

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANÁLISE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE
RATOS WISTAR SUBMETIDAS À CRIOPRESERVAÇÃO

CURITIBA

2005

CAMILA CAPUCHO CURY

ANÁLISE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE
RATOS WISTAR SUBMETIDAS À CRIOPRESERVAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

CURITIBA

2005

CAMILA CAPUCHO CURY

ANÁLISE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE
RATOS WISTAR SUBMETIDAS À CRIOPRESERVAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
como pré-requisito para a obtenção do título
de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza

Coordenador: Prof. Dr. Waldemiro Gremski

CURITIBA

2005

C982a Cury, Camila Capucho
2005 Análise das células-tronco mesenquimais da medula óssea de
ratos Wistar submetidas à criopreservação / Camila Capucho Cury ;
orientador, Luiz César Guarita Souza ; coordenador, Waldemiro
Gremski. – 2005.
70 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do
Paraná, Curitiba, 2005
Inclui bibliografia

1. Células-tronco - Pesquisa. 2. Células-tronco - Criopreservação.
3. Preservação de órgãos, tecidos, etc. I. Souza, Luiz César
Guarita. II. Gremski, Waldemiro. III. Pontifícia Universidade Católica
do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
IV. Título.

CDD 21. ed. 616.02774

*Aos meus pais,
Aos amigos,
Ao orientador,
Aos professores...*

O meu agradecimento.

A mente que se abre a novas
idéias
jamais retorna ao seu tamanho original.

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Cultivo das células-tronco mesenquimais (Aumento 200 vezes, MO de Inversão).....	26
FIGURA 2 – Cultivo de células-tronco mesenquimais (flechas) identificadas pelo anticorpo anti-vimentina (Imunofluorescência, aumento de 200 vezes, MO de Fluorescência).....	26
FIGURA 3 – Viabilidade pré e pós-congelamento pelo método Azul de Trypan.....	29
FIGURA 4 – Positividade identificada pelos marcadores 7-AAD e Anexina nos períodos pré e pós-congelamento.....	30
FIGURA 5 – Valores de morte celular identificados pelos marcadores.....	31
FIGURA 6 – Viabilidade pré e pós-congelamento pelo método Citometria de fluxo.....	33
FIGURA 7 – Comparação da viabilidade celular dos métodos Azul de Trypan e Citometria de fluxo, no período pré-congelamento....	34
FIGURA 8 – Comparação da viabilidade celular dos métodos Azul de Trypan e Citometria de fluxo, no período pós-congelamento..	35
FIGURA 9 – Percentual da diferença de valores de viabilidade celular dos métodos Azul de Trypan e Citometria de fluxo nos dois períodos analisados.....	36
FIGURA 10 –Positividade identificada pelos marcadores 7-AAD e Anexina no período pré-congelamento.....	37
FIGURA 11 – Positividade identificada pelos marcadores 7-AAD e Anexina no período pós-congelamento.....	38
FIGURA 12 – Diferença de positividade identificada entre os marcadores 7-AAD e Anexina.....	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores das médias, medianas, valores mínimo e máximo, desvio padrão e valor de p identificados pelo método de determinação da viabilidade celular Azul de Trypan	28
TABELA 2 - Valores das médias, medianas, valores mínimo e máximo, desvios padrões e valores de p identificados pelos marcadores 7-AAD e Anexina	30
TABELA 3 - Valores das médias, medianas, valores mínimo e máximo, desvio padrão e valor de p identificados pelo parâmetro morte celular	31
TABELA 4 - Valores das médias, medianas, valores mínimo e máximo, desvio padrão e valor de p identificados pelo método de determinação da viabilidade celular Citometria de fluxo	32
TABELA 5 - Valores de médias, medianas, valores mínimos, valores máximos, desvios padrões e valores de p da comparação dos métodos de determinação da viabilidade celular	34
TABELA 6 - Valores de médias, medianas, valores mínimos, valores máximos, desvios padrões e valores de p da comparação dos marcadores 7-AAD e Anexina	36

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD: 7-amino-actinomycin D.

CD: *Cluster of differentiation*

CFU-F: *colony forming units fibroblast.*

DMSO: Dimetil Sulfóxido.

G-CSF: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.*

IGF-I: *Insulin Growth Factor I.*

IMDM (Iscoe's Modified Dulbecco's Media).

Rpm: Rotações por minuto.

SBF: Soro Bovino Fetal.

PBS: *Phosphate Buffered Saline.*

PCR: Reação em cadeia da polimerase.

SCF: *stem cell factor.*

MO: Microscópio Óptico

RESUMO

Introdução. As células-tronco mesenquimais (CTM) são células encontradas na medula óssea. Tais células têm ocupado posição de destaque na pesquisa clínica, podendo ser utilizadas em transplante celular, pois possuem o potencial de regeneração tissular. Procedimentos de criopreservação podem armazenar tais células por um período indeterminado de tempo, para sua posterior utilização.

Objetivo. Comparar a viabilidade das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos Wistar, pré e pós-criopreservação, por meio dos métodos

Azul de Trypan e Citometria de fluxo. **Métodos.** As CTM foram isoladas de acordo com um método descrito por Böyum, cultivadas e, após duas semanas, os parâmetros foram determinados. As CTM foram então criopreservadas em nitrogênio líquido durante um mês, descongeladas e os parâmetros foram determinados novamente.

Resultados. Os resultados de viabilidade pelo método do Azul de Trypan foram, em média, de 94,76% antes e 90,58% após a criopreservação; o método Citometria de fluxo forneceu valores de 85,52% antes e 66,25% após a criopreservação. O marcador 7-AAD forneceu valores em média de 16,79% antes e 20,64% após a criopreservação. O marcador Anexina forneceu valores em média de 15,02% antes e 31,21% após a criopreservação, sendo observada significância estatística. Foram encontradas diferenças de significância estatística entre os métodos analisados, tanto na etapa pré como na etapa pós-criopreservação.

Conclusão. O processo de criopreservação induz danos à estrutura celular. Desta forma, são necessários métodos fidedignos para a determinação da viabilidade celular. O método da Citometria de fluxo é mais sensível que o método Azul de Trypan para análise de viabilidade das células-tronco mesenquimais.

Descritores: Células-tronco mesenquimais, viabilidade, criopreservação, Azul de Trypan, Citometria de fluxo.

SUMMARY

Introduction. Mesenchymal stem cells (MSC) are provided by a variety of sources in the organism, including the bone marrow. These cells have a relevant position in the clinical research. They can be used in the transplantation proceedings, because they have tissue regeneration capability. The cryopreservation process can store these cells by an indetermined period of time, and these cells can be used whenever necessary. **Objective.** The aim of this study was compare the MSC viability before and after the cryopreservation process, by two different methods: the Trypan Blue exclusion and the Flow Citometry assay. **Methods.** The cells were isolated by a method described by Böyum, cultivated and, after two weeks, the parameters were determined. The cells were then cryopreserved in liquid nitrogen vapor phase during one month, thawed and the parameters were determined again. **Results.** The viability determined by the Trypan Blue exclusion test was 94,76% before and 90,58% after the cryopreservation process, and the viability determined by the Flow Citometry assay was 85,52% before e 66,25% after the cryopreservation. The 7-AAD marker showed values by means of 16,79% before and 20,64% after the cryopreservation process. The Annexin marker showed values by means of 15,02% before and 31,21% after the cryopreservation process. It was found significant differences between the methods analised. **Conclusion.** The cryopreservation process provoked injuries to the cell structure. Thus, it's necessary a method that could be trustworthy to the viability assay. The Flow Citometry assay is more sensitive than the Trypan Blue exclusion method to the mesenchymal stem cells.

Key words: Mesenchymal stem cell, cryopreservation, viability, Tripan Blue exclusion test, Flow Citometry.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMO	VIII
SUMMARY	IX
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. MÉTODOS	20
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	64
APÊNDICE.....	69

1 INTRODUÇÃO

As limitações relativas ao transplante de órgãos direcionam os pesquisadores para caminhos alternativos de tratamento. Uma das opções é a engenharia tecidual, a qual tem-se tornado um dos mais promissores campos de investigação. Esta alternativa terapêutica tem como objetivo principal tratar a consequência das doenças, cujos tecidos não apresentam capacidade de regeneração própria (Armandola, 2003).

Pesquisadores como Yeh *et al.*, 2003, investigaram várias populações celulares, como as células-tronco embrionárias, células do cordão umbilical e células-tronco mesenquimais, sugerindo que podem ser consideradas como uma fonte para a terapia celular de substituição.

Embora existam inúmeras questões éticas referentes às células-tronco embrionárias, elas são consideradas pluripotentes, podendo se diferenciar em tipos celulares específicos, dentre eles os cardiomiócitos (Lee *et al.*, 2004).

O recente avanço na área da pesquisa de células da medula óssea sugere que tais células possuem potencial para regenerar tecidos em órgãos nos quais não ocorre regeneração parenquimal. O estudo destas células teve início na década de setenta (Jackson *et al.*, 2001; Prockop *et al.*, 2003).

Encontradas na medula óssea, as células-tronco mesenquimais de adulto colonizam diferentes tecidos, replicam-se, possibilitam transplante autólogo e possuem a capacidade de se diferenciar em células especializadas, como cardiomiócitos, células endoteliais, condrócitos, osteócitos, tecido adiposo e células musculares esqueléticas. A grande vantagem do transplante autólogo destas células é a eliminação da necessidade da imunossupressão (Lee *et al.*, 2004).

Com o objetivo de armazenar células por um período indeterminado, estão sendo desenvolvidos protocolos de congelamento e descongelamento de células e tecidos biológicos para sua posterior utilização (Gao *et al.*, 1998).

O interesse pela preservação de tecidos biológicos é descrito desde a década de cinquenta, bem como a formação de gelo intracelular e extracelular, o qual causava danos à estrutura da célula (Karow e Webb, 1965).

O procedimento de criopreservação de células, apesar de induzir danos à estrutura celular, é altamente recomendado, para posterior utilização de amostras biológicas. Em baixas temperaturas, a membrana plasmática é a primeira estrutura a sofrer lesão. Em resposta a este estímulo, a célula pode entrar em um processo conhecido como apoptose, conduzindo à morte celular. Frente a um estímulo, a membrana plasmática perde sua assimetria, expondo um fosfolípido componente de sua estrutura bimolecular, chamado fosfatidilserina (Wolfe e Bryant, 1999)

A criopreservação é o método de escolha para preservação de tecidos a longo prazo. Nas técnicas de criopreservação, o tecido a ser preservado é primeiramente tratado com agentes crioprotetores, a fim de proteger as células de danos causados pela desidratação ou formação de gelo intracelular durante o resfriamento. Nas técnicas de congelamento, as células trocam agentes crioprotetores e água com o meio extracelular pela membrana plasmática. Os danos decorrentes do congelamento ocorrem devido à desidratação intensa. A formação de gelo intracelular e a sua morfologia dependem da taxa de decréscimo de temperatura e da concentração de aditivos químicos; isso é altamente indesejável durante o congelamento, uma vez que é letal para as células. O agente crioprotetor mais comumente utilizado é o Dimetil Sulfoxido (DMSO) (Ishiguro e Koile, 1998; Cui *et al.*, 2002).

Os agentes químicos crioprotetores têm em comum a habilidade específica de proteger as células dos danos do congelamento; eles provavelmente agem por meio do fortalecimento das pontes de hidrogênio das estruturas que contenham água (Karow e Webb, 1965).

A intensa preocupação em criopreservar células durante longos períodos, preservando sua integridade, impulsiona pesquisadores a desenvolverem pesquisas experimentais na área da engenharia tecidual. Desejam-se, desta forma, células armazenadas durante longos períodos, até mesmo períodos indeterminados de tempo (Dumont *et al.*, 2004).

Existem atualmente vários testes para a determinação da integridade celular. Um deles é o método do Azul de Trypan, o qual é um corante que tem a capacidade de penetrar no interior da célula, cuja membrana celular esteja rompida. Tal teste é largamente empregado devido a sua praticidade, porém possui o inconveniente de produzir artefatos na penetração do corante, comprometendo sua determinação (Mascotti *et al.*, 2000).

Há protocolos alternativos ao Azul de Trypan, como aqueles baseados na Citometria de Fluxo, os quais utilizam uma combinação de marcadores, como a Anexina, uma proteína que possui afinidade pelos fosfolípidios expostos pela membrana celular, e o corante 7-AAD, o qual penetra no interior da célula,

forneendo informações sobre a formação de poros na membrana celular (Höppner *et al.*, 2002).

