punção da veia umbilical
- Envio da unidade ao BSUP

3.1 Processamento do SCUP

No mesmo dia ou até 48 horas da coleta do sangue de cordão, esse era processado de acordo com o protocolo de rotina do banco de sangue de cordão, que segue resumido abaixo:

- Homogeneização;
- Adição de 1:5 de um agregador de hemácias (plasmin)
- Homogeneização no agitador por 10 minutos;
- Após esse período, a bolsa foi colocada na centrífuga refrigerada e centrifugada por 8 minutos a 59g na temperatura de 10°C
- Com auxilio, de um extrator de plasma foi separado todo o sobrenadante da bolsa (plasma enriquecido com células brancas) e transferido para uma bolsa auxiliar;
- A bolsa foi centrifugada pela segunda vez, 12 minutos a 500g. Dessa vez a centrifugação era para separar todo o plasma das células;
- Mais uma vez com o auxílio de um extrator, o plasma é retirado restando apenas o concentrado de células-tronco na bolsa final.
- Desse concentrado linfomononuclear, era retirada uma alíquota, para contagem e verificação da quantidade de células existentes na bolsa.

3.2 **Aliquotagem dos crioprotetores e congelamento**

Após separação da quantidade de criotubos a serem utilizados, esses eram identificados com os dados do cordão e as diferentes soluções crioprotetoras;

Com auxílio de pipetas, era aliquotado, em cada respectivo criotubo, as quantidades de cada crioprotetor - DMSO, DMSO + combinações com trealose intra e extracelular, catalase e ácido ascórbico, de acordo com cada fase do projeto – (tabela 1 e 2) onde testaremos nas CTH. Além dos crioprotetores também são aliquotados nos criotubos dextrano 40 e 5% de albumina humana (substâncias que compõem a solução de criopreservação de rotina no banco de sangue de cordão).

Tabela 1. Preparação das diferentes soluções crioprotetoras – fase 1

Solução	**DMSO (%v/v)**	**Sacarose (mmol/L)**	**Trealose (mmol/L)**	**Ácido ascórbico ou catalase (μg/mL)**
1	0	0	0	0
2	10	0	0	0
3	5	0	0	0
4	2,5	0	0	0
5	5	60	0	0
6	5	0	60	0
7	5	0	0	100
8	2,5	60	0	0
9	2,5	0	60	0
10	2,5	0	0	100
11	5	60	0	100
12	5	0	60	100
13	2,5	60	0	100
14	2,5	0	60	100

Tabela 2. Preparação das diferentes soluções crioprotetoras – fase 2

Solução	**DMSO (%v/v)**	**Tre Intra (mmol/L)**	**Tre Extra (mmol/L)**
1	0	0	0
2	10	0	0
3	5	0	0
4	5	20	0
5	5	0	60
6	5	20	60
7	0	20	0
8	0	20	60

Após todas as soluções preparadas, adicionamos $5x10^6$cels/mL do concentrado de células-tronco de sangue de cordão, que foi processado previamente;

Os criotubos foram fechados, homogeneizados e imediatamente congelados com auxílio da câmara de congelamento programado, nos passos seguir:

- Ajustar a câmara a 15°C.
- Manter assim por 10min.
- Descer a 0°C a velocidade de –1,0°C/min.
- Descer a –4,0°C a velocidade de –2,0°C/min.
- Descer a –15,0°C a velocidade de –4,0°C/min.
- Descer a –25,0°C a velocidade de –5,0°C/min.
- Descer a –40,0°C a velocidade de –2,0°C/min.
- Descer a –80,0°C a velocidade de –5,0°C/min.
- Após congelamento, os criotubos foram transferidos para tanque de nitrogênio líquido.

3.3 **Descongelamento das CTH**

As CTH de sangue de cordão criopreservadas em criotubos e mantidas em tanque de nitrogênio líquido por duas semanas, foram transferidas para um recipiente menor, ainda com nitrogênio e levados ao banho-maria, a 37°C onde foram descongeladas rapidamente. Logo após o descongelamento foram realizados os ensaios listados abaixo.

3.4 **Citometria de Fluxo**

3.4.1 Quantificação de Células CD45/CD34/CD123 - fase 1

A quantificação de células CD34+ e CD123+ por citometria de fluxo baseia-se no protocolo recomendado pela ISHAGE (Internacional Society for Hematotherapy and Graft Engineering) (Sutherland, Anderson et al. 1996), modificado para a introdução da marcação do CD123 . Além da avaliação do tamanho e complexidade celular, o protocolo permite a seleção da subpopulação de células CD34+ a partir da população total de leucócitos, marcadas com o anticorpo monoclonal anti-CD45 (células CD45+). A análise gráfica sequencial da citometria de fluxo permite delimitar a população CD45+ e, posteriormente a subpopulação

CD34+. De acordo com esse método, $2x10^6$ células foram incubadas com anti-CD34PE (8G12 clone), anti-CD45FITC (2D1clone) e anti-CD123PerCP-Cy5.5 (7G3). O anti-CD123PerCP-Cy5.5 é um anticorpo monoclonal (IgG2a) que se liga diretamente a subunidade do receptor da Interleucina-3 (IL-3) humana. Para evitar danos para as células, devido ao tratamento DMSO, todas as amostras pós-descongelamento foram lavadas com 9 mL de uma solução de 2,5% de albumina humana e dextrano 40 (10% em NaCl 0,9%) numa solução de proporção de 1:1 antes da marcação com os anticorpos. Os testes foram realizados em duplicata.

3.4.2 Quantificação de Células CD45/CD34/7AAD – fase 2

O 7-Aminoactinomicina-D (7-AAD) é um composto químico fluorescente com uma forte afinidade para o DNA. Ele é usado como um marcador de viabilidade celular para citometria de fluxo. As células com sua membrana comprometida marcarão com 7-AAD, enquanto células vivas com membranas celulares intactas não. A quantificação dessas células CD34+ foi similar ao protocolo descrito acima, a diferença foi à marcação com o corante 7AAD, que se incorpora ao DNA das células mortas, ao final do procedimento de marcação com os anticorpos CD34 e CD45, as células não são fixadas e adiciona-se 5uL do corante 7AAD e procede a leitura no citômetro normalmente.

3.5 **Ensaio das unidades formadoras de Colônias (UFC)**

Ensaios de UFC foram realizados como descrito por Limaye e Kale (2001). Após o descongelamento e lavagem para retirada dos crioprotetores, $5x10^4$ células/mL (mesmo ensaio para cada tipo de solução de criopreservação, na fase 1 e 2 do projeto) foram plaqueadas (em duplicada) em metilcelulose (meio semissólido) contendo uma combinação de fatores de crescimento de granulócitos-macrófagos, na fase 1 do estudo e na fase 2 essas combinações também contemplava os fatores de crescimento de cultura mista e eritropoetina (Methocult, Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canadá). As placas foram incubadas durante 14 dias em uma estufa incubadora com 5% de CO^2 a 37º C (Incubadora 300/3000 Series Revco, Ashille, Ohio, EUA). Após esse período as colônias foram identificadas e classificadas em unidades formadoras de colônias tipo: Granulócito-macrófago (UFC-GM), eritróide (UFC-E e

BFU-E), granulócitos (UFC-G) e macrófagos (UFC-M) com auxílio de um microscópio invertido (Leica DMIL, Leica Microsystems, AG, Wetzlar, Alemanha).

3.6 **Ensaio pelo MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromide)**

A clivagem do sal de tetrazólio MTT, num produto de cor azul (formazan) pela enzima mitocondrial (succinato desidrogenase) é muito utilizada para determinar viabilidade das células e sua proliferação. A conversão ocorre apenas em células vivas, e da quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células presentes e ativas. Após descongelamento e lavagem, $1x10^5$ células/mL (de cada solução crioprotetora) foram plaqueadas em triplicata e adicionado em cada poço 10uL da solução de MTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), incubados a 37 ° C durante 4 h e, em seguida foi medida a absorbância através de um leitor de placas ELISA com um comprimento de onda de 570nm (Mosmann 1983). Esse teste foi realizado nas amostras da fase 1 e fase 2 do projeto.
As etapas seguintes só foram realizadas na segunda fase do projeto.

3.7 **Preparação dos lipossomas contendo trealose**

Lipossomas contendo trealose foram feitos a partir de um kit comercial com misturas lipídicas para a preparação de lipossomas – (Sigma L-4395) e 1mL de trealose foi adicionada ao frasco de lipossomas e homogeneizado durante 30 segundos de acordo com o fabricante. Para avaliar a toxicidade do lipossoma, 10^6 cels foram incubadas com 1%, 3%, 10% e 30% (v/v) de concentração de lipossomas e avaliadas com teste de viabilidade pelo MTT. Não foram observadas diferenças na viabilidade celular nas diferentes concentrações de lipossomas testadas (dados não mostrados).

3.8 **Quantificação da trealose**

A concentração da trealose nos lipossomas foi determinada utilizando a enzima trealase e o kit de dosagem de glicose (kit de ensaio de glicose PGO PN P7119 - Sigma). Resumindo, a trealase cliva a ligação glicosídica da trealose, obtendo-se duas moléculas de

glicose. Após essa clivagem é possível através de um ensaio colorimétrico a dosagem da glicose e determinação da trealose. Esse ensaio consiste na conversão da glicose em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio pela glicose oxidase, seguida pela adição de peroxidase onde o o-dianisidina reage com o peróxido de hidrogênio originando o o-dianisidina oxidado. Finalmente o ácido sulfúrico muda a cor da solução onde pode ser lida no espectrofotômetro no comprimento de onde de 540nm. Após a incubação/formação dos lipossomas, eles foram centrifugados (12800g, 15min, 21 º C) e o sobrenadante foi quantificado pelo método descrito acima. A quantidade de trealose foi determinada subtraindo o produto do sobrenadante pela quantificação da solução inicial da trealose. A quantificação da trealose intralipossomal foi de aproximadamente 20mmol/L e extracelular aproximadamente 60mmol/L.

3.9 **Análise estatística:**

Todos os dados foram analisados no software estatístico Graph-Pad Prism versão 4 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA, (www.graphpad.com)). Foi utilizado o teste Two-way ANOVA para comparações dos grupos com mais de duas amostras e o pós-teste Bonferroni. Resultados com valores inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

4 RESULTADOS:

Os resultados apresentados na fase 1 do estudo encontram-se publicados em forma de artigo

Cryobiology. 2010 Jun;60(3):301-7. Epub 2010 Feb 10.

Evaluations of bioantioxidants in cryopreservation of umbilical cord blood using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide.

Motta JP, Gomes BE, Bouzas LF, Paraguassú-Braga FH, Porto LC.

Bioantioxidantes e Criopreservação

4.1 **Citometria de Fluxo – fase 1**

CD45low/CD34high – células criopreservadas com ácido ascórbico

Houve um aumento estatisticamente significativo na preservação do antígeno CD34+ das células de SCUP após o descongelamento, nas soluções que continham 5% DMSO + sacarose, 5% DMSO + trealose e ácido ascórbico, e 5% DMSO + sacarose e ácido ascórbico, quando comparado com 5% DMSO isoladamente ($p < 0,05$). Para as amostras congeladas com 2,5% DMSO, somente aquelas que estavam na presença de sacarose + ácido ascórbico obtiveram uma diferença significativa ($p<0,05$). As demais soluções testadas mostraram uma preservação igual do antígeno CD34 comparando com o seu controle.