Bacsó *et al.*, 2000, afirmam que no momento em que a integridade celular foi rompida, em um processo de morte celular, por exemplo, a viabilidade de tais células estaria, por consequência, comprometida.

Por meio das técnicas supracitadas, é possível avaliar o estado de integridade de células armazenadas em baixas temperaturas. Esses métodos precisam ser o mais confiável possível, a fim de refletirem o estado de integridade da membrana, uma vez que o sucesso de um transplante celular depende dessa integridade, a fim de que as células possam colonizar a área afetada por uma patologia, interagindo com as demais células do hospedeiro e recuperando o tecido lesado.

Os objetivos deste trabalho são comparar a viabilidade das células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos Wistar pré e pós-criopreservação, pelos métodos Azul de Trypan e Citometria de fluxo, bem como a comparação dos métodos utilizados para a determinação da viabilidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Diante das patologias descritas pela comunidade científica buscam-se, de uma maneira incessante, novas alternativas de tratamento. Dentre essas alternativas, o transplante de órgãos possui grande importância terapêutica. Porém, há algumas questões a serem consideradas relativas a esse procedimento, como a falta de doadores de órgãos e a imunorrejeição induzida por um enxerto. Novas opções terapêuticas estão sendo estudadas com resultados interessantes.

Os estudos de transplantes de células foram inicialmente conduzidos por Scorsin *et al.*, 1996, os quais investigaram a utilização dos cardiomiócitos fetais para a reparação de áreas lesadas por um infarto, em um modelo experimental. As questões éticas referentes a esta matéria impulsionaram pesquisadores para a busca de caminhos alternativos de transplante celular em relação ao tipo em questão.

Estão sendo propostas algumas linhas de pesquisa, cujo objetivo é abordar a causa principal da disfunção. Uma delas está relacionada à administração de fatores angiogênicos, a fim de aumentar a vascularização tecidual. A outra alternativa seria o transplante de células, cujo objetivo é aumentar a massa muscular contrátil (Souza, 2001).

Em 2001, foi sugerida a utilização de células da medula óssea com a finalidade de aumentar a angiogênese, onde a rede de capilares formada ao redor da cicatriz causada pelo infarto seria insuficiente para manter a velocidade de crescimento tecidual, necessária para a compensação da contração muscular. Os experimentos mostraram que as células-tronco da medula óssea foram mobilizadas, expandidas em cultura e utilizadas para induzir angiogênese protegendo, então, cardiomiócitos hipertrofiados contra a apoptose e prevenindo a remodelação e a falência cardíaca após o infarto do miocárdio (Kocher *et al.*, 2001)

A célula ideal para ser utilizada na cardiomioplastia celular necessita ser indiferenciada, a qual pode passar por uma completa diferenciação em cardiomiócitos e em vasos sanguíneos; tal célula pode ser encontrada na medula óssea de adultos, podendo ser as células-tronco mesenquimais, já conhecidas e caracterizadas graças às suas particularidades (Toma *et al.*, 2002).

Dados experimentais sugerem que as células da medula óssea podem contribuir para a regeneração do infarto do miocárdio. A utilização clínica destas células sugere que as mesmas podem contribuir para a regeneração do coração infartado. Foi realizado um estudo, composto por dois grupos de dez pacientes, sendo que o primeiro grupo recebeu somente terapia padrão (ácido acetil salicílico, inibidores da Enzima Conversora de Angiotensin, Beta-bloqueador e estatina), e o segundo grupo recebeu, além da terapia, o transplante de células-tronco cultivadas *in vitro*. Os resultados mostraram melhora significativa nos parâmetros função cardíaca, geometria e contratilidade cardíaca no grupo de pacientes que recebeu terapia celular adicional. Esta melhora nos parâmetros acima citados pode ser atribuída à angiogênese e à cardiomiogênese mediadas pelas células da medula óssea (Strauer *et al.*, 2002)

Acreditava-se que, devido ao fato de os cardiomiócitos interromperem o seu ciclo celular logo após o nascimento, qualquer perda de tecido do miocárdio não poderia ser reparada. Entretanto, recentes relatos indicam que os cardiomiócitos podem ser regenerados por células da medula óssea. Foi realizado um estudo cujo objetivo era investigar se as células coletadas da medula óssea podem se diferenciar em cardiomiócitos no coração intacto. As células da medula óssea de ratos machos foram isoladas e transplantadas no coração de ratos fêmeas; para avaliar a efetividade do transplante, foi utilizada uma técnica de hibridização fluorescente *in situ*, ou FISH, para demonstrar a presença do cromossomo Y como um marcador celular; também foram utilizados testes para imunohistoquímica com anticorpos contra proteínas cardíacas específicas, caoveolin 3 e troponina I. Os resultados indicaram que as células da medula óssea foram transformadas em cardiomiócitos e passaram por uma diferenciação músculo-específica no coração intacto dos ratos sem lesão prévia do miocárdio. Os autores sugerem que as células dos doadores gradualmente se incorporaram às células receptoras no coração, particularmente aos cardiomiócitos; entretanto, tal mecanismo ainda necessita ser melhor investigado (Satomi-Kobayashi *et al.*, 2002)

Foi realizado um experimento com o propósito de investigar o potencial das células-tronco mesenquimais humanas originárias da medula óssea, ao passar por diferenciação miogênica, uma vez transplantadas no coração de murinos adultos. As

células foram marcadas com β galactosidase (uma enzima codificada por um gene, o *lacZ*, o qual foi transfectado em um vetor, um adenovírus replicante, para, posteriormente, expressar a enzima) e injetadas no ventrículo esquerdo de ratos. As células foram transplantadas no coração sadio dos ratos. Após 30 minutos, 4, 14, 21, 30 e 60 dias da cirurgia, os animais foram sacrificados para a retirada do coração, a fim de realizar imunohistoquímica. A imunofluorescência para a β galactosidase confirmou a presença das células-tronco mesenquimais no coração do hospedeiro. A imunohistoquímica revelou a expressão de desmina, cadeia pesada da miosina, troponina cardíaca e fosfolamban (uma fosfoproteína que regula a modulação do retículo endoplasmático das células cardíacas) em níveis comparáveis àqueles dos cardiomiócitos hospedeiros. O estudo demonstra a habilidade das células-tronco mesenquimais em se integrar ao ambiente e passar por diferenciação em músculo estriado no coração de ratos adultos, iniciando as possibilidades de utilização das células-tronco adultas, de humanos, para a cardiomioplastia terapêutica (Toma *et al.*, 2002)

A terapia celular para a insuficiência cardíaca emergiu como linha de frente nas pesquisas em cardiologia. Os dois tipos celulares mais utilizados para a regeneração cardíaca são os mioblastos e células-tronco da medula óssea, as quais são prontamente disponíveis, autólogas e facilmente expandidas *in vitro* (Thompson *et al.*, 2003).

A investigação de tipos celulares utilizados em transplante celular induziu a um estudo, cujo objetivo foi comparar a efetividade destes tipos celulares. Foi realizado um experimento no qual foram transplantados números iguais de mioblastos e células progenitoras da medula óssea no centro da cicatriz do miocárdio de coelhos que foram induzidos a um infarto, avaliando a função regional sistólica. Os resultados sugeriram que a avaliação dos parâmetros cardíacos, quatro semanas após o transplante de células, indicou uma melhora funcional em todos os coelhos do experimento que receberam células da medula óssea, em 75% dos coelhos que receberam transplante de mioblastos e em 25% dos coelhos do grupo controle, os quais receberam apenas meio de cultura. Os dados deste estudo indicam que as células derivadas da medula óssea e mioblastos esqueléticos melhoram a função regional sistólica cardíaca de forma homogênea. Isso é

embasado em dados histológicos, os quais evidenciaram a localização das células ao redor da área infartada em todos os animais tratados com o transplante de células e a diferenciação *in vivo* de ambos os tipos celulares em células que expressam proteínas contráteis (Thompson *et al.*, 2003).

Existe uma grande variedade de células doadoras que podem substituir o miocárdio que sofreu necrose; tais células já estão sendo aplicadas em estudos de terapia celular em protocolos experimentais e clínicos. São elas: cardiomiócitos fetais, mioblastos esqueléticos, células progenitoras endoteliais, células-tronco embrionárias e células-tronco adultas mesenquimais (Lee *et al.*, 2004).

A descoberta de processos regenerativos presentes no miocárdio colocou a pesquisa com células-tronco em posição de destaque na área da cardiologia. O conceito de reparação do miocárdio e a angiogênese observada na terapia celular revolucionou a abordagem do tratamento no infarto do miocárdio (Chen *et al.*, 2004).

2.1 CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA

A medula óssea produz tipos celulares distintos, cada um deles com funções específicas. Dentre eles citam-se as células hematopoiéticas, células estromais (ou células mesenquimais) e células progenitoras endoteliais. As células-tronco hematopoiéticas são utilizadas clinicamente para restaurar vários componentes do sangue e do sistema imunológico. As células-tronco mesenquimais têm a capacidade de originar, quando estimuladas adequadamente, músculo, ossos, cartilagem e células gordurosas. As células progenitoras se diferenciam em células endoteliais, as quais integram os vasos sanguíneos e capilares (Kirschstein, 2001).

Uma célula-tronco é um tipo especial de célula que possui a capacidade única de se renovar e originar tipos celulares especializados, não sendo comprometida com nenhuma função específica até que receba um sinal para se desenvolver em uma célula especializada. A sua capacidade proliferativa, combinada a sua habilidade de se tornar especializada, a faz única. Pesquisadores, por anos, têm procurado maneiras de utilizá-las com o intuito de substituir células e tecidos que sofreram lesão ou adoeceram (Kirschstein, 2001).

As células-tronco mesenquimais da medula óssea têm algumas características que as distinguem das células hematopoiéticas. Esses dois tipos celulares são de fácil separação *in vitro*. Quando a medula óssea é dissociada e o material é coletado em um gradiente de concentração, as células-tronco mesenquimais, quando dispensadas em frascos próprios para cultivo, aderem-se à superfície destes frascos, enquanto as células-tronco hematopoiéticas não possuem essa capacidade de adesão (Kirschstein, 2001).

A expansão do conhecimento acerca da biologia tem movido o foco da área da reparação para a regeneração tecidual. Especialmente, as células-tronco mesenquimais, são recursos atrativos para este campo, devido ao seu potencial para diferenciação em vários tipos de células, em resposta à transdução de sinais mediados por citocinas (Friedenstein *et al.*, 2002).

Pesquisas revelaram que as células progenitoras mesenquimais (representadas coletivamente por CFU-F, do inglês *colony forming units fibroblast*, ou unidades formadoras de colônia semelhantes a fibroblastos) originam populações heterogêneas funcionais de elementos estromais semelhantes a fibroblastos indiferenciados; tais elementos conservam seu potencial para se proliferar e diferenciar em tecidos especializados. Estas células podem representar um reservatório de populações de múltiplas linhagens de progenitores mesenquimais/estromais que se encontram em um estágio intermediário de diferenciação. Pesquisas são dedicadas ao entendimento dos mecanismos biológicos que são únicos à notável plasticidade destas células, as quais poderão ser utilizadas para tratar doenças genéticas e degenerativas, quando aliadas à terapia gênica, assim como regenerar tecidos (La Russa *et al.*, 2002).

A capacidade de expansão das células-tronco mesenquimais em cultura tem facilitado o desenvolvimento de ensaios clínicos para avaliar a segurança, as características e a eficácia do transplante dessas células para uma variedade de doenças (Devine, 2002).

Muito foi pesquisado sobre a identificação das células-tronco da medula óssea, principalmente no que diz respeito àquelas células que possuem a capacidade de reparação tecidual. Uma classe de células tem recebido especial

atenção por muitos anos, sendo conhecidas como células-tronco mesenquimais ou células estromais da medula (Prockop *et al.*, 2003).

A utilização das células para regeneração ou reparo tecidual é uma das áreas mais promissoras na pesquisa biomédica. Pesquisas mostram que o conhecimento adquirido em torno dos estudos de diferenciação de células da medula óssea em células do miocárdio e outros tecidos têm levado pesquisadores a adotarem modelos em pacientes portadores de miocardiopatias. Foram relatados alguns estudos de pacientes que foram submetidos a transplante de células e comparados com grupos-controle; os resultados obtidos foram animadores. Porém, são necessários estudos e pesquisas constantes, pois ainda há muito o que ser definido e demonstrado em protocolos clínicos (Cardoso *et al.*, 2003).