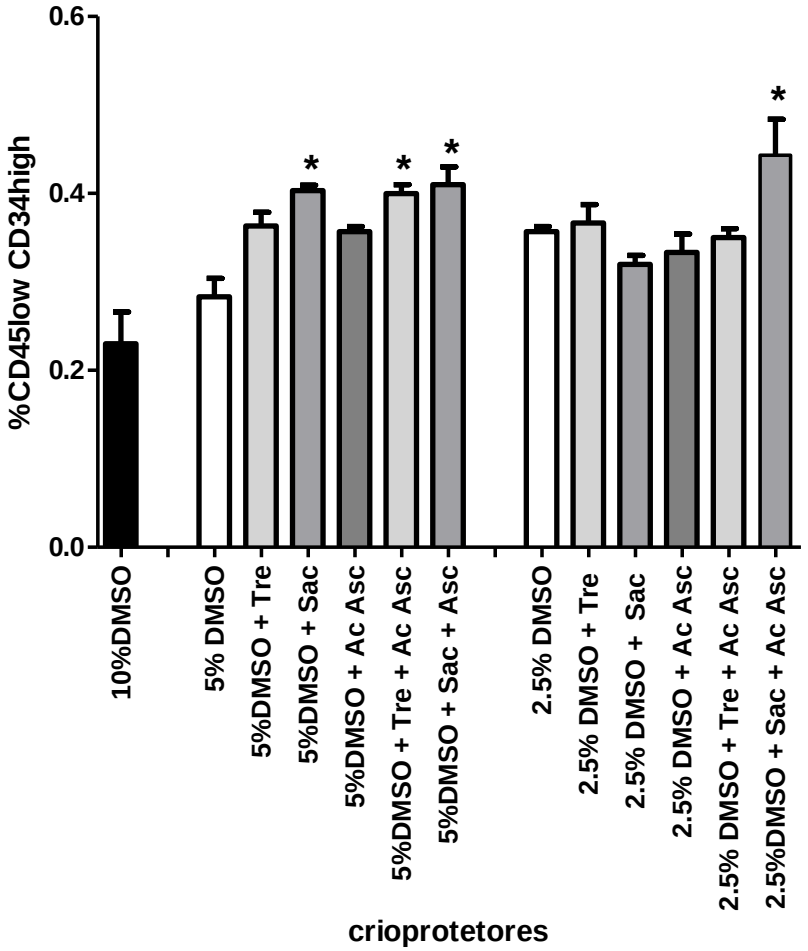

Figura 2. Análise por citometria de fluxo das células de SCUP pós-descongelamento. As células criopreservadas com diferentes concentrações de DMSO (2,5%, 5% e 10% (v/v)), trealose ou de sacarose (60 mmol/L) com ou sem ácido ascórbico (100µg/ml). O gráfico demonstra a porcentagem de células CD34+ determinadas sob um painel inicial das células CD45+. (* amostras que obtiveram resultados significativos em relação ao seu controle)

CD45+/CD34+/CD123+ – células criopreservadas com ácido ascórbico

O CD123 é expresso constitutivamente nas CTH e nas células progenitoras, onde medeia a proliferação e diferenciação (Huang, Chen et al. 1999). Amostras criopreservadas na presença de ácido ascórbico + dissacarídeos (trealose ou sacarose) apresentaram um aumento significante na preservação das células CD123+ quando comparados aos seus controles ($p<0,05$), exceto a solução com 2,5% DMSO + trealose e ácido ascórbico, que não obteve um resultado significativo, apesar de demonstrar uma tendência para este resultado. As demais soluções testadas mostraram uma preservação igual do antígeno CD123 comparando com o seu controle (Figura. 3).

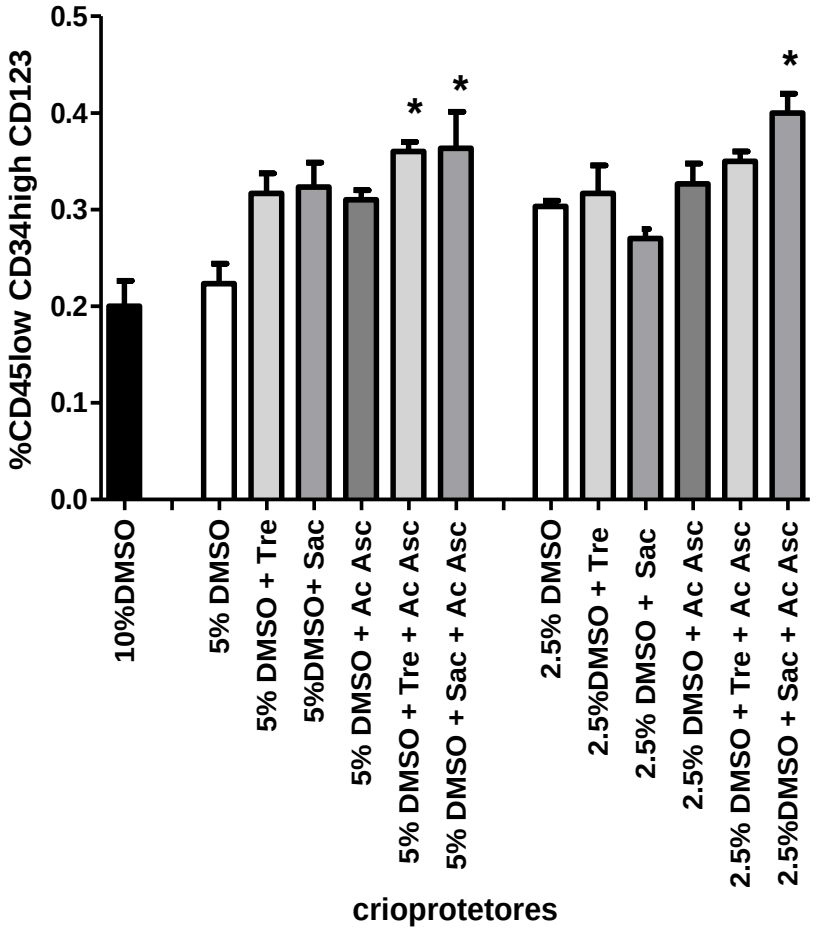

Figura 3. Análise por citometria de fluxo das células de SCUP pós-descongelamento, criopreservadas com diferentes concentrações de DMSO (2,5%, 5% e 10% (v/v)), trealose ou de sacarose (60 mmol/L) com ou sem ácido ascórbico (100µg/mL). O gráfico demonstra a porcentagem de células CD34+/CD123+ determinadas sob um painel inicial das células CD45+. (* amostras que obtiveram resultados significativos em relação ao seu controle)

CD45low/CD34high – células criopreservadas com catalase

Todas as soluções testadas alcançaram o mesmo nível de preservação dos antígenos (CD45 e CD34) em ambos os grupos (5% e 2,5% DMSO), quando comparados com seus controles. Vimos que as soluções em que estavam presentes dissacarídeos e catalase apresentaram um aumento significante ($p<0.05$) na preservação das células CD45+/CD34+ conforme observado na Figura. 4

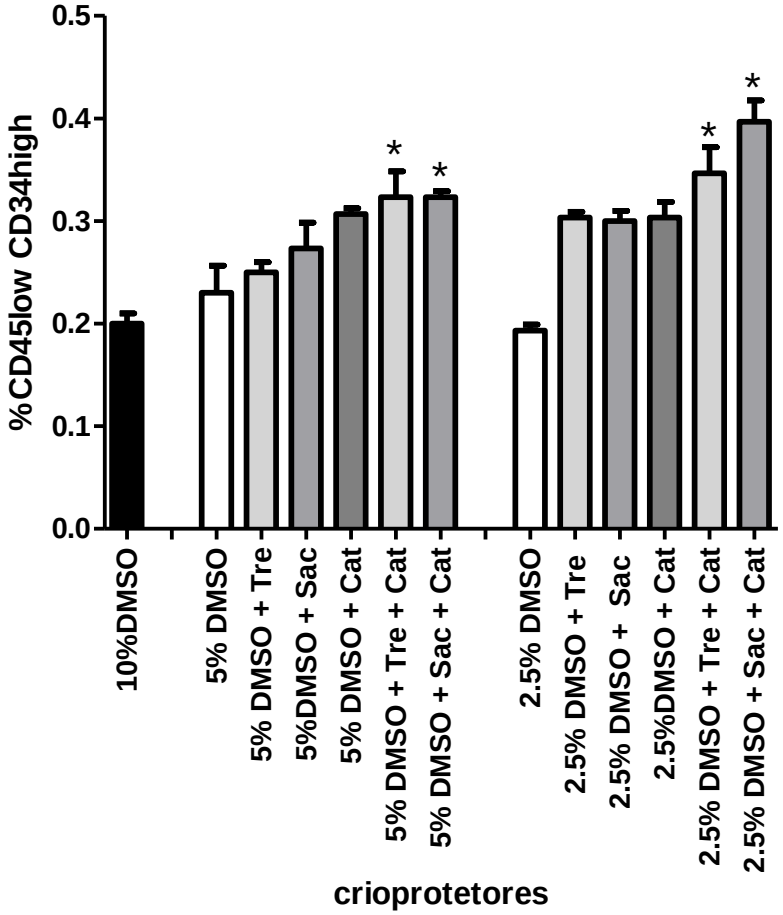

Figura 4. Análise por citometria de fluxo das células de SCUP criopreservadas com diferentes concentrações de DMSO (2,5%, 5% e 10% (v/v)), trealose ou de sacarose (60 mmol/L) com ou sem catalase (100µg/ml). de SCUP pós-descongelamento. O gráfico demonstra a porcentagem de células CD34+ determinadas sob um painel inicial das células CD45+. (* amostras que obtiveram resultados significativos em relação ao seu controle)

CD45+/CD34+/CD123+ – células criopreservadas com catalase

Nas amostras avaliadas onde continham trealose + catalase mostraram ser mais eficiente na preservação das células positivas para CD45+/CD34+/CD123+, esses resultados foram significativos (p<0,05) em comparação com o controle de cada grupo, dados observados na Figuraura 5. Quando analisamos as soluções sem as combinações de dissacarídeos e catalase, também observamos resultados satisfatórios, porém sem dado significativo (p>0,05).