A transdiferenciação de células-tronco progenitoras do sangue periférico em cardiomiócitos, células endoteliais e células do músculo liso *in vivo*, por meio do transplante de células no miocárdio infartado foi sugerida em um estudo. Técnicas de marcação celular demonstraram o desenvolvimento de cardiomiócitos e vasos sanguíneos. As células provenientes do transplante demonstraram morfologia de cardiomiócitos maduros, integrados à área adjacente ao infarto (Yeh *et al.*, 2003).

Em face dos resultados do transplante de células-tronco mesenquimais no reparo do infarto do miocárdio, foi sugerido um estudo, o qual analisou a eficácia de vários mecanismos de administração sistêmica de células-tronco mesenquimais, por meio da avaliação da cinética celular, distribuição sistêmica e a colonização dessas células no miocárdio. As células-tronco, isoladas, foram marcadas com Tecnécio 99 (um elemento radioativo), ou com corante verde fluorescente chamado PKH2, ou com BrdU ou com um adenovírus recombinante E1a, que carregava o gene *lacZ*. Os animais, divididos em três grupos, receberam as células da seguinte maneira: infusão por meio da artéria femoral, injeção diretamente no ventrículo esquerdo e injeção no ventrículo direito, porém todos os animais deste último grupo morreram de embolia pulmonar. Utilizando métodos especiais de coloração, as células foram identificadas nos locais onde foram infundidas. Os resultados indicaram que a infusão de células diretamente na cavidade ventricular foi significativamente mais efetiva do que a infusão arterial, pois as células migraram e colonizaram a área do miocárdio afetada. O estudo sugere que as células-tronco mesenquimais são

capazes de colonizar o miocárdio infartado, sendo consideradas relevantes para a reparação do músculo cardíaco afetado (Barbash *et al.*, 2003,).

Por meio de técnicas de identificação molecular de células alvo, é possível estimar o número, identificar a exata localização e a migração de células transplantadas em tecidos ou órgãos-alvo específicos, assim como um desvio de sua trajetória. A utilização de partículas magnéticas para marcar células-tronco mesenquimais com a finalidade de observar sua localização por meio da ressonância magnética, tem contribuído para o estudo do reparo do miocárdio em eventos de infarto (Kraitchman *et al.*, 2003).

O tratamento por meio do transplante de células-tronco mesenquimais é o ponto central de estudos de transplante de órgãos e tecidos. As referidas células se tornaram o foco de interesse devido a suas vantagens de fácil coleta, uma vez que o material é proveniente da medula óssea do próprio paciente, eliminando, desta forma, a possibilidade de rejeição. Além disso, a coleta de material do próprio paciente não provoca controvérsias no que diz respeito aos aspectos éticos e legais (Wang *et al.*, 2004).

Foi realizado um estudo clínico cujo objetivo era demonstrar que o transplante de células da medula óssea para a regeneração do miocárdio é factível e segura. Os cinco pacientes que sofreram infarto foram submetidos a transplante de células da medula óssea entre dez a quinze dias após a ocorrência do evento; as células foram implantadas pela via intracoronária, em uma concentração de aproximadamente $5,2 \times 10^7$ células/mL. A determinação dos marcadores cardíacos creatina cinase, fração MB da creatina cinase e troponina T, realizada após o transplante obteve valores normais e a evolução clínica dos pacientes foi satisfatória; em seis meses de acompanhamento, não foi observado nenhum evento cardíaco, como arritmias ventriculares. Os resultados preliminares do estudo sugerem que a implantação de células-tronco autólogas no infarto do miocárdio por via intracoronariana é uma técnica segura (Avilés *et al.*, 2004)

Foi desenvolvido um experimento cujo objetivo era comparar o transplante de células musculares esqueléticas e células progenitoras CD133⁺ derivadas da medula óssea, ambas criopreservadas, para reparação do infarto do miocárdio em ratos imunodeficientes. O modelo proposto foi desenvolvido em animais, os quais foram

divididos em grupos e infartados por meio da ligadura da artéria coronária. Dez dias depois do infarto, os animais receberam injeções de células musculares, ou células da medula óssea, ou meio de cultura. A função ventricular esquerda foi determinada antes e após um mês do transplante. Foram utilizadas imunofluorescência, PCR (Reação em cadeia da polimerase) e hibridização *in situ* para identificar as células enxertadas no coração. Os autores afirmam que o maior achado neste estudo foi que as células criopreservadas, após transplantadas, melhoraram a função ventricular pós-infarto (dados do exame ecocardiográfico), se comparado com o grupo de animais que recebeu somente meio de cultura. Em contraste com as células musculares esqueléticas, as quais persistem como uma linhagem restrita, as células derivadas da medula óssea têm a significativa vantagem de plasticidade. Se comparadas com as células musculares esqueléticas, a plasticidade das células da medula óssea pode, de uma maneira mais eficiente, regenerar o tecido cardíaco isquêmico (Agbulut *et al.*, 2004).

As células-tronco mesenquimais podem ser transplantadas em conjunto com outros tipos celulares, como as células musculares esqueléticas, em um processo conhecido como co-cultura. Os resultados desse experimento mostrou ser funcionalmente efetivo (Souza *et al.*, 2004).

A pesquisa com células-tronco sugere que as mesmas são detentoras de um grande potencial terapêutico para o tratamento de várias de condições patológicas. De acordo com pesquisadores, o transplante dessas células não possui o risco de formação de tumor, e não é provável que o programa de diferenciação origine tecidos indesejados no organismo hospedeiro (Romano, 2004)

A funcionalidade do transplante de células-tronco mesenquimais em um modelo animal foi sugerida em um experimento, onde os pesquisadores trabalharam com cardiomiopatia induzida por drogas (Adriamicina), em coelhos. Os resultados indicaram que as células-tronco mesenquimais têm potencial para se diferenciar em cardiomiócitos, concluindo que o ambiente onde as células foram transplantadas pode a elas fornecer moléculas nutrientes específicas: fatores de crescimento, citocinas, fatores de diferenciação cardiomiogênico e, por meio da interação entre células-tronco do próprio hospedeiro e de sua matriz extracelular, as células podem ser induzidas a se diferenciar em cardiomiócitos (Jing *et al.*, 2005).

2.2 CRIOPRESERVAÇÃO

Muitas espécies de plantas e animais são naturalmente capazes de sobreviver a baixas temperaturas e, desta forma, é possível preservar a viabilidade das células de espécies homeotérmicas por períodos indefinidos de tempo (Muldrew e McGann, 1990).

A criopreservação é um método o qual permite a preservação de células vivas e tecidos funcionais para pesquisas científicas ou aplicações médicas e industriais, como transfusão sanguínea, transplante de medula óssea, inseminação artificial (humana e animal), fertilização *in vivo*, armazenamento de alimentos, dentre outros. O metabolismo de células vivas diminui drasticamente a baixas temperaturas, um fato que permite a preservação de células e tecidos a longo prazo. A maioria das células de mamíferos são sensíveis à hipotermia; mudanças no metabolismo celular induzidas por temperatura afetam fortemente sua atividade e viabilidade (Seiyama *et al.*, 1996).

A literatura cita uma contradição aparente entre o processo de criopreservação, ideal para o armazenamento de células, e os danos por ele causado, ou seja, a formação de gelo intracelular e extracelular (Gao *et al.*, 2000).

O estresse térmico de amostras induzido durante o processo de congelamento, tem sido proposto como uma deformação elástica das células, o que pode causar danos na estrutura física e mecânica da membrana plasmática, produzindo deformações permanentes (Rabin *et al.*, 1996).

Os danos observados em congelamento de tecidos biológicos podem ser causados pela taxa de resfriamento da amostra, pela taxa de descongelamento, temperatura mínima alcançada durante o processo, número de ciclos congelamento-descongelamento e a presença de crioprotetores. Segundo os mesmos autores, os mecanismos de criodestruição de amostras biológicas podem ser separados em dois grupos: a primeira fase, chamada fase de transição, está relacionada ao resfriamento da amostra, que é a passagem da temperatura ambiente, positiva, para temperaturas negativas. A segunda fase se refere aos danos relacionados ao processo de congelamento propriamente dito. Dentre os mecanismos de danos físicos citam-se a transferência de calor e massa e o equilíbrio químico entre as

soluções intra e extracelular. A interação mecânica entre cristais de gelo e células está relacionada ao processo de destruição celular durante a fase de transição (Rabin *et al.*, 1996).

A formação de gelo extracelular induz a numerosas alterações físicas e químicas. O dano celular está relacionado à natureza e à cinética da resposta celular frente ao decaimento de temperatura. Quando uma suspensão celular é refrigerada abaixo de seu ponto de congelamento, a água é removida da solução na forma de gelo, aumentando a concentração de solutos, os quais permanecem na fração não congelada, aumentando a pressão osmótica da solução restante. O gradiente resultante da pressão osmótica do outro lado da membrana plasmática fornece a força condutora para um efluxo de água das células, sendo que a taxa de efluxo é limitada pela permeabilidade da membrana plasmática à água. Com a diminuição da temperatura, há maior formação de gelo e a concentração de solutos na fração não congelada aumenta. Se a taxa de resfriamento é suficientemente lenta para permitir que a célula fique próxima do ponto de equilíbrio osmótico, então o efluxo de água irá continuar a baixas temperaturas. Em taxas de resfriamento altas o suficiente para causar afastamento significativo do ponto de equilíbrio osmótico, onde a cinética de formação de gelo no meio extracelular é muito mais rápida do que a cinética do efluxo da água da célula, pode ocorrer congelamento intracelular, o qual quase sempre está associado aos danos letais observados. Os danos provocados pelo congelamento intracelular estão relacionados à formação, recristalização e liquefação do gelo intracelular (Muldrew *et al.*, 1990; Acker *et al.*, 1999).

Os danos à membrana plasmática é a mais estudada, e talvez a mais importante forma de dano celular causada por congelamento e desidratação (Pincet *et al.*, 1994).

As membranas das células geralmente são afetadas durante processos de congelamento e descongelamento, sendo a ruptura da membrana plasmática um dos indicadores mais comumente utilizados para se identificar processos de morte celular (Wolfe *et al.*, 1999).

Com o intuito de fornecer proteção contra as agressões do congelamento e do descongelamento, muitos protocolos de criopreservação utilizam agentes crioprotetores, os quais são adicionados ao meio extracelular antes do

congelamento. Dentre eles, o DMSO (Dimetil Sulfoxido) é o agente crioprotetor mais utilizado em protocolos de preservação de amostras biológicas (McGrath, 1997).

Foi relatado que o DMSO é capaz de produzir efeitos adversos quando administrado em protocolos clínicos, cujo mecanismo sugerido foi a liberação da histamina e desgranulação dos mastócitos. Maiores efeitos do DMSO incluem anormalidades neuro-musculares, hemólise e hemoglobinúria. A equipe relatou um caso de uma paciente que recebeu uma infusão de células-tronco hematopoiéticas criopreservadas com DMSO para tratamento de amiloidose, associado a quimioterapia. A infusão das células-tronco foi realizada logo após o seu descongelamento, via endovenosa, durante 40 minutos. As complicações apresentadas pela paciente, incluindo comprometimento cardíaco e renal, pareciam estar relacionadas à idade e à disfunção de vários órgãos. Os autores citam que as possíveis causas responsáveis pela arritmia cardíaca poderiam ser a ausência de balanço eletrolítico, expansão aguda de volume infundido e efeitos adversos do crioprotetor. Os autores levantaram a hipótese de que a concentração do agente crioprotetor DMSO poderia ter sido o fator principal dos efeitos adversos apresentados por esta paciente. O DMSO tem alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas, sendo que os efeitos da diálise que a paciente recebeu foram baixos. A dose cumulativa do DMSO, recebido em duas infusões de células em 24 horas, pode ter sido muito alta e causou a toxicidade cardíaca. Os autores afirmam que a remoção do agente crioprotetor das células por meio de sucessivas lavagens, ou até mesmo a redução do volume infundido, poderia reduzir o risco de toxicidade (Zenhäusern *et al.*, 2000).

Pacientes em tratamento com células criopreservadas com DMSO podem apresentar uma variedade de queixas, como náuseas, vômito, ruborização, febre, dispnéia, sintomas cardíacos, hipertensão transiente e anafilaxia (Abrahamsen *et al.*, 2002).

O estabelecimento de técnicas de criopreservação requer o desenvolvimento de protocolos de adição e retirada dos agentes crioprotetores, com o objetivo de minimizar danos relativos à osmose. O delineamento de um protocolo de criopreservação otimizado deve levar em consideração a seqüência de eventos que ocorrem durante a criopreservação. Inicialmente, as células entram em contato com

o crioprotetor, e, nesta etapa, podem ocorrer danos relativos à toxicidade do agente crioprotetor (tóxico à temperatura ambiente) e à alta osmolaridade do meio externo. O agente crioprotetor mais comumente utilizado é o DMSO, na concentração de 10%. (Hunt *et al.*, 2003).

Durante o processo de criopreservação as células recebem alguns sinais físicos como choque térmico, oxidantes e radicais livres, os quais as preparam para a apoptose, mas não necessariamente iniciam o processo. Dados da literatura mostram que células humanas foram recuperadas após 12 anos de armazenamento em nitrogênio líquido (Fowke *et al.*, 2000).

Além das células da medula óssea, outros tipos celulares estão sendo estudados em processos de criopreservação. Segundo Ohno *et al.*, 2003, a criopreservação de células musculares poderia facilitar um acesso clinicamente aplicável e efetivo para o restabelecimento da função ventricular com a terapia de transplante celular para pacientes com cardiomiopatia dilatada hereditária. Neste estudo os autores comprovam o sucesso da criopreservação de células musculares esqueléticas e células do músculo liso vascular por meio do transplante de células, o qual possibilitou a limitação da dilatação cardíaca e a preservação da função ventricular.

Pesquisas mostram que a taxa de congelamento é um dos principais fatores que influenciam a viabilidade celular durante o processo de congelamento/descongelamento. Foi realizado um estudo no qual foram congeladas cinco espécies diferentes de células, incluindo microrganismos e células da medula óssea, mostrou que em baixas taxas de congelamento, ou seja, o congelamento lento, a saída de água da célula ocorreu de forma lenta, e isto não afetou a estrutura celular; já em taxas mais rápidas de congelamento, a viabilidade celular foi dramaticamente reduzida. Estes resultados são baseados na hipótese de que se o fluxo de água é mais rápido que o fluxo de calor, então não irá ocorrer cristalização intracelular e a taxa de viabilidade será alta. Em contraste, se o fluxo de calor é igual ao da água, então a taxa de congelamento induzirá à cristalização da água intracelular, durante a osmose, um processo o qual parece provocar a morte celular (Dumont *et al.*, 2004).

Ohno *et al.*, 2003, afirmaram que a criopreservação é um método seguro para o armazenamento de células, o qual permite o seu uso em terapias celulares selecionadas. Os autores afirmaram que a criopreservação de células deve ser realizada com cautela nos casos em que as células apresentam morfologia anormal ou baixo crescimento no período inicial de cultura.

Hunt *et al.*, 2003, afirmaram que os bancos de células de cordão umbilical necessitam de um método eficiente de armazenamento a longo prazo, e a criopreservação é aceita, na verdade, como o único método de preservação eficaz.

O estabelecimento de protocolos bem definidos de criopreservação baseia-se no fato de que podem ser criados bancos de células-tronco mesenquimais. Pang *et al.*, 2005, citaram tal iniciativa como uma maneira de fornecer uma fonte alternativa de células para transplante celular.

2.3 APOPTOSE

O termo apoptose foi descrito na década de setenta, baseado em estudos de morte celular fisiológica. A apoptose é um programa para eliminação ou deleção de células desencadeada por sinais fisiológicos ou anormais. Foi proposto que a apoptose é programada durante o desenvolvimento celular, deduzindo que algum tipo de relógio molecular interno está envolvido no desencadeamento da morte celular, indiferentemente aos sinais adjacentes. Entretanto, estudos comprovam que há casos em que a morte celular fisiológica pode ser desencadeada por sinais externos (Guerrero e Arias, 1998).

Este processo é coordenado por um conjunto de vias bioquímicas definidas, sendo encontrada em todo ser vivo. É uma regra importante no desenvolvimento, na homeostasia e na doença. Tem sido proposto, atualmente, uma grande variedade de sinais fisiológicos ou mensageiros que estariam envolvidos em tal processo. Este mecanismo possui grande importância na embriogênese, morfogênese, renovação celular fisiológica e em processos de hiperplasia e neoplasia (Bennett *et al.*, 1995; Green, 2000).

A palavra apoptose é derivada do grego e significa cair de um lugar, desprender-se, em referência à queda das folhas das árvores, fenômeno este que acontecia no outono em resposta ao iminente ameaço do congelamento e dos danos provocados pelo inverno (Kam e Ferch, 2000).

Ao receber um estímulo, a célula entra na primeira fase da apoptose, conhecida como primeira fase ou “fase de decisão da apoptose”, a qual é o ponto de controle genético da morte celular. Esta fase é seguida da segunda etapa, ou “fase da execução”, a qual é responsável pelas características morfológicas da apoptose (Kam *et al.*, 2000).

Os eventos iniciais do processo apoptótico são irreversíveis e pertencem à “fase de execução”, como a externalização da fosfatidilserina na membrana plasmática e a fragmentação do DNA nuclear (Bacsó *et al.*, 2000).

Considera-se apoptose recente a condição na qual ocorrem mudanças morfológicas nas células. Na apoptose tardia, ou em estágios avançados, as células apresentam alterações na permeabilidade da membrana (De Boer *et al.*, 2002).

As células apoptóticas expõem a fosfatidilserina na sua membrana externa logo após o início da fase de execução da apoptose. Isso ocorre antes da formação de vesículas na estrutura da membrana plasmática e da degradação do DNA (Cornelissen *et al.*, 2002; De Boer *et al.*, 2002).

Em relação às técnicas de detecção da apoptose, o desenvolvimento da citofluorimetria, aproveitando-se das múltiplas alterações celulares observadas na apoptose, permite uma quantificação da apoptose precisa e confiável (Leucoeur *et al.*, 1997).

A avaliação da apoptose pela da microscopia, embora possua uma certa dificuldade, também é considerada um teste confiável. A possibilidade de conseguir uma imagem direta de células viáveis utilizando a microscopia é relevante sob várias condições, principalmente em estudos morfológicos. Por exemplo, a visualização direta é crucial em culturas mistas ou quando uma porcentagem muito pequena de células entra em apoptose, ou quando é importante acompanhar o curso do processo, o qual é geralmente variável, dependendo do tipo de célula e do estímulo apoptótico empregado (Gatti *et al.*, 1998).

O processo apoptótico também pode ser determinado *in vivo* utilizando-se Anexina-V marcada com radioisótopos (Blankenberg *et al.*, 1998).

Técnicas apropriadas são utilizadas para identificar e quantificar a apoptose, incluindo corantes que permitem a visualização da condensação da cromatina nuclear. Citam-se, ainda, microscopia fluorescente, métodos que evidenciam especificamente a fragmentação do DNA, eletroforese em gel de agarose e a citometria de fluxo, a qual pode mostrar-se com o ensaio mais exato na quantificação da apoptose (Kam *et al.*, 2000).

Um aspecto importante relacionado à escolha de um método de detecção de apoptose se refere à identificação das etapas iniciais deste processo. O reconhecimento destes eventos iniciais poderia melhorar a sensibilidade da detecção da apoptose em amostras biológicas, quando o processo de apoptose pode influenciar o resultado e as conseqüências de protocolos de tratamento clínico (De Boer *et al.*, 2001).

A utilização da microscopia confocal também pode ser observada em estudos de detecção da externalização da fosfatidilserina (Kahn *et al.*, 2001).

Para a detecção dos estágios finais de um processo apoptótico, é possível a utilização de um grupo especial de marcadores, como os corantes 7-amino-actinomycin D (7-AAD) e Propidium Iodide (PI), os quais são capazes de se difundir para o interior da célula, devido à permeabilidade celular aumentada (De Boer *et al.*, 2001).

Por possuir uma alta afinidade pela fosfatidilserina, as proteínas anexinas podem ser conjugadas a moléculas fluorescentes, sendo que a utilização mais difundida da anexina é em ensaios de Citometria de fluxo. As pesquisas de apoptose contribuíram grandemente para o conhecimento de suas características (Cornelissen *et al.*, 2002).

O marcador de apoptose anexina V pode ser utilizado conjugado a um corante PI (Propidium Iodide). Os resultados, obtidos por meio de experimentos com linfócitos do sangue periférico, utilizando-se citometria de fluxo, mostraram três diferentes populações de linfócitos. As células anexina negativa/PI negativo foram consideradas viáveis. Aquelas positivas para anexina, mas negativas para PI, foram

consideradas apoptóticas. Células mortas eram anexina e PI positivos. Tal associação se mostrou muito interessante, uma vez que fornece três diferentes parâmetros para avaliação do estado funcional das células (Cornelissen *et al.*, 2002)

As etapas iniciais e, freqüentemente cruciais, no mecanismo da apoptose podem ocorrer muito rápido e discretamente. A importância de um teste rápido e confiável para a detecção da apoptose impulsiona pesquisadores a encontrar um teste que poderia ser aplicado na maioria das pesquisas. Os testes disponíveis para a detecção da apoptose se concentram em três diferentes grupos: o primeiro deles é baseado na detecção de alterações ocorridas na estrutura da membrana plasmática, como a perda da assimetria, aumento da permeabilidade, formação de vesículas e ativação dos receptores de morte celular. O segundo grupo encerra testes explorando o núcleo apoptótico, como a detecção da condensação da cromatina e medida da fragmentação do DNA. O terceiro grupo compreende a determinação de moléculas específicas de apoptose, como caspases e DNAses, bem como a medição do estado funcional de algumas organelas intracelulares e estruturais, como mitocôndria e citoesqueleto. A determinação das bases genéticas do processo apoptótico, como os genes envolvidos nos processos de suicídio celular, não é rápida nem fácil de ser executada; entretanto provaram ser específicas e valiosas para a pesquisa de morte celular programada (Rudolf e Cervinka, 2002).

A anexina V, segundo relatos da literatura, tem sido altamente estudada e desenvolvida como um agente clínico diagnóstico para detectar morte celular *in vitro*, bem como *in vivo*, como na quimioterapia do câncer, rejeição de órgãos transplantados e no infarto do miocárdio (Tait *et al.*, 2004).

A proteína Anexina é largamente empregada em microscopia e Citometria de fluxo como um marcador de apoptose, devido a sua alta afinidade de ligação cálcio-dependente a cargas negativas de fosfolipídios; esta proteína se une com grande afinidade aos resíduos de fosfatidilserina que foram expostos na superfície celular logo no início do processo. Tal proteína tem sido comumente utilizada para detectar apoptose em vários modelos biológicos (Gylys *et al.*, 2004).

3 MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório Experimental de Cultivo Celular, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e no Laboratório de Imunogenética, divisão de Imunofenotipagem, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Parecer número 01/04/CEPA-PUCPR, apêndice 1).

Os trabalhos realizados com animais de experimentação foram baseados nas diretrizes do COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, incluindo a Lei 6638, de 8 de maio de 1979; Princípios Éticos na Experimentação Animal, de 1991; Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório, de 2003 e Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária de 20 de junho de 2002,

Foram utilizados dez ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), da linhagem Wistar, provenientes do Instituto Tecnológico do Paraná, TECPAR, com idade aproximada de quatro meses, e peso entre 200 e 250 gramas.

3.1 OBTENÇÃO E ISOLAMENTO CELULAR

A coleta das células-tronco da medula óssea foi realizada por meio da eutanásia dos ratos, pela utilização de dosagem letal de anestésicos (Xilasina® e Ketamina®, 148mg/Kg). As patas traseiras dos animais foram retiradas e eliminados tecidos como músculos, tendões e nervos. Os fêmures e as tíbias foram isolados, limpos e colocados sobre uma placa de Petri contendo meio IMDM® (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), suplementado com 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina® (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) e 4% de Hepes® (Sigma St. Louis, MO). A retirada da medula óssea foi realizada com uma seringa de dez mililitros e agulha 25x8 contendo meio IMDM® e Heparina® 5000UI/mL.