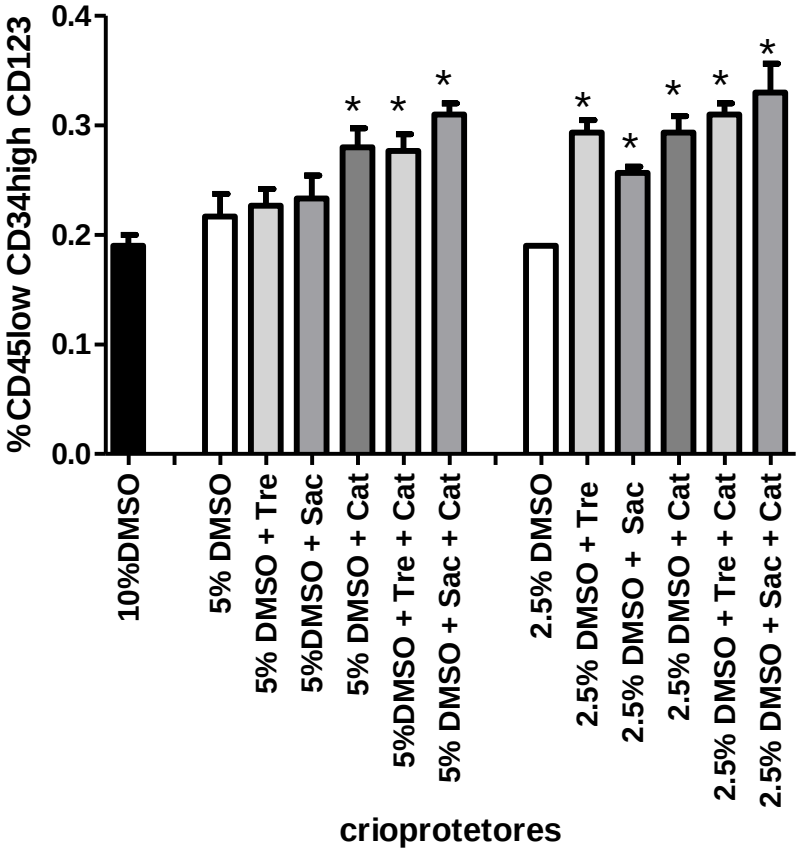

Figura 5. Análise por citometria de fluxo das células de SCUP pós-descongelamento, criopreservadas com diferentes concentrações de DMSO (2,5%, 5% e 10% (v/v)), trealose ou de sacarose (60 mmol/L) com ou sem catalase (100µg/mL). O gráfico demonstra a porcentagem de células CD34+/CD123+ determinadas sob um painel inicial das células CD45+. (* amostras que obtiveram resultados significativos em relação ao seu controle)

4.2 **Ensaio de viabilidade pelo MTT**

Nesse ensaio, todas as soluções crioprotetoras testadas obtiveram uma recuperação da viabilidade igual, ou melhor, comparadas com seus controles (2,5% e 5% DMSO). As soluções que continham dissacarídeos e catalase com 2,5% ou 5% DMSO obtiveram resultados significativos em relação aos seus controles ($p < 0,05$) (Figura. 6), porém esses resultados não são significativos quando o antioxidante foi o ácido ascórbico.

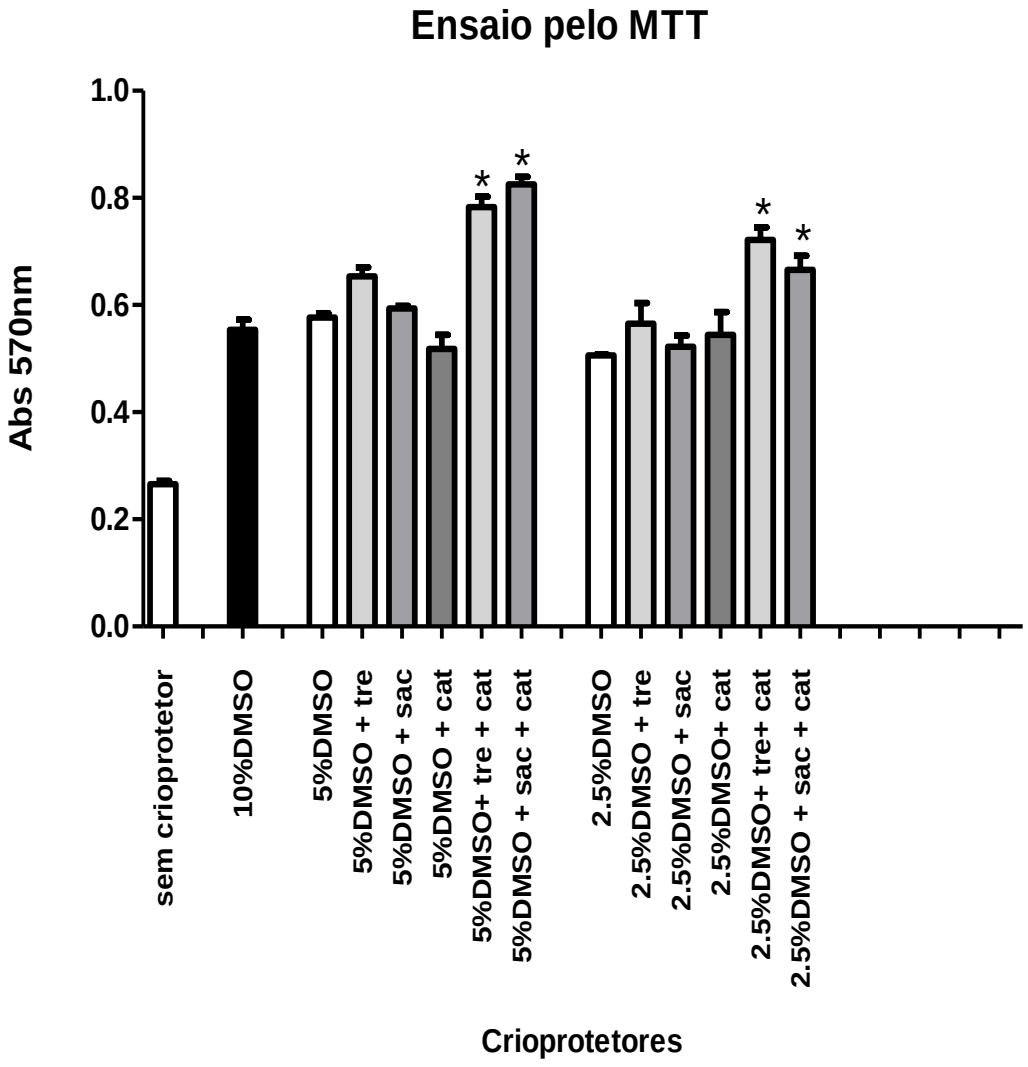

Figura 6. Ensaio de viabilidade pelo MTT de células de SCUP pós-descongelamento e que foram criopreservadas com diferentes composições de DMSO, trealose, sacarose e catalase. (* amostras que obtiveram resultados significativos em relação ao seu controle)

As soluções que continham ácido ascórbico tiveram uma alta reatividade com a solução de MTT por isso os resultados com essas soluções não serão demonstrados nesse estudo.

4.3 **Ensaio de Unidades Formadoras de Colônias – UFC**

Todos os valores de UFC estão representados sobre a média e desvio-padrão e expressos nas tabelas 3 e 4.

As células criopreservadas com ácido ascórbico não obtiveram diferenças significativas na capacidade de formarem clones quando comparadas aos seus controles, isso pode ser observado na análise da tabela 3.

Entretanto, quando analisamos as células congeladas com catalase, vimos que especialmente no grupo de 2,5% DMSO, houve uma significativa melhora na manutenção da capacidade clonogênica das células quando congeladas na presença desse antioxidante e dissacarídeos, como podemos observar na tabela 4. Com adição da catalase na solução crioprotetora das células de SCUP, houve um aumento na quantidade de UFC totais de aproximadamente 5% quando comparada com a solução contendo 2,5% DMSO + trealose e um aumento de 11% quando comparado à solução de 2,5% DMSO + sacarose. Nas UFC específicas (UFC-GM e UFC-G) no grupo de 2,5% DMSO essas diferenças foram ainda maiores. As soluções com catalase e dissacarídeos obtiveram resultados significativos quando comparados ao seu controle (2,5% DMSO) $p<0,05$. O que não aconteceu com as soluções que a catalase não estava presente. (Tabela 4)

Mais uma vez nas soluções que continham catalase houve um aumento na recuperação da capacidade clonogênica das colônias específicas (UFC-GM) de 30% em relação às colônias específicas da solução de 2,5% DMSO + trealose e um aumento de 35% em relação às colônias específicas da solução de 2,5% DMSO + sacarose. A Adição da catalase também aumentou a recuperação da capacidade clonogênica das colônias específicas (UFC-G) em 8% quando comparada as colônias específicas da solução de 2,5% DMSO + trealose e 100% quando comparada as colônias específicas da solução de 2,5% DMSO + sacarose. (Tabela 4)

O efeito crioprotetor da catalase não foi observado nas colônias específicas UFC-M. (Tabela 4)

Tabela 3. Capacidade clonogênica das células de SCUP pós-descongelamento. Ensaio de UFC das células de SCUP criopreservadas com diferentes soluções crioprotetoras contendo DMSO, trealose, sacarose e ácido ascórbico.

	UFC	**UFC- GM**	**UFC- G**	**UFC- M**
Sem crioprotetor	6,5±0,7	1,5±2,1	1,5±0,7	3,5±0,7
2,5% DMSO	21,5±6,4	5,0±2,8	4,0±1,4	12,5±2,1
5% DMSO	24,5±3,5	7,5±2,1	4,5±3,5	12,5±4,9
10% DMSO	20,0±5,7	3,0±0,0	4,0±1,4	13,0±4,2
5% DMSO + trealose	33,0±2,8**	7,5±0,7	9,0±0,0	16,5±2,1
5% DMSO + sacarose	35,5±0,7**	8,0±0,0	10,5±0,7	17,0±0,0
5% DMSO + ácido ascórbico	30,0±4,2**	8,0±4,2	7,5±0,7	14,5±0,7
5% DMSO + trealose + ácido ascórbico	24,5±0,7	6,5±0,7	6,5±0,7	11,5±0,7
5% DMSO + sacarose + ácido ascórbico	16,5±0,7	2,0±0,0	4,0±0,0	10,5±0,7
2,5% DMSO + trealose	22,5±0,7	4,5±2,1	3,0±0,0	15,0±1,4
2,5% DMSO + sacarose	25,5±4,9	3,0±1,4	8,5±2,1	14,0±1,4
2,5% DMSO + ácido ascórbico	16,5±0,7	1,5±0,7	3,5±0,7	11,5±0,7
2,5% DMSO + trealose + ácido ascórbico	22,5±4,9	4,0±1,4	7,0±2,8	11,5±0,7
2,5% DMSO + sacarose + ácido ascórbico	21,0±5,7	3,5±2,1	4,5±2,1	13,0±1,4

Esses valores são expressos como media ± DV das unidades formadoras de colônias. DMSO (v/v).
** Soluções com diferenças significativas em relação ao controle (10% DMSO) ($p < 0.001$).
Todas as outras soluções permaneceram com a mesma capacidade clonogênica ao seu controle ($p>0,05$)

Tabela 4. Capacidade clonogênica das células de SCUP pós-descongelamento. Ensaio de UFC das células de SCUP criopreservadas com diferentes soluções crioprotetoras contendo DMSO, trealose, sacarose e catalase.