O isolamento das células foi realizado segundo o método descrito por Böyum, 1968. O material foi suspenso em dez mililitros meio de cultivo e, logo após, dispensado em gradiente de densidade de separação de células Ficoll-Hypaque® ((Sigma, St. Louis, MO, $d=1,077 \text{ g/cm}^3$). Após centrifugação, retirou-se o anel de células, o qual estava visível devido à propriedade do Ficoll-Hypaque® em separar as células mononucleares.

As células foram purificadas por duas lavagens com meio IMDM, para retirar potenciais interferentes e ressuspensas em meio de cultivo contendo Soro Bovino Fetal; procedeu-se à contagem em Câmara de Neubauer® (Heinz Herenz Medizinalbedarf, Hamburg, Germany) e aos cálculos a fim de que as células estivessem na concentração da ordem de 10^6 células por mL.

3.2 CULTIVO CELULAR

A coleta de material da medula óssea de ratos fornece células mononucleares e, dentre elas, células das linhagens hematopoiética, progenitora endotelial e mesenquimal. As células-tronco mesenquimais em cultivo têm grande capacidade de aderência à superfície de crescimento do frasco de cultivo; sendo assim, as células das linhagens hematopoiética e progenitora, que não interessavam a este estudo, foram descartadas por aspiração do sobrenadante do frasco de cultivo.

As células foram cultivadas em frascos de 75cm^2 , durante 14 dias, a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 . A manutenção do cultivo, que compreende a troca do meio IMDM, foi realizada uma vez por semana.

O meio IMDM foi suplementado com 20% de Soro Bovino Fetal® (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) e 10 nanogramas de IGF-I® (*Insulin Growth Factor I*, Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY).

3.3 DISSOCIAÇÃO ENZIMÁTICA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

A dissociação enzimática, também conhecida por “tripsinização”, tem por objetivo recuperar as células que estavam aderidas às paredes de crescimento do frasco de cultivo. A técnica consiste na utilização de uma enzima chamada tripsina[®] (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), a qual lisa o citoesqueleto celular que fornece sustentação às células para se aderirem às paredes do frasco.

Os frascos de cultivo foram lavados duas vezes com PBS[®] (*Phosphate Buffered Saline*, Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), posteriormente adicionada tripsina e incubados durante dois minutos na estufa de CO₂ a 37°C. Os frascos foram agitados vigorosamente para retirar as células da superfície de crescimento. Foi adicionado meio IMDM[®] suplementado com 20% de Soro Bovino Fetal[®] para bloquear o prolongamento da ação da tripsina. Com uma pipeta graduada, as paredes dos frascos foram jateadas para auxiliar na dissociação das células. As células foram recuperadas em um tubo de ensaio e centrifugadas; o sobrenadante foi descartado e o botão de células recolhido.

A identificação das células mesenquimais foi realizada com a utilização de um anticorpo conjugado a uma molécula fluorescente, Vimentina[®] (Peroxidase-Sigma, IMM-10 – Vimentin S-20 Santa Cruz Biotechnology, FITC, California, US), o qual identifica células de origem mesenquimal.

3.4 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

3.4.1 Método Azul de Trypan

A viabilidade celular foi determinada pelo método Azul de Trypan[®] (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), composto de um corante, o qual penetra no interior de células que perderam a integridade da membrana plasmática. Foram coletados dez microlitros da suspensão das células e, juntamente com dez microlitros do corante Azul de Trypan, esta solução foi dispensada na Câmara de Neubauer[®]. No quadrante central foi realizada a contagem das células coradas e das células não-coradas em azul.

O cálculo foi baseado no percentual da divisão das células não coradas (vivas) pelo número total de células contadas (células coradas e não-coradas).

3.4.2 Método da Citometria de fluxo

Inicialmente as células foram avaliadas para o estágio de apoptose; o reagente utilizado, Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I[®] (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), é composto da proteína Anexina conjugada a um fluorocromo Phycoerythrin (PE) e do corante intracitoplasmático 7-AAD, permitindo a identificação das células nos estágios: apoptose recente (Anexina positiva e 7-AAD negativo), células não viáveis (Anexina positiva e 7-AAD positivo) e células viáveis.

A quantidade de células não viáveis foi calculada por meio da marcação positiva simultânea dos marcadores Anexina e 7-AAD. A porcentagem de células viáveis foi calculada em função da quantidade do número de células não viáveis, subtraída de um valor absoluto, 100.

As células foram lavadas com PBS[®] e ressuspensas em tampão diluído (Annexin V Binding Buffer[®]) na concentração de 1×10^6 células/mL. Foram transferidos 100 μ l desta solução para um tubo de ensaio. Os reagentes foram adicionados (5 μ l de Annexin V-PE[®] e 5 μ l de 7-AAD[®]), agitados e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente (25°C), na ausência de luz; foram adicionados 400 μ l de tampão diluído (Annexin V Binding Buffer[®]) e posteriormente procedeu-se à análise no Citômetro de fluxo (FACS Calibur, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) dentro do período de uma hora.

3.5 CONGELAMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

3.5.1 Estabelecimento do número de células

O número de células estabelecido para o congelamento foi da ordem de 10^6 células por mL.

3.5.2 Técnica de congelamento

O congelamento foi realizado de acordo com técnicas já descritas na literatura, utilizando-se como agente crioprotetor o DMSO (Dimetil Sulfoxido, Sigma, St. Louis, MO). Foi preparada uma cuba com gelo em escamas para o material permanecer em baixas temperaturas antes do uso (tubos de ensaio de 15 e 50mL e tubos criogênicos). Os tubos criogênicos foram identificados com os dados: tipo de célula, concentração e data. O material foi centrifugado a 1500rpm durante dez minutos. O sobrenadante foi descartado e o botão de células foi ressuspensionado em meio IMDM suplementado com 20% de Soro Bovino Fetal. A solução de congelamento foi preparada com 20% de agente crioprotetor DMSO em meio IMDM. A concentração final da amostra para o congelamento e seu armazenamento foi de uma parte do meio de cultura contendo as células para uma parte da solução de congelamento. A solução de congelamento foi dispensada num tubo contendo o meio de cultura com as células e homogenizada constantemente com uma pipeta Pasteur. Foi distribuído um mililitro nos tubos criogênicos. O congelamento das células foi realizado em um congelador automático (Nicoool 10, Air Liquide®), com decaimento gradual de temperatura, durante 70 minutos, passando da temperatura 4°C para temperaturas negativas, da ordem de -90°C. Após o término do congelamento, as amostras foram armazenadas em reservatório de Nitrogênio líquido.

3.5.3 Armazenamento das células-tronco mesenquimais criopreservadas

As células congeladas foram armazenadas em reservatório de Nitrogênio líquido na temperatura de -196 °C, onde permaneceram durante 30 dias. A posição

de armazenamento das ampolas congeladas foi anotada em uma planilha de controle de amostras congeladas, para facilitar sua localização.

3.6 DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Foi preparado meio IMDM, aquecido a 37°C, contendo 15% de SBF. Os tubos criogênicos foram retirados do reservatório de nitrogênio líquido e aquecidos imediatamente em banho-maria a 37°C. Na iminência de descongelamento, o material foi transferido para um tubo de ensaio contendo o meio já aquecido. O material foi centrifugado a 1500 rpm, durante dez minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi reconstituído com um mililitro de meio IMDM, e a viabilidade foi novamente analisada.

3.7 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

Foram realizadas novamente as análises de viabilidade celular.

3.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

A morfologia das células-tronco mesenquimais em cultivo pode ser observada na figura 1:

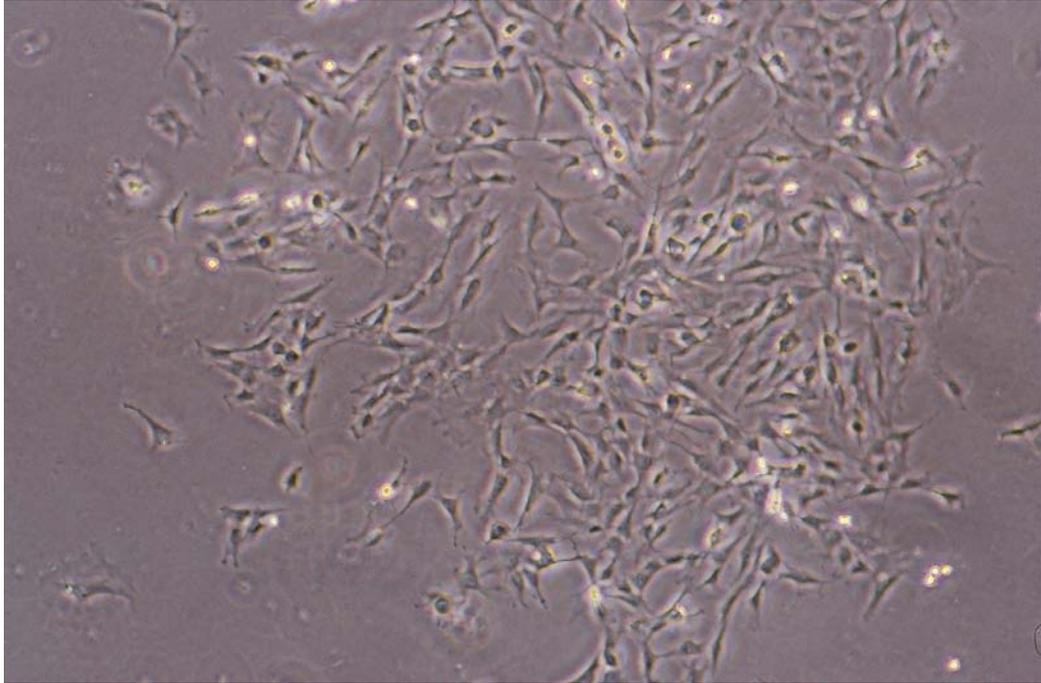


Figura 1: Cultivo das células-tronco mesenquimais (Aumento 200 vezes, MO de Inversão).

3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

A marcação com o anticorpo anti-vimentina pode ser observada na figura 2:

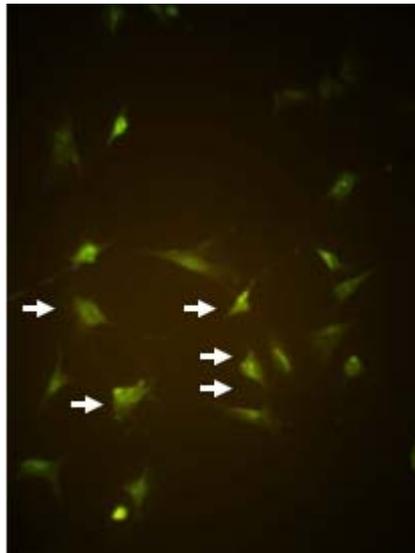


Figura 2: Cultivo de células-tronco mesenquimais (flechas) identificadas pelo anticorpo anti-vimentina (Imunofluorescência, aumento de 200 vezes, MO de Fluorescência).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no estudo foram expressos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para as comparações entre os momentos pré e pós-congelamento e para a comparação da viabilidade pelos dois métodos, foi usado o teste t de Student para amostras pareadas, bilateral. A condição de normalidade das diferenças foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

Para cada uma das variáveis, testou-se a hipótese nula de que a média no momento pré-congelamento é igual à média no momento pós-congelamento, versus a hipótese alternativa de médias diferentes.

4 RESULTADOS

Na tabela 1 observam-se os valores obtidos pelo método Azul de Trypan.

Tabela 1: Valores das médias, medianas, valores mínimo e máximo, desvio padrão e valor de p identificados pelo método de determinação da viabilidade celular Azul de Trypan.

Variável	Momento	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Viabilidade Azul de Trypan %	Pré	94,76	95,4	90,9	97	1,92	0,0059
	Pós	90,58	91,12	83,33	93,33	2,96	
	<i>Pós-pré</i>	-4,19	-2,84	-13,67	-0,66	3,7	

(*) Teste t de Student para amostras pareadas

Para cada momento de avaliação pré e pós-congelamento e, também, para a diferença pós-pré, testou-se a hipótese nula de que o percentual médio de viabilidade pelo método Azul de Trypan é igual ao percentual médio de viabilidade pelo método da citometria.

Na Figura 3 observa-se a viabilidade celular identificada pelo método Azul de Trypan, nos períodos pré e pós-congelamento.