	UFC	**UFC- GM**	**UFC- G**	**UFC- M**
Sem crioprotetor	15,5±2,1	3,0±1,4	1,5±0,7	11,0±0,0
2,5% DMSO	44,5±9,2	8,5±0,7	7,5±0,7	28,5±9,2
5% DMSO	40,5±4,9	7,5±0,7	9,5±2,1	23,5±3,5
10% DMSO	35,5±0,7	6,0±0,0	10,0±0,0	19,5±0,7
5% DMSO + trealose	45,0±1,4	9,0±1,4	9,0±2,8	27,0±2,8
5% DMSO + sacarose	49,5±3,5**	8,5±0,7	11,0±2,8	30,0±0,0
5% DMSO + catalase	60,5±7,8***	13,5±0,7	14,0±1,4	33,0±5,7*
5% DMSO + trealose + catalase	47,5±12	10,5±2,1	10,0±5,7	27,0±8,5
5% DMSO + sacarose + catalase	41,0±9,9	12,5±3,5	11,0±4,2	17,5±2,1
2,5% DMSO + trealose	53,5±6,4**	15,0±1,4	6,0±0,0	32,5±4,9*
2,5% DMSO + sacarose	53±11,3**	9,0±4,2	8,5±3,5	35,5±3,5**
2,5% DMSO + catalase	55±2,8**	9,5±0,7	7,0±1,4	38,5±3,5***
2,5% DMSO + trealose + catalase	56±8,5***	11,0±2,8	17,0±2,8	28,0±2,8
2,5% DMSO + sacarose + catalase	59±9,9***	12,0±0,0	17,0±2,8	30,0±7,1

Esses valores são expressos como media ± DV das unidades formadoras de colônias. DMSO (v/v).
Estatisticamente diferente do controle (10% DMSO)
* ($p < 0.05$)
** ($p < 0.01$)
*** ($p < 0.001$)

Adição de trealose intra e extracelular

4.4 **Análise da Citometria de Fluxo – fase 2**

Todos os resultados abaixo foram comparados com seus controles pós-descongelamento.

Viabilidade pelo (7-amino actinomycin D) - 7AAD

Esse método utiliza o marcador fluorescente 7AAD para avaliar a viabilidade das células após a criopreservação. Com a análise por citometria de fluxo, vimos que as células congeladas sem crioprotetor apresentaram uma alta mortalidade celular, como esperado. Soluções contendo 2,5% DMSO + trealose intracelular, 2,5% DMSO + trealose extracelular e 2,5% DMSO + trealose intracelular e extracelular obtiveram uma maior porcentagem de recuperação da viabilidade celular (7%, 35% e 37% respectivamente) e essas porcentagens foram estatisticamente significativas ($p<0,05$) em relação ao seu controle (2,5% DMSO) e a solução sem DMSO e ainda a solução contendo trealose intra e extracelular aumentou a viabilidade em 11,4% comparada com a solução de 2,5% DMSO, contudo a solução que continha somente trealose intracelular não obteve o mesmo resultado (Figura. 7)

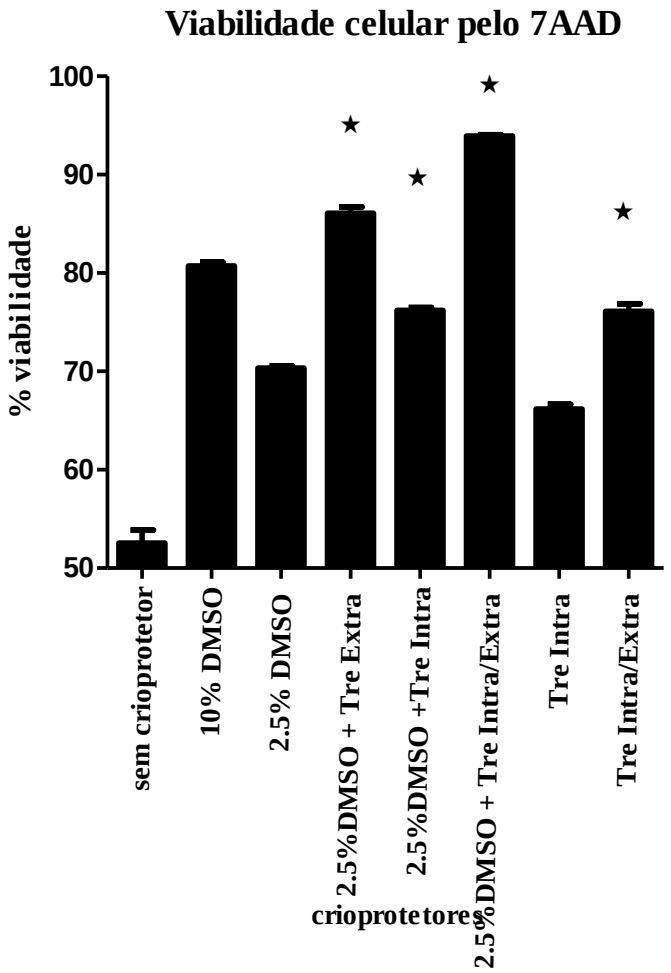

Figura 7. Análise por citometria de fluxo das células de SCUP pós-descongelamento, criopreservadas com diferentes concentrações de DMSO (2,5%, 10%), trealose extracelular e trealose intracelular. O gráfico demonstra a porcentagem do total de células negativas para 7AAD. No gráfico acima as soluções marcadas com estrela (★) obtiveram resultados significativos em comparação com o seu controle (2,5% DMSO)

CD45low/CD34high

Quando avaliamos as amostras congeladas na presença de 2,5% DMSO + trealose intra e extracelular vimos um aumento significativo ($p<0,05$) na preservação das células positivas para CD45 e CD34 de 80% em relação ao controle de 2,5% DMSO (Figura. 8). Todas as outras soluções, exceto a solução sem crioprotetor, obtiveram resultados satisfatórios na preservação das células CD34 positivas em relação ao controle (2,5% DMSO).

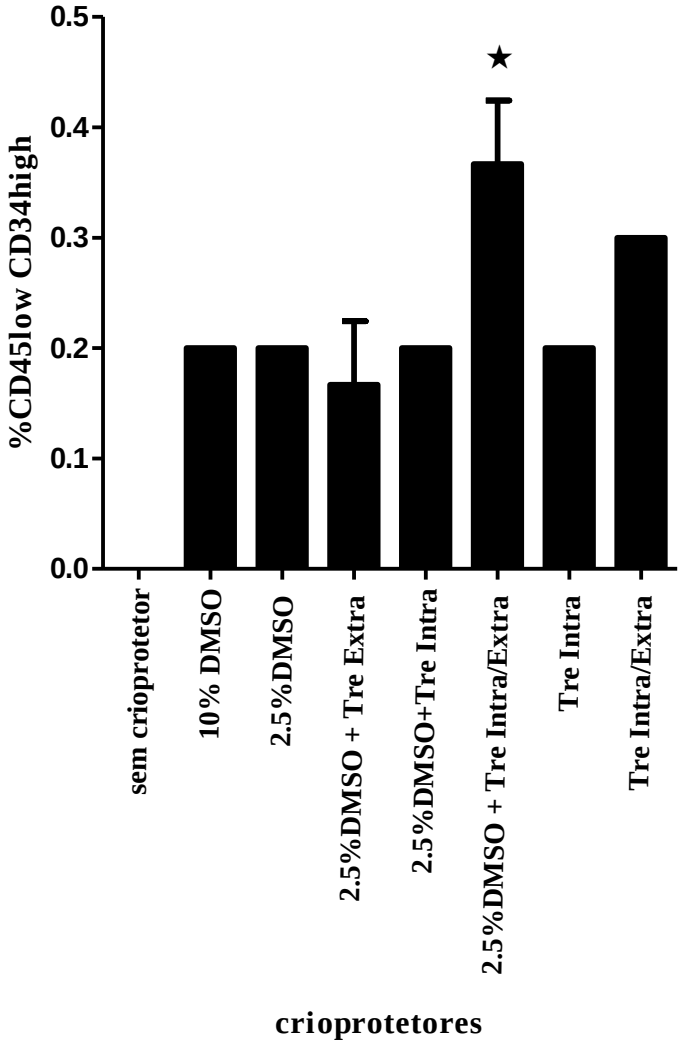

Figura 8. Análise por citometria de fluxo das células de SCUP criopreservadas com diferentes concentrações de DMSO (2,5% e 10%), trealose extracelular e trealose intracelular. O gráfico demonstra a porcentagem de células CD34+ determinadas sob um painel inicial das células CD45+, todas as soluções testadas permaneceram com seus antígenos CD45 e CD34 preservados pós-descongelamento.

4.5 **Ensaio de viabilidade pelo MTT**

Na figura 11 podemos observar que as soluções que continham 2,5% DMSO + trealose extracelular, 2,5% DMSO + trealose intracelular e 2,5% DMSO + trealose intra/extracelular obtiveram uma melhor recuperação da viabilidade celular em relação ao controle (2,5% DMSO), (28%, 36% e 61% respectivamente) e essas diferenças foram significativas $p<0,05$. Contudo as soluções que continham somente trealose intra e extracelular não obtiveram um resultado melhor a do controle, porém foi obtido um resultado igual, ou seja, a solução sem DMSO conseguiu atingir a mesma porcentagem de viabilidade celular em relação à solução de 2,5% DMSO (Figura. 9).

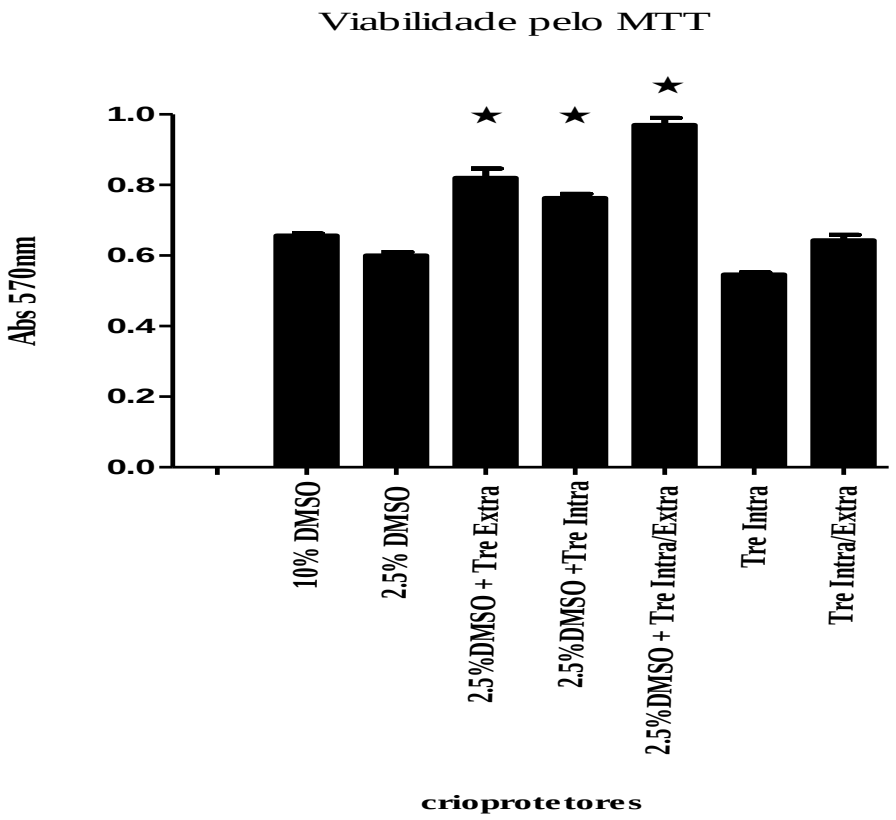

Figura 9. Ensaio de viabilidade pelo MTT de células de SCUP pós-descongelamento, criopreservadas com diferentes composições de DMSO, trealose extracelular e trealose intracelular. No gráfico acima as soluções marcadas com estrela (★) obtiveram resultados significativos em relação ao seu controle e as soluções com trealose intracelular e intracelular/extracelular mantiveram a sua viabilidade em comparação com o seu controle.

4.6 **Ensaios de unidades formadoras de colônias – UFC – fase 2**

A avaliação da capacidade clonogênica das células de SCUP após o congelamento/descongelamento com diferentes soluções crioprotetoras será demonstrada na tabela 5, por média e desvio-padrão das UFC.

Após análise dos dados vimos que a recuperação do potencial clonogênico das células congeladas na presença de 2,5% DMSO + trealose intracelular, 2,5% DMSO + trealose extracelular e 2,5% DMSO + trealose intra/extracelular mostraram um aumento significante no número total de UFC (5%, 38% e 69% respectivamente), mas somente as duas últimas soluções testadas foram estatisticamente significantes ($p<0,05$). Analisando a capacidade clonogênica das colônias específicas (UFC-GM e UFC-M), vimos que a solução contendo 2,5% DMSO + trealose intra/extracelular obteve uma recuperação na clonogenicidade aumentada comparada com o controle, e esse aumento foi significativo ($p<0,05$) com mais de 100% de aproveitamento. A solução crioprotetora que continha somente trealose intra/extracelular obteve a mesma capacidade de formar colônias em relação ao seu controle ($p>0,05$) o que não aconteceu com as células congeladas com a solução que continha apenas trealose intracelular como podemos observar na tabela 5.

	UFC-GM	UFC-G	UFC-M	UFC - E	UFC-mista	UFC
Sem crioprotetor	1,0 ± 0	3,5 ± 0.7	2,5 ± 0.7	1,5 ± 0.7	0,0 ± 0	8,5
10%DMSO	7,5 ± 2.1	8,5 ± 0.7	13,0 ± 0	19,5 ± 0.7	8,0 ± 1.4	56,5
2.5%DMSO	8,5 ± 0.7	9,0 ± 1.4	8,5 ± 0.7	17,5 ±0.7	6,0 ± 1.4	49,5
2.5%DMSO + Tre Extra	13,5 ± 0.7	10,0 ± 1.4	13,0 ± 1.4	22,5 ± 0.7	9,5 ± 0.7	68,5★
2.5%DMSO + Tre Intra	8,5 ± 0.7	9,0 ± 1.4	9,5 ± 0.7	18,5 ± 0.7	6,5 ± 0.7	52,0
2.5%DMSO + Tre Intra/Extra	16,0 ± 1.4★	12,0 ± 1.4	24,5 ± 0.7★	21,0 ± 1.4	10,5 ± 0.7	84,0★
Tre Intra	6,0 ± 1.4	4,5 ± 0.7	7,5 ± 0.7	11,0 ± 1.4†	4,0 ± 1.4	33,0†
Tre Intra/Extra	9,0 ± 1.4✳	9,0 ± 2.8✳	12,5 ± 0.7✳	11,0 ± 0.0†	3,0 ± 1.4	44,5✳

Tabela 5. Capacidade clonogênica das células de SCUP pós-descongelamento

Valores estão expressos em média e desvio padrão das unidades formadoras de colônias.
★Soluções com diferença significativa em relação ao controle (2.5% DMSO (v/v). $p<0,05$
✳Soluções contendo apenas trealose (intra e extracelular) obtiveram resultados semelhantes ao controle de 2,5% DMSO
† Soluções com resultados insatisfatórios

5 DISCUSSÃO:

O TCTH é uma modalidade terapêutica que visa o tratamento de diversas doenças hematológicas, oncológicas e imunológicas, através da infusão de células, como o objetivo de reconstituir a hematopoiese (Armitage 1994). Para o sucesso desse tipo de transplante, a maioria das vezes é necessária à criopreservação das CTH. Para uma criopreservação adequada se faz necessário o uso de reagentes que alteram a distribuição da água e minimizam os efeitos destrutivos do congelamento normal, a esse tipo de reagente, chamamos de crioprotetor.

No TCTH, o crioprotetor mais utilizado é o DMSO (Rowley and Anderson 1993), porém o seu uso está relacionado a diversos efeitos colaterais nos pacientes que recebem esses produtos criopreservados (Sauer-Heilborn, Kadidlo et al. 2004). Por isso a otimização de protocolos de criopreservação que mantenham a qualidade das CTH e que não sejam tóxicos para as células/pacientes, tem sido uma linha importante de pesquisa nos centros transplantadores (Benekli, Anderson et al. 2000; Sauer-Heilborn, Kadidlo et al. 2004).

Além da formação de cristais de gelo e da desidratação, que são os principais efeitos destrutivos do processo de congelamento, existem também a formação de radicais livres que já é bem caracterizado durante esse processo, por isso a adição de antioxidantes na solução de criopreservação é um passo importante para a manutenção da funcionalidade e viabilidade das células congeladas. Existem trabalhos que utilizaram antioxidantes no processo de congelamento de diversos tipos celulares e obtiveram bons resultados (Sasnoor, Kale et al. 2003; Sasnoor, Kale et al. 2005; Sasnoor, Kale et al. 2005).

Muitos grupos de pesquisas vêm utilizando substâncias como a trealose e catalase como aditivos a solução de criopreservação padrão, avaliando a crioproteção das moléculas de adesão e das moléculas de superfície e esses trabalhos estão obtendo ótimos resultados em relação à viabilidade e funcionalidade das CTH (Sasnoor, Kale et al. 2003; Sasnoor, Kale et al. 2005).

Estudos em sistemas naturais que sobrevivem ao estresse ambiental extremo, tais como congelamento e dessecação, têm mostrado que um dos mecanismos adaptativos desses organismos é o acúmulo de açúcares, tais como a trealose (Crowe and Crowe 2000). O mecanismo de proteção da trealose é uma área ativa de pesquisa que inclui a interação de açúcares com membranas plasmáticas (Crowe, Crowe et al. 1987), o papel desses organismos em estado vítreo (Green and Driggers 1989), e os efeitos da resposta osmótica na célula (Chen, Acker et al. 2001). Independentemente do mecanismo de ação, concentrações relativamente baixas de trealose pode atuar como um crioprotecor eficaz em uma ampla

variedade de sistemas biológicos (Eroglu, Toner et al. 2002; Acker, Lu et al. 2003; Buchanan, Gross et al. 2004).

Outra hipótese para danos durante a hipotermia e congelamento é a formação de ERO, os quais estão relacionados a uma potencial causa de diminuição da viabilidade celular durante e após o descongelamento (Limaye 1997).

A estabilidade da ERO, que é normalmente baixa em sistemas com muita quantidade de água, aumenta consideravelmente quando esse sistema encontra-se sob umidade e temperatura muito baixas (Kearney 1998). Se não for devidamente tratado, esses radicais livres resultam em danos oxidativos como a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, e danos no DNA. A defesa principal de uma célula contra dos radicais livres são os antioxidantes incluindo o ácido ascórbico, o alfa-tocoferol (vitamina E), e glutationa reduzida e enzimas tais como superóxido dismutase, catalase e peroxidases (Buettner 1993).

Nessa primeira fase do estudo, como demonstrado na figura 4, a adição de antioxidantes, principalmente a catalase, dissacarídeos e baixas concentrações de DMSO na solução de criopreservação das CTH de SCUP aumentou a preservação das células CD34+ após o descongelamento, quando comparamos com seu controle (2,5% DMSO). O CD34 é um antígeno que é específico e identifica células do sangue em seus primeiros estágios de diferenciação hematopoiética (Bender and Unverzagt 1993). A população de células CD34+ contém as células progenitoras comprometidas com as linhagens mieloides, linfóides, e linhagens eritróide, bem como as células-tronco primitivas capazes formar cultura de longa duração. Analisando os resultados desse estudo, vimos que também quando utlizamos catalase, trealose e baixas concentrações de DMSO, o receptor da interleucina-3 (CD123) das células de SCUP, também foi muito bem preservado após o descongelamento (figura 7). O CD123 é expresso constitutivamente em células-tronco comprometidas com a linhagem hematopoiética e células progenitoras, onde esse medeia a proliferação e diferenciação das mesmas, e devido a isso, a preservação deste receptor durante a criopreservação é muito importante. Diferentes níveis de expressão CD123 foram descritos nas células CD34+ em diferentes fases de diferenciação: baixa expressão em células mais primitiva e uma alta expressão em progenitores mais maduros (Huang, Chen et al. 1999).

Os dados da citometria de fluxo foram confirmados pelo teste funcional de UFC, onde vimos que os melhores resultados de capacidade clonogênica e preservação dos principais receptores (CD34 e CD123) foram nas amostras congeladas com dissacarídeos e catalase.

Pelo ensaio de viabilidade pelo MTT, também foi constatado que as células congeladas na presença do antioxidante catalase apresentam uma maior viabilidade em

comparação com as outras soluções testadas (Figuraura 6). Limaye e seus colaboradores mostraram que antioxidantes como catalase, alfa-tocoferol, e o ácido ascórbico - quando usado isoladamente como aditivos em meio de congelamento convencional – aumenta a crioproteção nas células da medula óssea de rato e também nas células da medula óssea humana (Limaye 1997).

Amostras congeladas com DMSO mais um dissacarídeo já demonstravam uma melhor recuperação da viabilidade e integridade funcional em comparação as soluções sem esses componentes, porém quando adicionamos a catalase a essas soluções essa diferença aumenta ainda mais, essa é mais uma indicação que a catalase possui a capacidade de reduzir as espécies reativas de oxigênio da solução de criopreservação e assim diminuindo os possíveis danos causados por eles às células congeladas. Limaye e colaboradores também mostraram que a combinação da trealose e catalase no meio de congelamento convencional ajuda a preservar células humanas hematopoiéticas isoladas do SCUP e fígado fetal e esses resultados só são significativos quando essas duas substâncias agem juntas, isso não acontece quando a trealose e a catalase são avaliadas separadamente (Limaye and Kale 2001). Outros estudos utilizando essas combinações também foram realizados. Sasnoor demonstrou que a trealose e catalase foram efetivos na criopreservação das culturas de longa duração e na preservação da expressão das moléculas de superfície celular (Sasnoor, Kale et al. 2003) e na preservação das moléculas de adesão e da quimiotaxia de células hematopoiéticas humanas congeladas (Sasnoor, Kale et al. 2005).

Em estudos anteriores, nós demonstramos os benefícios da utilização da trealose e sacarose como aditivos para meio de criopreservação contendo baixa concentração de DMSO no congelamento de CTH de sangue de cordão (Rodrigues, Paraguassu-Braga et al. 2008). Um dos nossos objetivos na primeira fase do estudo foi verificar se com a adição de antioxidantes, ajuda a preservar a funcionalidade das células.

O mecanismo de ação dos dois antioxidantes utilizados no estudo (ácido ascórbico e catalase) para eliminação dos radicais livre é diferente. Resumidamente, o ácido ascórbico é um receptor de elétrons, que neutraliza as ERO, enquanto a catalase quebra o peróxido de hidrogênio em H_2O e O_2. Neste estudo, apenas o antioxidante catalase foi eficaz e resultou na melhora dos resultados da criopreservação das CTH de SCUP. Os radicais de peróxido podem causar danos oxidativos, tais como a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, e danos no DNA para as células, e, provalmente a presença da catalase exógena protege estas células por eliminação do peróxido. A utilização destes antioxidantes sob situações clínicas pode ser recomendado somente após testes de toxicidade de perfusão intravenosa dos antioxidantes. O efeito protetor dos antioxidantes precisa ser confirmado por testes *in vitro*, tais como cultura

de células a longo prazo, UFC, e em experiências com animais *in vivo* para estudar a cinética de enxertia, e também avaliar essas células após um longo período de armazenamento na presença dessa substância.