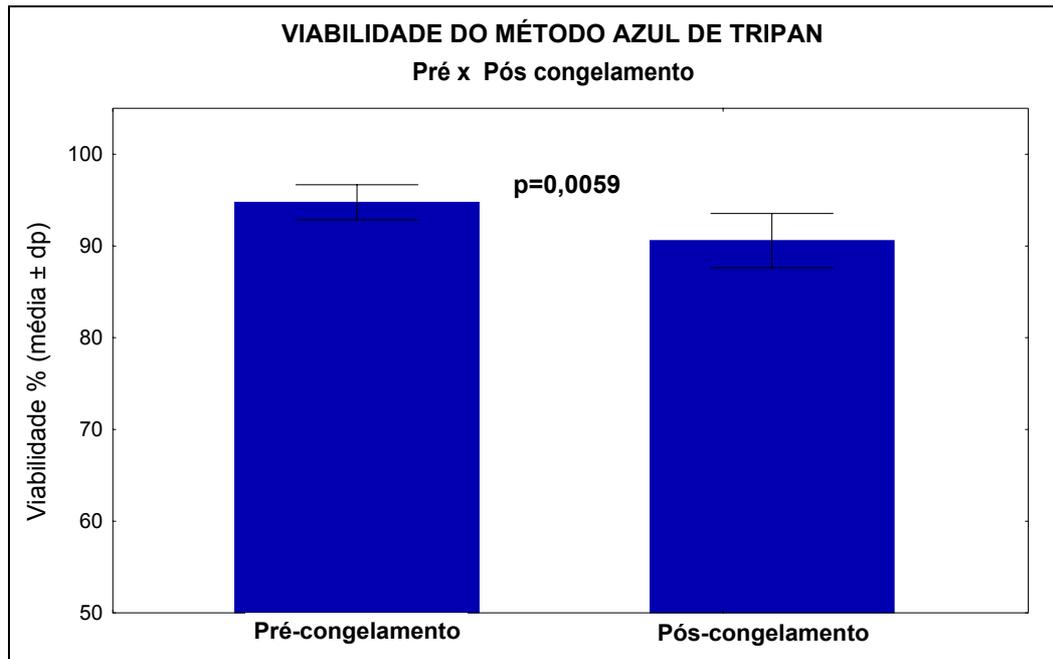


Figura 3 - Viabilidade pré e pós-congelamento pelo método Azul de Trypan.

5.3.2 Método Citometria de fluxo

5.3.2.1 Marcadores de Mortalidade Celular

Os marcadores 7-AAD e Anexina são integrantes do método da Citometria de fluxo, e foram utilizados para avaliar a apoptose e a integridade da membrana plasmática.

Na tabela 2 são observados valores dos marcadores de mortalidade celular Anexina e 7-AAD.

Tabela 2: Valores das médias, medianas, valores mínimo e máximo, desvios padrões e valores de p identificados pelos marcadores 7-AAD e Anexina.

Variável	Momento	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
% cél. 7-AAD +	Pré	16,79	15,60	11,42	26,70	5,07	0,1372
	Pós	20,64	19,99	7,44	41,17	10,81	
	Pós-pré	3,85	2,78	-6,74	16,86	7,47	
% cél. Anexina +	Pré	15,02	13,23	9,30	24,30	5,14	0,0048
	Pós	31,21	27,78	22,83	60,13	10,72	
	Pós-pré	16,18	16,08	2,37	49,63	13,75	

(*) Teste t de Student para amostras pareadas

Na figura 4 observa-se a positividade identificada pelos marcadores 7-AAD e Anexina nos períodos pré e pós-congelamento.

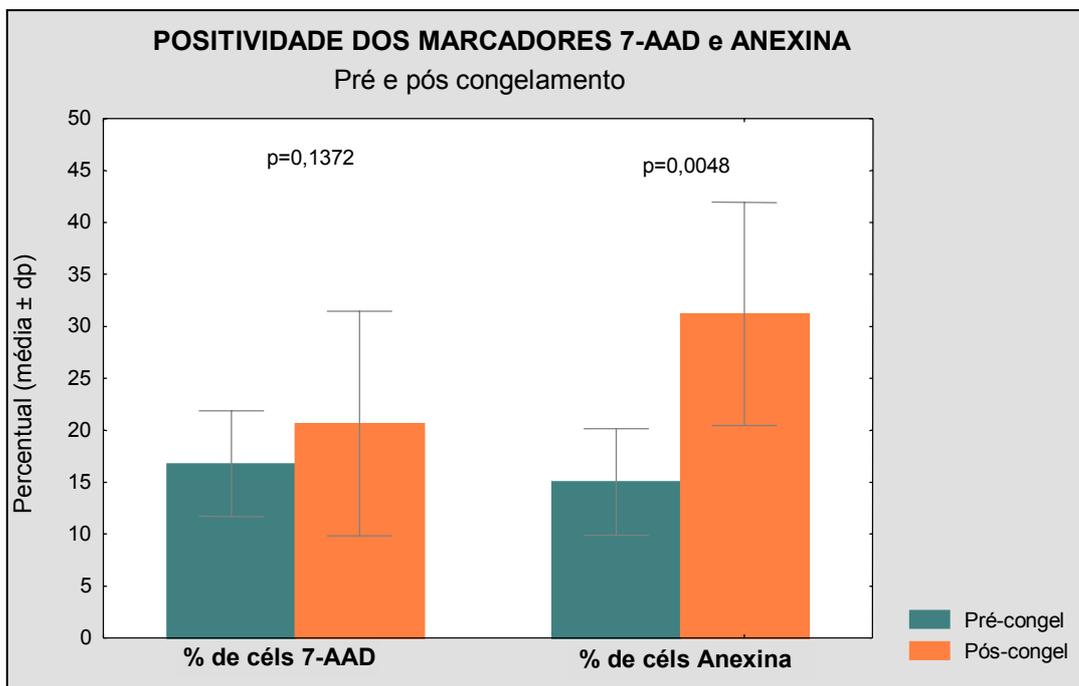


Figura 4 - Positividade identificada pelos marcadores 7-AAD e Anexina nos períodos pré e pós-congelamento.

Os valores do parâmetro morte celular foram obtidos, como pode ser observado no Anexo 1, da positividade simultânea dos marcadores 7-AAD e Anexina.

Na tabela 3 observam-se valores da morte celular.

Tabela 3: Valores das médias, medianas, valores mínimo e máximo, desvio padrão e valor de p identificados pelo parâmetro morte celular.

Variável	Momento	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Morte Celular %	Pré	14,48	12,17	8,20	23,78	5,90	0,0009
	Pós	33,75	30,27	26,18	55,14	8,69	
	Pós-pré	19,27	18,90	2,40	45,90	12,64	

(*) Teste t de Student para amostras pareadas

Na figura 5 observam-se valores de morte celular.

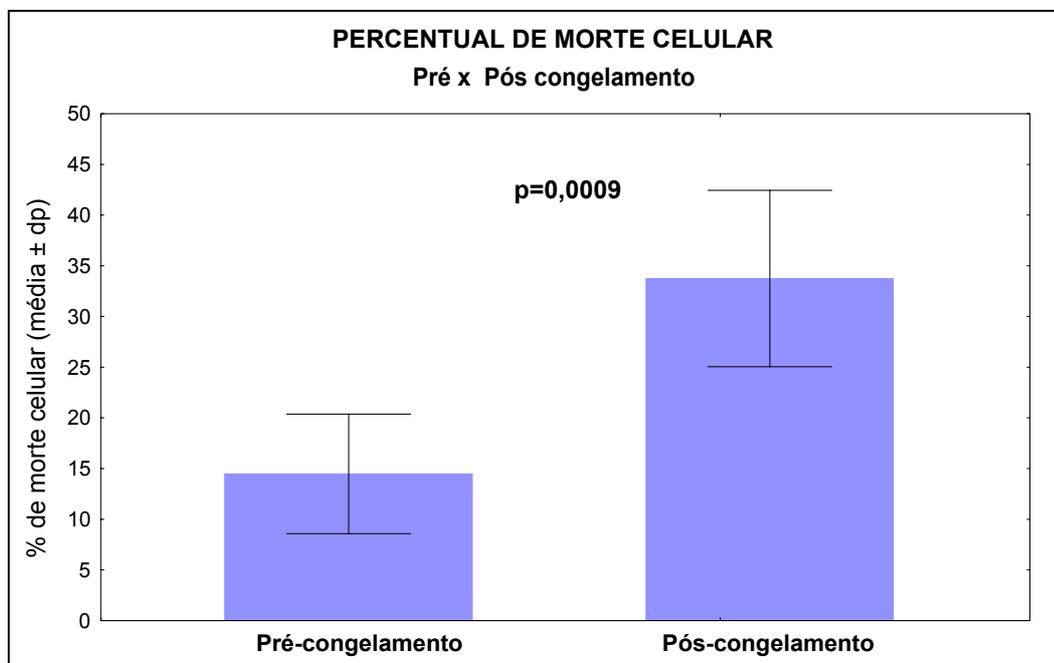


Figura 5 - Valores de morte celular identificados pelos marcadores

5.3.2.2 Valores de viabilidade do método Citometria de fluxo

Para cada uma das variáveis, testou-se a hipótese nula de que a média no momento pré-congelamento é igual à média no momento pós-congelamento, versus a hipótese alternativa de médias diferentes.

Na tabela 4 observam-se valores de médias, medianas, valores mínimos, valores máximos, desvios padrões e valor de p da viabilidade pelo método Citometria de fluxo.

Tabela 4: Valores das médias, medianas, valores mínimo e máximo, desvio padrão e valor de p identificados pelo método de determinação da viabilidade celular Citometria de fluxo.

Variável	Momento	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Viabilidade Citometria %	Pré	85,52	87,83	76,22	91,8	5,9	0,0009
	Pós	66,25	69,74	44,86	73,82	8,69	
	Pós-pré	-19,27	-18,9	-45,9	-2,4	12,64	

(*) Teste t de Student para amostras pareadas

Na figura 6 observam-se valores de viabilidade celular identificados pelo método Citometria de fluxo.

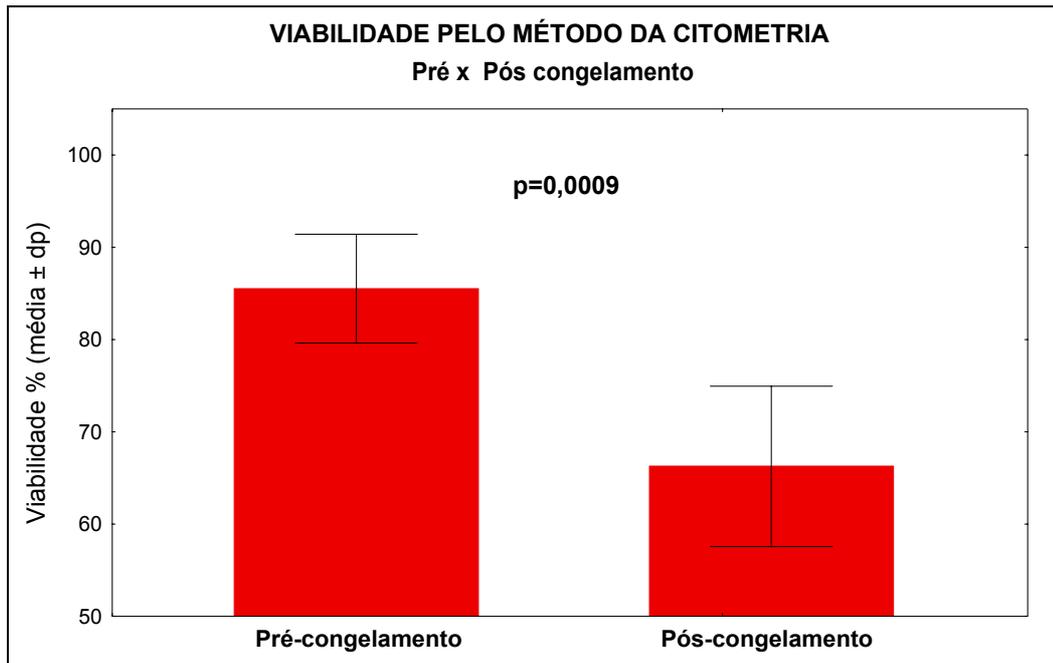


Figura 6 - Viabilidade pré e pós-congelamento pelo método Citometria de fluxo

5.3.3 Comparação dos métodos de determinação da viabilidade celular: Azul de Trypan e Citometria de fluxo.

Na tabela 5 são apresentados os valores de médias, medianas, valores mínimos, valores máximos, desvios padrões e valores de p dos testes estatísticos da comparação dos métodos de determinação da viabilidade celular.