Nossos resultados mostraram que com a adição da catalase às soluções que continham baixas concentrações de DMSO (2,5%) e trealose (60mmol/L) obteve-se uma resposta satisfatória em relação à viabilidade e integridade funcional das CTH de SCUP (Motta, Gomes et al. 2010).

Em resumo da primeira fase do estudo, nossos resultados indicam que a redução das ERO leva a uma diminuição da morte celular no sangue de cordão durante o processo de congelamento e descongelamento (Motta, Gomes et al. 2010) e portanto, os danos podem ser reduzidos adicionando o antioxidante catalase a solução de criopreservação das CTH do SCUP, melhorando os resultados do transplante realizado com esse tipo de material. Além disso, o desenvolvimento de um método de criopreservação livre do DMSO pode aumentar a segurança de transplante reduzindo os efeitos colaterais nos pacientes e evitando efeitos tóxicos sobre as células criopreservadas.

Embora a trealose não esteja presente de forma significativa na dieta humana moderna, existe uma elevada concentração de trealose em insetos e fungos que podem ter sido uma fonte relativamente grande de açúcar na dieta do homem antigo (Elbein, Pan et al. 2003).

Certas culturas ainda ingerem uma proporção muito maior de invertebrados e fungos, como parte de suas dietas e, portanto, mais trealose, do que o homem ocidental. A trealose também é isolada a partir de diversas sementes de plantas, incluindo girassóis (Jain and Roy 2009). A distribuição da trealose em vários organismos indica que esse dissacarídeo tem sido uma parte consistente da dieta humana há milhares de anos.

Na segunda parte do estudo foi avaliado o efeito da trealose intra (lipossomas) e extracelular, na criopreservação de células no SCUP e vimos que essa solução mantém a integridade e funcionalidade das células e isso foi evidenciado pelas técnicas de unidades formadoras de colônias (UFC), pelo ensaio do MTT e ainda pela técnica de citometria foi avaliada a viabilidade pela marcação do corante 7AAD e também foi realizada a quantificação das células CD45+/CD34+.

Muitos trabalhos vêm utilizando lipossomas como veículos de entrega de diversas substâncias (Holovati and Acker 2007; Holovati, Wong et al. 2008; Holovati, Gyongyossy-Issa et al. 2009). Os lipossomas podem atuar como vesículas de entrega para uma grande variedade de substâncias bioativas nas células. Esta propriedade tem facilitado o uso de lipossomas em muitas disciplinas, incluindo médicas, biológicas e farmacêuticas, principalmente em células de mamíferos que são normalmente impermeáveis à dissacárideos

(Wieber, Selzer et al. 2011). Uma crítica ao nosso trabalho foi a utilização de kit comerciais de lipossomas, onde não tinhamos uma uniformidade na formação dessas vesículas, ficando difícil uma determinação de lipossomas incorporados as células e uma quantificação precisa da trealose dentro dos mesmos, em estudos futuros devemos produzir os lipossomas de forma controlada, utilizando técnica de extrusão para formação de vesículas unilamelares.

Algumas técnicas tem sido utilizadas para incorporar trealose dentro das células utilizando a engenharia genética com genes biossintéticos para trealose (Tunnacliffe, Garcia de Castro et al. 2001), genes transportadores de trealose (formação de poros) (Acker, Lu et al. 2003), microinjeção (Eroglu, Toner et al. 2002) , eletroporação (Zhou, Yuan et al. 2010) . No entanto, estas técnicas implicam em algum dano para as células e poderiam prejudicar a sua viabilidade após a descongelamento e assim afetando a qualidade do transplante. Como nosso objetivo é ter o máximo de viabilidade celular após o descongelamento, nós utilizamos lipossomas para introduzir trealose na célula. O benefício da utilização de lipossomas é a sua capacidade de ser, biocompatível, podendo ser utilizado em substâncias aquosas ou hidrofóbica, incluindo pequenas e/ou grandes moléculas. O uso de lipossomas como um veículo de entrega de trealose tem sido bem estudado, com resultados muito promissores (Holovati, Gyongyossy-Issa et al. 2009).

Nossos resultados mostraram que quando a criopreservação das células de SCUP foi realizada na presença de trealose intra e extracelular, a viabilidade encontrada foi similar a viabilidade do controle 2,5% DMSO, demonstrando assim que utilizando essa solução o uso de DMSO é dispensável.

Na citometria de fluxo, utilizamos os principais marcadores de CTH (CD45 e CD34) e vimos que a preservação dos mesmos foi mantida mesmo após o uso de lipossomas e consequente reestruturação da membrana plasmática das células. Sendo assim, como não houve alteração da expressão dessas moléculas, as células mantiveram o seu fenótipo original (Figuraura 7).

Já é bem estabelecido que o acúmulo de açúcares intracelular e extracelular, tais como trealose e sacarose, desempenha um papel importante na sobrevivência de uma diversidade de animais (por exemplo, certos sapos, nemátodos, tardígrados, insectos, do camarão salmoura), bem como bactérias, leveduras, e sementes de plantas sob situações dessecação e de congelamento (Crowe, Hoekstra et al. 1992; Crowe and Crowe 1992; Crowe, Leslie et al. 1994; Crowe, Carpenter et al. 1998). É sugerido que o mecanismo pelo qual esse açúcares proporcionam essa proteção é através da estabilização das membranas lipídicas e das proteínas como resultado de interações diretas com resíduos polares através de ligações de

hidrogênio (a chamada hipótese de substituição de água) e por suas excelentes propriedades de formação para o estado vítreo (Crowe, Leslie et al. 1994).

Em estudos anteriores, nós sugerimos que a trealose deveria estar presente em ambos os lados da célula durante a criopreservação (Rodrigues, Paraguassu-Braga et al. 2008), e aqui nós confirmamos essa hipótese, após avaliação dos resultados onde as amostras congeladas com trealose intra e extracelular apresentaram uma boa viabilidade e uma ótima capacidade clonogênica.

Sendo assim, a trealose se apresenta como um potencial crioprotetor de células de sangue de cordão. Futuros estudos pré-clínicos em camundongos, por exemplo, seguidos de estudos clínicos de fase 1, se apresentam como ferramentas importantes para avaliar possíveis efeitos colaterais desse dissacarídeo após a infusão intravenosa, e dessa maneira confirmar a substituição do DMSO pela trealose.

Diversos efeitos colaterais têm sido descritos durante a infusão de DMSO em pacientes, incluindo sedação, náuseas, cefaléia, vômitos, hipertensão, hipotensão, bradicardia ou choque anafilático (Scheinkonig, Kappicht et al. 2004). A substituição do DMSO pela trealose, que é um açúcar, provalvelmente não implicará em tais efeitos colaterias, diminuindo o sofrimento dos pacientes uma vez que eles já possuem os transtornos causados pela sua doença base.

6 CONCLUSÃO

A avaliação da adição de antioxidantes nas soluções de criopreservação das células de SCUP, contendo baixas concentrações de DMSO, mostrou que a catalase, teve um papel importante sobre a redução dos ERO na solução de criopreservação, diminuindo os danos causados por ele durante o congelamento celular e isso pode ser comprovado após análise dos testes utilizados. As amostras congeladas com as soluções contendo catalase mantiveram bem preservados os receptores para CD45, CD34 e CD123, como demonstrado na citometria de fluxo. A capacidade clonogênica das células e a viabilidade celular também foram melhores na presença desse antioxidante em comparação com o controle.

A presença da trealose no meio intra e extracelular durante o processo de congelamento celular fez com que essa solução obtivesse um resultado satisfatório em relação ao seu controle que continha o DMSO, mostrando que essa solução também mantém a preservação dos antígenos mais importantes para esse tipo de célula (CD45 e CD34). E ainda que o potencial clonogênico (UFC) e a viabilidade celular (7AAD e MTT) foram mantidas após congelamento e descongelamento.

Analisando os resultados deste estudo, sugere-se a substituição completa do DMSO pela trealose na solução de criopreservação de CTH de SCUP e adição da catalase como antioxidante para reduzir as ERO formados durante o processo de congelamento. A padronização dos protocolos para a produção de lipossomas contendo trealose em grande escala, também é um passo muito importante nesse processo de substituição do DMSO, e deve ser muito bem definido.

REFERÊNCIAS

Acker, J. P., X. M. Lu, et al. (2003). "Measurement of trehalose loading of mammalian cells porated with a metal-actuated switchable pore." Biotechnol Bioeng 82(5): 525-32.

Acker, J. P. and L. E. McGann (2003). "Protective effect of intracellular ice during freezing?" Cryobiology 46(2): 197-202.

Agarwal, A., S. A. Prabakaran, et al. (2005). "Prevention of oxidative stress injury to sperm." J Androl 26(6): 654-60.

Agarwal, A., R. A. Saleh, et al. (2003). "Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction." Fertil Steril 79(4): 829-43.

Ahmed, N., M. A. Khokher, et al. (1999). "Cytokine-induced expansion of human CD34+ stem/progenitor and CD34+CD41+ early megakaryocytic marrow cells cultured on normal osteoblasts." Stem Cells 17(2): 92-9.

Alessandrino, P., P. Bernasconi, et al. (1999). "Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases." Bone Marrow Transplant 23(6): 533-7.

Allan, D. S., M. Keeney, et al. (2002). "Number of viable CD34(+) cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation." Bone Marrow Transplant 29(12): 967-72.

Anchordoguy, T. J., C. A. Cecchini, et al. (1991). "Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers." Cryobiology 28(5): 467-73.

Anchordoguy, T. J., A. S. Rudolph, et al. (1987). "Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing." Cryobiology 24(4): 324-31.

Andrews, R. G., J. W. Singer, et al. (1986). "Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors." Blood 67(3): 842-5.

Andrews, R. G., J. W. Singer, et al. (1989). "Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties." J Exp Med 169(5): 1721-31.

Appelbaum, F. R., G. P. Herzig, et al. (1978). "Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma." Blood 52(1): 85-95.

Armitage, J. O. (1994). "Bone marrow transplantation." N Engl J Med 330(12): 827-38.

Arola, H., T. Koivula, et al. (1999). "Low trehalase activity is associated with abdominal symptoms caused by edible mushrooms." Scand J Gastroenterol 34(9): 898-903.

Banerjee, R. (2001). "Liposomes: applications in medicine." J Biomater Appl 16(1): 3-21.

Barry, S. C., E. Korpelainen, et al. (1997). "Roles of the N and C terminal domains of the interleukin-3 receptor alpha chain in receptor function." Blood 89(3): 842-52.

Beattie, G. M., J. H. Crowe, et al. (1997). "Trehalose: a cryoprotectant that enhances recovery and preserves function of human pancreatic islets after long-term storage." Diabetes 46(3): 519-23.

Begin, I., B. Bhatia, et al. (2003). "Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods." Theriogenology 59(8): 1839-50.

Bender, J. G. and K. Unverzagt (1993). "Flow cytometric analysis of peripheral blood stem cells." J Hematother 2(3): 421-30.

Benekli, M., B. Anderson, et al. (2000). "Severe respiratory depression after dimethylsulphoxide-containing autologous stem cell infusion in a patient with AL amyloidosis." Bone Marrow Transplant 25(12): 1299-301.

Bensinger, W. I. (2011). "Allogeneic transplantation: peripheral blood vs. bone marrow." Curr Opin Oncol 24(2): 191-6.

Berenson, R. J., R. G. Andrews, et al. (1988). "Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons." J Clin Invest 81(3): 951-5.

Berz, D., E. M. McCormack, et al. (2007). "Cryopreservation of hematopoietic stem cells." Am J Hematol 82(6): 463-72.

Bortin, M. M. and C. D. Buckner (1983). "Major complications of marrow harvesting for transplantation." Exp Hematol 11(10): 916-21.

Buchanan, S. S., S. A. Gross, et al. (2004). "Cryopreservation of stem cells using trehalose: evaluation of the method using a human hematopoietic cell line." Stem Cells Dev 13(3): 295-305.

Buettner, G. R. (1993). "The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate." Arch Biochem Biophys 300(2): 535-43.

Bunting, K. D. and R. G. Hawley (2003). "Integrative molecular and developmental biology of adult stem cells." Biol Cell 95(9): 563-78.

Câncer, I. N. d. (2012). "BRASILCORD." 2012, from (http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=2627).

Chen, T., J. P. Acker, et al. (2001). "Beneficial effect of intracellular trehalose on the membrane integrity of dried mammalian cells." Cryobiology 43(2): 168-81.

Cicuttini, F. M., C. G. Begley, et al. (1992). "The effect of recombinant stem cell factor (SCF) on purified CD34-positive human umbilical cord blood progenitor cells." Growth Factors 6(1): 31-9.

Civin, C. I. (1992). "Identification and positive selection of human progenitor/stem cells for bone marrow transplantation." Prog Clin Biol Res 377: 461-72; discussion 473.

Civin, C. I., L. C. Strauss, et al. (1984). "Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells." J Immunol 133(1): 157-65.

Colaco, C., S. Sen, et al. (1992). "Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology." Biotechnology (N Y) 10(9): 1007-11.

Corso, S., S. J. Vukelja, et al. (1993). "Diffuse alveolar hemorrhage following autologous bone marrow infusion." Bone Marrow Transplant 12(3): 301-3.

Crowe, J. H., J. F. Carpenter, et al. (1998). "The role of vitrification in anhydrobiosis." Annu Rev Physiol 60: 73-103.

Crowe, J. H. and L. M. Crowe (2000). "Preservation of mammalian cells-learning nature's tricks." Nat Biotechnol 18(2): 145-6.

Crowe, J. H., L. M. Crowe, et al. (1987). "Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars." Biochem J 242(1): 1-10.

Crowe, J. H., L. M. Crowe, et al. (1988). "Interactions of sugars with membranes." Biochim Biophys Acta 947(2): 367-84.

Crowe, J. H., F. A. Hoekstra, et al. (1992). "Anhydrobiosis." Annu Rev Physiol 54: 579-99.

Crowe, J. H., S. B. Leslie, et al. (1994). "Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying?" Cryobiology 31(4): 355-66.

Crowe, L. M. and J. H. Crowe (1992). "Anhydrobiosis: a strategy for survival." Adv Space Res 12(4): 239-47.

Davis, J. M., S. D. Rowley, et al. (1990). "Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion." Blood 75(3): 781-6.

Demelier, J. F., J. Labat, et al. (1975). "[Influence of parenterally injected trehalose in mammals having trehalase activity at different sites]." Ann Biol Clin (Paris) 33(4): 297-302.

Dhodapkar, M., S. L. Goldberg, et al. (1994). "Reversible encephalopathy after cryopreserved peripheral blood stem cell infusion." Am J Hematol 45(2): 187-8.

Eapen, M., P. Rubinstein, et al. (2007). "Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study." Lancet 369(9577): 1947-54.

Edwards, R. G. and P. Hollands (2007). "Will stem cells in cord blood, amniotic fluid, bone marrow and peripheral blood soon be unnecessary in transplantation?" Reprod Biomed Online 14(3): 396-401.

Egorin, M. J., D. M. Rosen, et al. (1998). "Plasma concentrations and pharmacokinetics of dimethylsulfoxide and its metabolites in patients undergoing peripheral-blood stem-cell transplants." J Clin Oncol 16(2): 610-5.

Elbein, A. D., Y. T. Pan, et al. (2003). "New insights on trehalose: a multifunctional molecule." Glycobiology 13(4): 17R-27R.

Elliott, C., D. M. Samson, et al. (1996). "When to harvest peripheral-blood stem cells after mobilization therapy: prediction of CD34-positive cell yield by preceding day CD34-positive concentration in peripheral blood." J Clin Oncol 14(3): 970-3.

Erdag, G., A. Eroglu, et al. (2002). "Cryopreservation of fetal skin is improved by extracellular trehalose." Cryobiology 44(3): 218-28.

Eroglu, A., J. A. Lawitts, et al. (2003). "Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development." Cryobiology 46(2): 121-34.

Eroglu, A., M. J. Russo, et al. (2000). "Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells." Nat Biotechnol 18(2): 163-7.

Eroglu, A., M. Toner, et al. (2002). "Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes." Fertil Steril 77(1): 152-8.

Fahy, G. M., D. R. MacFarlane, et al. (1984). "Vitrification as an approach to cryopreservation." Cryobiology 21(4): 407-26.

Fraser, J. K., M. S. Cairo, et al. (1998). "Cord Blood Transplantation Study (COBLT): cord blood bank standard operating procedures." J Hematother 7(6): 521-61.

Gangenahalli, G. U., V. K. Singh, et al. (2006). "Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion or homing." Stem Cells Dev 15(3): 305-13.

Garcia-Castro, J., J. C. Segovia, et al. (2000). "Transplantation of syngenic bone marrow contaminated with NGFr-marked WEHI-3B cells: an improved model of leukemia relapse in mice." Leukemia 14(3): 457-65.

Gluckman, E. (1989). "Recent trends in allogeneic bone marrow transplantation." Clin Transpl: 123-8.

Gluckman, E. (2001). "Hematopoietic stem-cell transplants using umbilical-cord blood." N Engl J Med 344(24): 1860-1.

Gratama, J. W., D. R. Sutherland, et al. (2001). "Flow cytometric enumeration and immunophenotyping of hematopoietic stem and progenitor cells." J Biol Regul Homeost Agents 15(1): 14-22.

Green, J. L. and B. Driggers (1989). "All visiting nurses are not alike: home health and community health nursing." J Community Health Nurs 6(2): 83-93.

Guo, N., I. Puhlev, et al. (2000). "Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells." Nat Biotechnol 18(2): 168-71.

Hirsh, A. G. (1987). "Vitrification in plants as a natural form of cryoprotection." Cryobiology 24(3): 214-28.

Holovati, J. L. and J. P. Acker (2007). "Spectrophotometric measurement of intraliposomal trehalose." Cryobiology 55(2): 98-107.

Holovati, J. L., M. I. Gyongyossy-Issa, et al. (2009). "Effects of trehalose-loaded liposomes on red blood cell response to freezing and post-thaw membrane quality." Cryobiology 58(1): 75-83.

Holovati, J. L., K. A. Wong, et al. (2008). "The effects of cryopreservation on red blood cell microvesiculation, phosphatidylserine externalization, and CD47 expression." Transfusion 48(8): 1658-68.

Huang, S., Z. Chen, et al. (1999). "Correlation between IL-3 receptor expression and growth potential of human CD34+ hematopoietic cells from different tissues." Stem Cells 17(5): 265-72.

Humeau, L., F. Bardin, et al. (1996). "Phenotypic, molecular, and functional characterization of human peripheral blood CD34+/THY1+ cells." Blood 87(3): 949-55.

Jain, N. K. and I. Roy (2009). "Effect of trehalose on protein structure." Protein Sci 18(1): 24-36.

Kasai, M. and T. Mukaida (2004). "Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification." Reprod Biomed Online 9(2): 164-70.

Katkov, II, N. Katkova, et al. (1998). "Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations." Cryobiology 37(4): 325-38.

Kawada, H., K. Ando, et al. (1999). "Rapid ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system." Exp Hematol 27(5): 904-15.

Kearney, J. N. (1998). "Evaluation of proteinase inhibitors and free radical inhibitors/scavengers in reducing post-thaw viability loss of cryopreserved skin." Burns 24(6): 507-12.

Kessinger, A., K. Schmit-Pokorny, et al. (1990). "Cryopreservation and infusion of autologous peripheral blood stem cells." Bone Marrow Transplant 5 Suppl 1: 25-7.

Kitamura, T., N. Sato, et al. (1991). "Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors." Cell 66(6): 1165-74.

Kohli, V., J. P. Acker, et al. (2005). "Reversible permeabilization using high-intensity femtosecond laser pulses: applications to biopreservation." Biotechnol Bioeng 92(7): 889-99.

Koo, H. H. and H. S. Ahn (2012). "Umbilical cord blood transplantation." Korean J Pediatr 55(7): 219-23.

Koster, K. L. (1991). "Glass formation and desiccation tolerance in seeds." Plant Physiol 96(1): 302-4.

Kucia, M., R. Reca, et al. (2005). "Bone marrow as a home of heterogenous populations of nonhematopoietic stem cells." Leukemia 19(7): 1118-27.

Lansdorp, P. M., H. J. Sutherland, et al. (1990). "Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34+ hemopoietic cells from human bone marrow." J Exp Med 172(1): 363-6.

Lao, G., D. Polayes, et al. (2001). "Overexpression of trehalose synthase and accumulation of intracellular trehalose in 293H and 293FTetR:Hyg cells." Cryobiology 43(2): 106-13.

Lasic, D. D. (1988). "The mechanism of vesicle formation." Biochem J 256(1): 1-11.

Limaye, L. S. (1997). "Bone marrow cryopreservation: improved recovery due to bioantioxidant additives in the freezing solution." Stem Cells 15(5): 353-8.

Limaye, L. S. and V. P. Kale (2001). "Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium." J Hematother Stem Cell Res 10(5): 709-18.

Lovelock, J. E. and M. W. Bishop (1959). "Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide." Nature 183(4672): 1394-5.

Mazur, P. (1984). "Freezing of living cells: mechanisms and implications." Am J Physiol 247(3 Pt 1): C125-42.

Meyers, S. A. (2006). "Dry storage of sperm: applications in primates and domestic animals." Reprod Fertil Dev 18(1-2): 1-5.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods 65(1-2): 55-63.

Motta, J. P., B. E. Gomes, et al. (2010). "Evaluations of bioantioxidants in cryopreservation of umbilical cord blood using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide." Cryobiology 60(3): 301-7.

Mussauer, H., V. L. Sukhorukov, et al. (2001). "Trehalose improves survival of electrotransfected mammalian cells." Cytometry 45(3): 161-9.

Nagasawa, T. (2006). "Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development." Nat Rev Immunol 6(2): 107-16.

Nakano, A., T. Harada, et al. (1990). "Expression of leukocyte common antigen (CD45) on various human leukemia/lymphoma cell lines." Acta Pathol Jpn 40(2): 107-15.

Nordberg, J. and E. S. Arner (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." Free Radic Biol Med 31(11): 1287-312.

Ohtake, S., C. Schebor, et al. (2006). "Effects of trehalose on the phase behavior of DPPC-cholesterol unilamellar vesicles." Biochim Biophys Acta 1758(1): 65-73.