Tabela 5: Valores de médias, medianas, valores mínimos, valores máximos, desvios padrões e valores de p da comparação dos métodos de determinação da viabilidade celular.

Variável	Momento	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Viabilidade Azul de Trypan%	Pré	94,76	95,40	90,90	97,00	1,92	0,0017
Viabilidade Citometria%		85,52	87,83	76,22	91,80	5,90	
Viabilidade Azul de Trypan%	Pós	90,58	91,12	83,33	93,33	2,96	<0,0001
Viabilidade Citometria%		66,25	69,74	44,86	73,82	8,69	
Viabilidade Azul de Trypan%	Pós-pré	-4,19	-2,84	-13,67	-,66	3,70	0,0070
Viabilidade Citometria%		-19,27	-18,90	-45,90	-2,40	12,64	

(*) Teste t de Student para amostras pareadas

Na figura 7, observa-se a comparação dos valores de viabilidade celular identificados pelos métodos Azul de Trypan e Citometria de fluxo, no período pré-congelamento.

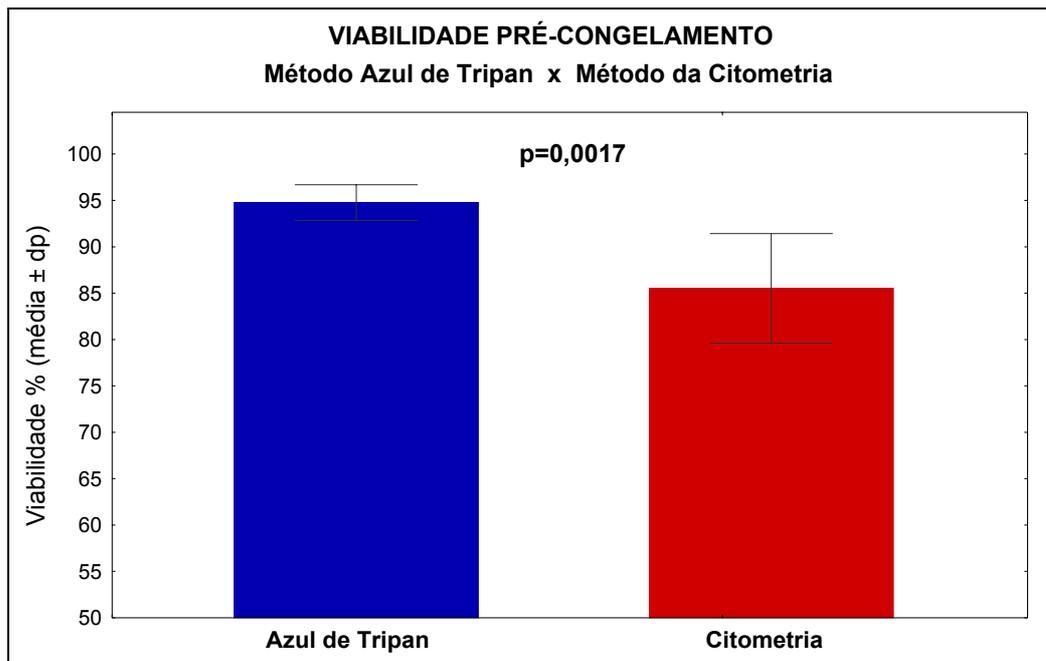


Figura 7 - Comparação da viabilidade celular dos métodos Azul de Trypan e Citometria de fluxo, no período pré-congelamento.

Na figura 8 observa-se a comparação dos valores de viabilidade celular fornecidos pelos métodos Azul de Trypan e Citometria de fluxo, no período pós-congelamento.

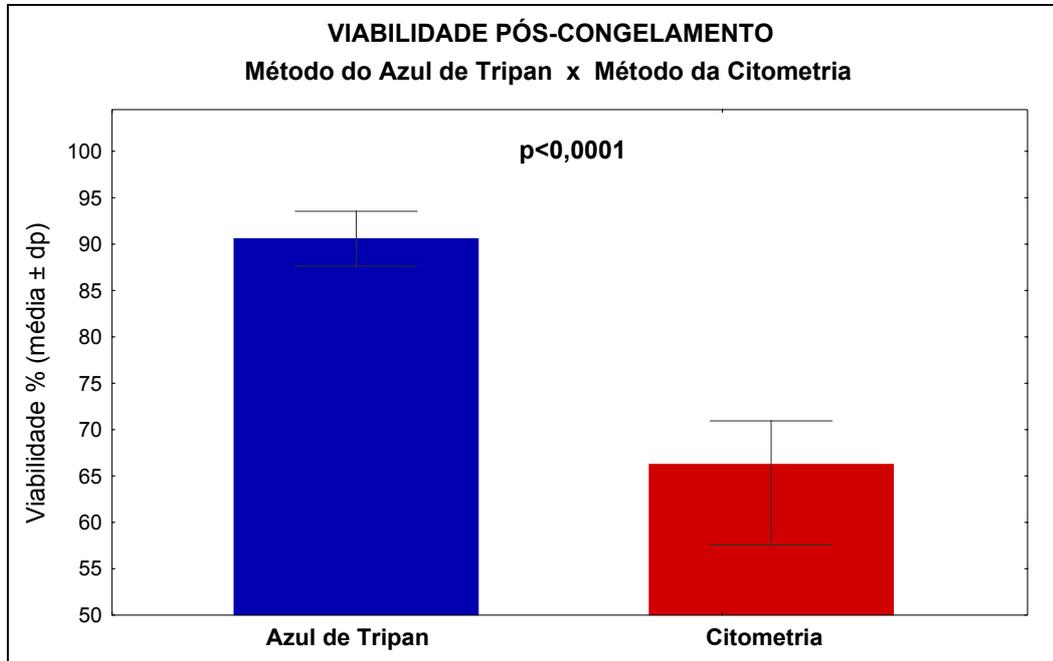


Figura 8 - Comparação da viabilidade celular dos métodos Azul de Trypan e Citometria de fluxo, no período pós-congelamento.

Na figura 9 observa-se a diferença percentual dos valores de viabilidade celular fornecida pelos métodos Azul de Trypan e Citometria de fluxo, nos dois períodos analisados.

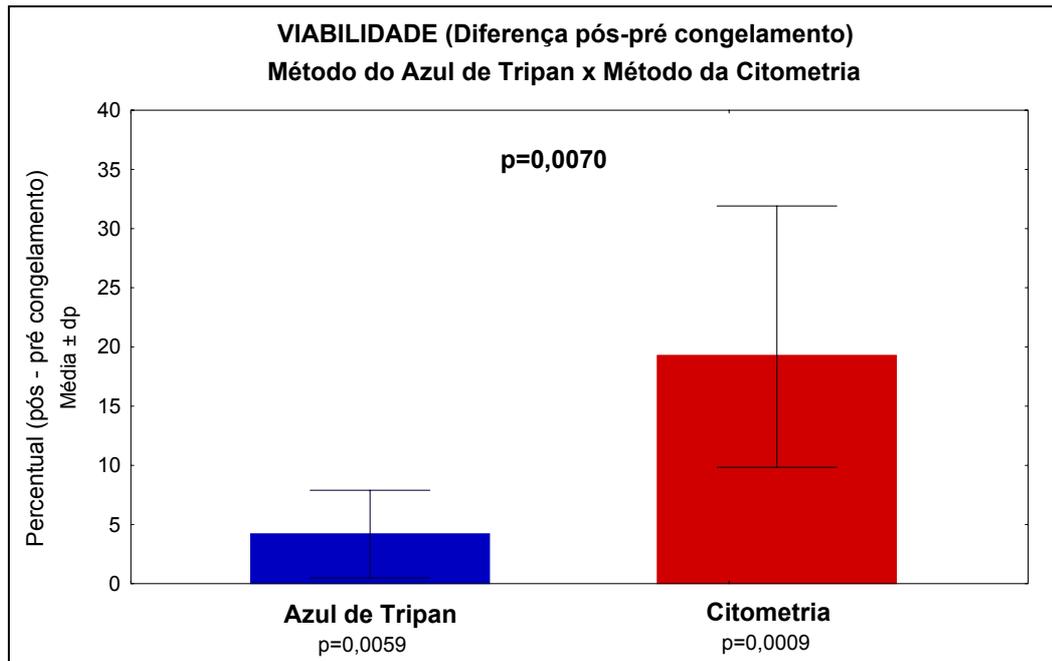


Figura 9 - Percentual da diferença de valores de viabilidade celular dos métodos Azul de Trypan e Citometria de fluxo nos dois períodos analisados.

5.3.4 Comparação dos marcadores Anexina e 7-AAD.

Na tabela 6 observam-se valores da comparação dos marcadores 7-AAD e Anexina.

Tabela 6: Valores de médias, medianas, valores mínimos, valores máximos, desvios padrões e valores de p da comparação dos marcadores 7-AAD e Anexina.

Variável	Momento	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
7ADD %	Pré	16,79	15,60	11,42	26,70	5,07	0,2287
Anexina %		15,02	13,23	9,30	24,30	5,14	
7ADD %	Pós	20,64	19,99	7,44	41,17	10,81	0,0792
Anexina %		31,21	27,78	22,83	60,13	10,72	
7ADD %	Pós-pré	3,85	2,78	-6,74	16,86	7,47	0,0521
Anexina %		16,18	16,08	2,37	49,63	13,75	

(*) Teste t de Student para amostras pareadas

Na figura 10 observa-se a positividade fornecida pelos marcadores 7-AAD e Anexina no período pré-congelamento.

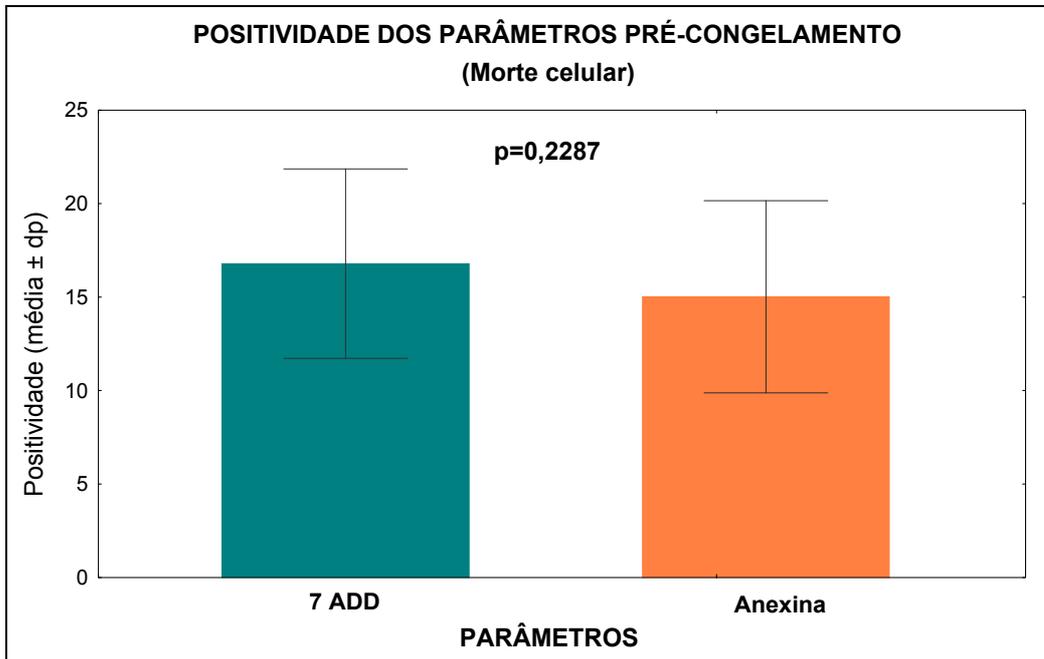


Figura 10 - Positividade identificada pelos marcadores 7-AAD e Anexina no período pré-congelamento.

Na figura 11 observa-se a positividade identificada pelos marcadores 7-AAD e Anexina no período pós-congelamento.