Ohtake, S., C. Schebor, et al. (2005). "Phase behavior of freeze-dried phospholipid-cholesterol mixtures stabilized with trehalose." Biochim Biophys Acta 1713(1): 57-64.

Oliver, A. E., O. Leprince, et al. (2001). "Non-disaccharide-based mechanisms of protection during drying." Cryobiology 43(2): 151-67.

Patist, A. and H. Zoerb (2005). "Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems." Colloids Surf B Biointerfaces 40(2): 107-13.

Pellerin-Mendes, C., L. Million, et al. (1997). "In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen." Cryobiology 35(2): 173-86.

Pierelli, L., G. Scambia, et al. (1999). "Expansion of granulocyte colony-stimulating factor/chemotherapy-mobilized CD34+ hematopoietic progenitors: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/erythropoietin hybrid protein (MEN11303) and interleukin-15." Exp Hematol 27(3): 416-24.

Poste, G. and D. Papahadjopoulos (1976). "Lipid vesicles as carriers for introducing materials into cultured cells: influence of vesicle lipid composition on mechanism(s) of vesicle incorporation into cells." Proc Natl Acad Sci U S A 73(5): 1603-7.

Reyes, M., A. Dudek, et al. (2002). "Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow." J Clin Invest 109(3): 337-46.

Rocha, V., J. Cornish, et al. (2001). "Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia." Blood 97(10): 2962-71.

Rodrigues, J. P., F. H. Paraguassu-Braga, et al. (2008). "Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood." Cryobiology 56(2): 144-51.

Rowley, S. D. and G. L. Anderson (1993). "Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells." Bone Marrow Transplant 11(5): 389-93.

Rubinstein, P., J. W. Adamson, et al. (1999). "The Placental/Umbilical Cord Blood Program of the New York Blood Center. A progress report." Ann N Y Acad Sci 872: 328-34; discussion 334-5.

Rubinstein, P., C. Carrier, et al. (1998). "Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors." N Engl J Med 339(22): 1565-77.

Rubinstein, P., L. Dobrila, et al. (1995). "Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution." Proc Natl Acad Sci U S A 92(22): 10119-22.

Rubinstein, P. and C. E. Stevens (2000). "Placental blood for bone marrow replacement: the New York Blood Center's program and clinical results." Baillieres Best Pract Res Clin Haematol 13(4): 565-84.

Sasnoor, L. M., V. P. Kale, et al. (2003). "Supplementation of conventional freezing medium with a combination of catalase and trehalose results in better protection of surface molecules and functionality of hematopoietic cells." J Hematother Stem Cell Res 12(5): 553-64.

Sasnoor, L. M., V. P. Kale, et al. (2005). "A combination of catalase and trehalose as additives to conventional freezing medium results in improved cryoprotection of human hematopoietic cells with reference to in vitro migration and adhesion properties." Transfusion 45(4): 622-33.

Sasnoor, L. M., V. P. Kale, et al. (2005). "Prevention of apoptosis as a possible mechanism behind improved cryoprotection of hematopoietic cells by catalase and trehalose." Transplantation 80(9): 1251-60.

Sato, S., K. Okamoto, et al. (1999). "Trehalose can be used as a parenteral saccharide source in rabbits." J Nutr 129(1): 158-64.

Sauer-Heilborn, A., D. Kadidlo, et al. (2004). "Patient care during infusion of hematopoietic progenitor cells." Transfusion 44(6): 907-16.

Scheinkonig, C., S. Kappicht, et al. (2004). "Adoption of long-term cultures to evaluate the cryoprotective potential of trehalose for freezing hematopoietic stem cells." Bone Marrow Transplant 34(6): 531-6.

Sies, H. and W. Stahl (1995). "Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants." Am J Clin Nutr 62(6 Suppl): 1315S-1321S.

Stiff, P. J., A. R. Koester, et al. (1987). "Autologous stem cell transplantation using peripheral blood stem cells." Transplantation 44(4): 585-8.

Sutherland, D. R., L. Anderson, et al. (1996). "The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering." J Hematother 5(3): 213-26.

Thomas, E. D. and R. Storb (1970). "Technique for human marrow grafting." Blood 36(4): 507-15.

Tunnacliffe, A., A. Garcia de Castro, et al. (2001). "Anhydrobiotic engineering of bacterial and mammalian cells: is intracellular trehalose sufficient?" Cryobiology 43(2): 124-32.

Van Handel, E. (1968). "Trehalase and maltase in the serum of vertebrates." Comp Biochem Physiol 26(2): 561-6.

Waller, E. K., J. Olweus, et al. (1995). "The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors." Blood 85(9): 2422-35.

Wieber, A., T. Selzer, et al. (2011). "Physico-chemical characterisation of cationic DOTAP liposomes as drug delivery system for a hydrophilic decapeptide before and after freeze-drying." Eur J Pharm Biopharm 80(2): 358-67.

Willhite, C. C. and P. I. Katz (1984). "Toxicology updates. Dimethyl sulfoxide." J Appl Toxicol 4(3): 155-60.

Wolkers, W. F., F. Tablin, et al. (2002). "From anhydrobiosis to freeze-drying of eukaryotic cells." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 131(3): 535-43.

Wolkers, W. F., N. J. Walker, et al. (2001). "Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying." Cryobiology 42(2): 79-87.

Zambelli, A., G. Poggi, et al. (1998). "Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion." Anticancer Res 18(6B): 4705-8.

Zhou, X., J. Yuan, et al. (2010). "Loading trehalose into red blood cells by electroporation and its application in freeze-drying." Cryo Letters 31(2): 147-56.

ANEXO A - Carta do comitê de ética

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer
Comité de Ética em Pesquisa-INCA

Rio de Janeiro, 26 de abril de 2006

Ao: Dr. Flávio Henrique Paraguassú Braga

Pesquisador Principal

Registro CEP nº 15/05 (Este n° deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Título do Projeto: Avaliação de novos crioprotetores com potencial de uso no transplante de células tronco hematopoiéticas.

Prezado Doutor

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer após re-análise decidiu aprovar o Protocolo intitulado: Avaliação de novos crioprotetores com potencial de uso no transplante de células tronco hematopoiéticas, bem como seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em 12 de abril de 2006.

Estamos encaminhando a documentação pertinente para o CONEP, com vistas a registro e arquivamento.

Atenciosamente

Dra Adriana Scheliga
Coordenadora do Comité de Ética em Pesquisa

CC: Dr. Luís Fernando da Silva Bouzas
Diretor do GEMO

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto Novos Crioprotetores

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, de um projeto de pesquisa. Após ser esclarecido(a) com as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

Termo de Esclarecimento

Esta cópia fica com a gestante

A célula-tronco é definida como a célula com capacidade de gerar diversos outros tipos celulares. As principais fontes das células-tronco hematopoiéticas, ou seja, células-tronco capazes de gerar todo o sangue, são a medula óssea, o sangue periférico, o sangue de cordão umbilical humano. As células-tronco doadas são utilizadas em pacientes com câncer, que necessitam delas para recompor sua medula óssea e voltar a produzir sangue. O sangue de cordão umbilical é uma fonte alternativa de células-tronco uma vez que esse sangue de cordão umbilical e a placenta são tratados como lixo após o parto. O sucesso do uso das células do sangue de cordão umbilical em transplantes culminou com a necessidade de armazenamento dessas células. Sendo assim, o primeiro banco de sangue de cordão umbilical e placentário (BSCUP) público foi estabelecido em 1993 nos Estados Unidos. Esse procedimento encorajou o estabelecimento de outros BSCUP em diversas partes do mundo e o número de transplantes, utilizando células do sangue de cordão, aumentou surpreendentemente nos últimos anos. O BSCUP do Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO), Instituto Nacional de Câncer (INCa) é uma organização que se destina a coletar, processar e armazenar células-

tronco hematopoiéticas provenientes do sangue de placenta e cordão umbilical. Para que essas células-tronco fiquem viáveis para realização do transplante, elas precisam ser congeladas e armazenadas de forma apropriada. O congelamento é uma etapa fundamental nesse processo, para proteger as células dos danos que a baixa temperatura causa (desidratação e formação de gelo dentro da célula). Para isso utilizamos substâncias especiais que as protegem. As substâncias que utilizamos atualmente para congelar células-tronco não são 100% eficientes em mantê-las vivas e saudáveis para a infusão segura nos pacientes. Em alguns pacientes, essas substâncias são tidas como possíveis causadoras de efeitos colaterais no momento de transplantes. Com o intuito de minimizar ou acabar com esses efeitos colaterais nesses pacientes, a Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e o INCa estão desenvolvendo um projeto de pesquisa onde iremos testar outras substâncias que também tenham capacidade de proteger do frio extremo, de forma encontrarmos alternativas com igual ou melhor potencia às substâncias utilizadas atualmente.

Logo, para o desenvolvimento desse projeto, utilizaremos as células-tronco de sangue do cordão umbilical e placentário doadas e o ato de doação não implicará em nenhum dano para a mãe e/ou para o bebê. Todas as informações clínicas e as identidades da mãe e de bebê serão mantidas em sigilo.

Esta cópia fica com a gestante

Termo de Consentimento, após esclarecimento

Eu, _____, declaro que:
nome legível

- ✓ Li, ouvi e entendi o esclarecimento acima e estou de acordo com a doação do sangue de cordão umbilical e placentário do meu filho(a) para o projeto de pesquisa;
- ✓ Estou ciente que a coleta de sangue de cordão umbilical e placentário se dará no momento do parto, e somente após a secção do cordão umbilical e expulsão da placenta;
- ✓ Estou ciente que a coleta de sangue de cordão umbilical não implicará em risco para mim ou para meu filho(a);
- ✓ Estou ciente que com a doação será garantido o anonimato em relação a minha identidade e a do meu filho(a) assim como informações clínicas pertinentes ao projeto;
- ✓ Estou ciente que a doação do sangue de cordão do meu filho(a) não implicará em nenhum tipo de pagamento ou recebimento em ambas as partes.

Esta cópia fica com a gestante

_____
Assinatura Doadora (gestante) CPF

_____
Assinatura Pesquisador Principal Conselho Profissional

Telefone para Contato: 0 xx 21 2506-6390
e-mail: cordao@inca.gov.br

Termo de Consentimento, após esclarecimento

Esta cópia retorna para o BSCUP/CEMO/INCa

Eu, _____, declaro que:
nome legível

- ✓ Li, ouvi e entendi o esclarecimento acima e estou de acordo com a doação do sangue de cordão umbilical e placentário do meu filho(a) para o projeto de pesquisa;
- ✓ Estou ciente que a coleta de sangue de cordão umbilical e placentário se dará no momento do parto, e somente após a secção do cordão umbilical e expulsão da placenta;
- ✓ Estou ciente que a coleta de sangue de cordão umbilical não implicará em risco para mim ou para meu filho(a);
- ✓ Estou ciente que com a doação será garantido o anonimato em relação a minha identidade e a do meu filho(a) assim como informações clínicas pertinentes ao projeto;
- ✓ Estou ciente que a doação do sangue de cordão do meu filho(a) não implicará em nenhum tipo de pagamento ou recebimento em ambas as partes.

_____
Assinatura Doadora (gestante) CPF

_____
Assinatura Pesquisador Principal Conselho Profissional

Telefone para Contato: 0 xx 21 2506-6390
e-mail: cordao@inca.gov.br