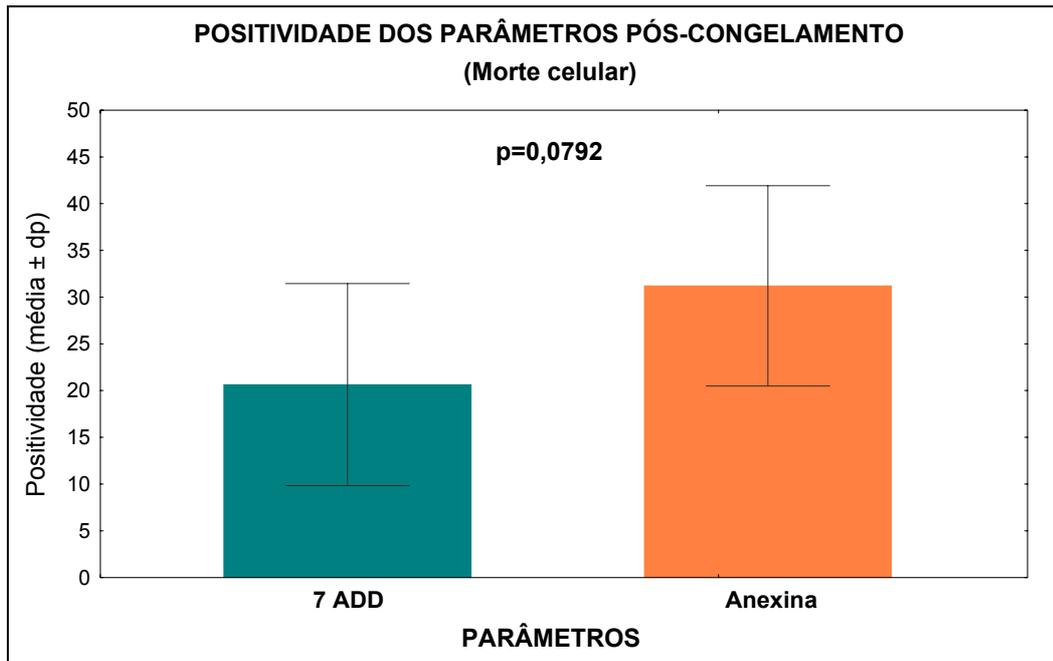


Figura 11 - Positividade identificada pelos marcadores 7-AAD e Annexina no período pós-congelamento.

Na figura 12 observa-se a diferença de positividade entre os marcadores 7-AAD e Anexina.

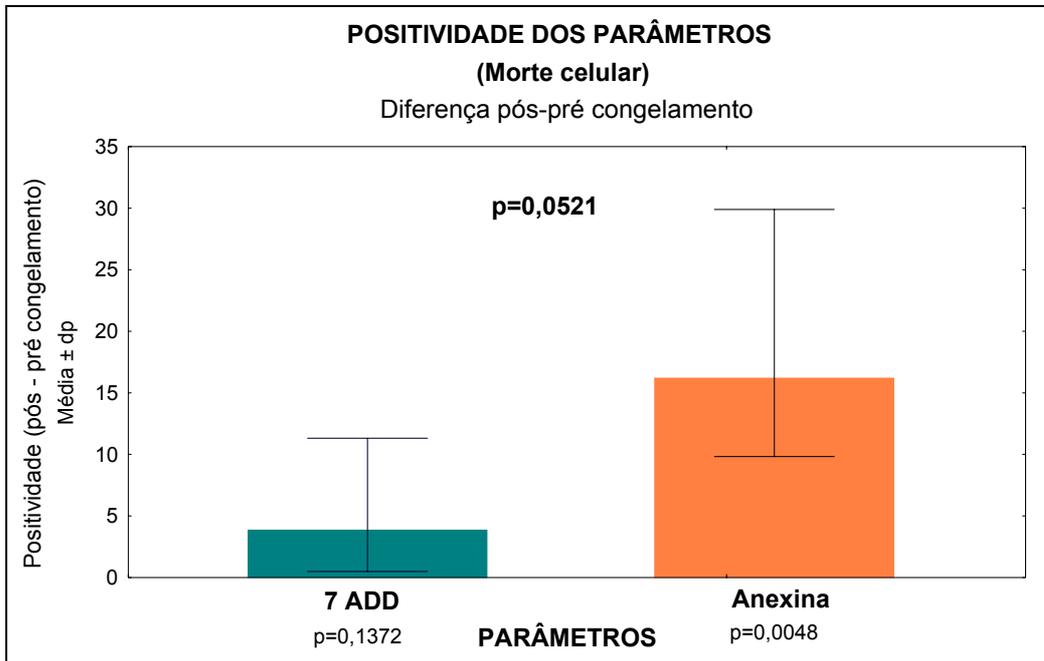


Figura 12 - Diferença de positividade identificada entre os marcadores 7-AAD e Anexina

5 DISCUSSÃO

As células da medula óssea estão sendo utilizadas na terapêutica para o tratamento de várias doenças. O seu potencial de diferenciação em tipos celulares específicos impulsiona pesquisadores para a busca de fontes alternativas de tratamento, como sugeriram Kocher *et al.*, 2001, destacando o uso de células da medula óssea para aumentar a angiogênese na área do infarto do miocárdio. Prockop *et al.*, 2003, discutiram a importância das células-tronco mesenquimais na reparação tecidual; Jing *et al.*, 2005, sugeriram que as células-tronco mesenquimais têm potencial para se diferenciar em cardiomiócitos, e que o ambiente em que as células são transplantadas pode fornecer a elas moléculas nutrientes específicas.

As células-tronco mesenquimais transplantadas desenvolvem uma série de mecanismos que as permitem escapar da resposta imune do hospedeiro, como, dentre outros, a baixa expressão de antígenos de superfície e a modulação da resposta imune do hospedeiro relacionada às células T (Barry *et al.*, 2005).

Em muitos casos, o maior interesse desta terapia é a utilização de células do próprio paciente, o chamado transplante autólogo, evitando processos de rejeição e, desta forma, a utilização de drogas imunossupressoras.

A área da cardiologia é privilegiada com os estudos referentes às células-tronco mesenquimais. A utilização de células *in natura* da medula óssea é muito evidenciada em doenças cardiovasculares, como sugerido por Jing *et al.*, 2005.

A quantidade de células-tronco encontradas na medula óssea, segundo Strauer e Kornowisk, 2003, é de aproximadamente 0,05%. Para tanto, são necessárias alternativas para aumentar o número de células disponíveis para transplante. A expansão em cultivo celular foi sugerida como uma destas alternativas (Cottler-Fox *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004)

Pouzet *et al.*, 2000, relataram que o cultivo celular pode fornecer números substanciais de células para transplante, sendo que para cada tipo de transplante há um número estabelecido de células a serem transplantadas. De acordo com a idéia abordada, procurou-se relacionar o excesso do número de células, as quais não

seriam utilizadas para transplante, com procedimentos de armazenamento para utilização em períodos posteriores.

A criopreservação de amostras biológicas tem grande importância na prática clínica; este método permite a preservação de células vivas e tecidos funcionais para pesquisas científicas ou aplicações médicas e industriais (Gao e Critser, 2000). O objetivo deste método é disponibilizar a utilização de células de imediato. Células em cultivo podem ser criopreservadas em estágios específicos de diferenciação ou proliferação (Kuo *et al.*, 1993).

No processo de criopreservação, busca-se a maior taxa de viabilidade celular. No entanto, isso nem sempre é possível, visto que o processo de criopreservação é, por si próprio, letal para as amostras biológicas.

A formação de cristais de gelo no interior da célula provoca danos à estrutura celular, conduzindo, desta maneira, à diminuição da viabilidade celular. Entretanto, há possibilidade de utilização de substâncias cujo objetivo é evitar ao máximo a perda da viabilidade celular, como a utilização de agentes crioprotetores (Massumoto *et al.*, 1997).

Os valores obtidos neste estudo possibilitaram a análise dos efeitos deletérios que um processo de congelamento pode produzir em amostras biológicas, avaliando-se a viabilidade celular por meio de dois diferentes métodos propostos.

A importância da verificação da viabilidade celular em diferentes períodos do experimento se dá pelo fato de que as amostras biológicas sofrem danos de diferentes intensidades em condições variadas de estresses físicos e químicos.

Foi necessária a determinação dos parâmetros antes e após a criopreservação para verificar a possível perda de viabilidade induzida por condições artificiais de crescimento, como o cultivo celular. Os dados obtidos sugerem que, por mais que as condições de cultivo simulem o ambiente de crescimento e desenvolvimento celular, fatores exógenos podem prevalecer sobre as condições e suplementos fornecidos às células, o que pode ser observado com a diminuição da viabilidade celular.

As variáveis do estudo foram testadas por meio de duas hipóteses, sendo que a na primeira considerou-se hipótese nula, onde os valores das variáveis antes da

criopreservação e após este processo eram iguais. A segunda hipótese baseou-se na diferença entre os valores das amostras antes e após a criopreservação.

O primeiro método utilizado, Azul de Trypan, é composto de um corante que avalia células que perderam a integridade da membrana celular. É largamente empregado na prática laboratorial por ser rápido, simples e acessível, apesar de produzir artefatos que podem interferir na análise da viabilidade. Os valores de viabilidade obtidos por este método, anteriormente à etapa de criopreservação, foram em média de 94,76%. Após esta etapa, os valores obtidos foram, em média, de 90,58%. Infere-se, deste modo, morte celular de significância estatística.

O teste Azul de Trypan mostra-se aceitável para a determinação da integridade da membrana plasmática antes do transplante celular (De Boer *et al.*, 2002). Contudo, a verificação da viabilidade celular por este método não leva em consideração a presença do fenômeno da apoptose.

Os dados obtidos neste estudo estão próximos aos achados de Chauffaille *et al.*, 2003, que, em seus experimentos com células da medula óssea criopreservadas, mostraram que a viabilidade fornecida pelo método Azul de Trypan, antes e após a preservação a uma temperatura de -80°C foi, em média, 98,8% e 78,5%, respectivamente. Kudo *et al.*, 2005, mostraram que, em um experimento de criopreservação de células progenitoras do sangue periférico, os resultados forneceram uma viabilidade média de 98,4 % antes da criopreservação e de 90,0 % após este processo, utilizando o método Azul de Trypan.

Entretanto, Bustamente *et al.*, 1998, afirmaram que a viabilidade analisada pelo método do Azul de Trypan, em um tipo celular específico como os cardiomiócitos, não reflete condições fisiológicas normais de integridade das células. Desta forma, sugere-se a utilização de testes adicionais de investigação e verificação da funcionalidade das células.

A integridade da membrana plasmática também pode ser determinada por meio de marcadores de apoptose.

A proteína Anexina, a qual possui afinidade para fosfolipídios expostos na superfície da membrana plasmática, avalia estágios de apoptose. A anexina pode ser utilizada para a detecção da perda de viabilidade celular *in vitro* (Tait *et al.*, 2004).

Neste estudo, na etapa anterior à criopreservação, a positividade para o marcador Anexina foi em média de 15,02%. Após este processo, a positividade encontrada foi em média de 31,21%. Sugere-se, desta forma, um aumento significativo da apoptose nas células-tronco mesenquimais, pois a membrana plasmática é a estrutura mais lesada neste processo, por estar em contato com as soluções cristalizadas que formaram gelo no interior da célula, bem como nas soluções extracelulares.

A positividade do marcador 7-AAD, o qual é um corante que penetra no interior da célula, atingindo o DNA nuclear, mostrou-se praticamente estável antes e após a etapa de criopreservação, não sendo encontrada significância estatística. Os valores anteriores à criopreservação foram em média de 16,79%. Após este processo, os valores encontrados foram de 20,64%, em média. De posse destes dados, infere-se que as células, apesar de terem sofrido um processo de criopreservação e posterior descongelamento, produziram baixa alteração da permeabilidade celular, sem significância estatística.

De Boer *et al.*, 2002, afirmaram que o corante 7-AAD possui as mesmas propriedades que o corante Azul de Trypan. Isso nos leva a sugerir que o corante em questão, 7-AAD, também é suscetível de produzir artefatos em sua análise, interferindo na veracidade e na qualidade desta determinação. Entretanto, Höppner *et al.*, 2002, afirmaram que o corante 7-AAD possui a propriedade de penetrar rapidamente no interior celular, unindo-se com uma afinidade muito alta ao DNA nuclear. Embora tais afirmações sejam largamente difundidas no meio científico, tal fenômeno não foi observado nas células-tronco mesenquimais coletadas da medula óssea de ratos Wistar.

Neste estudo, os valores de positividade do marcador Anexina foram maiores que aqueles fornecidos pelo corante 7-AAD. Corroborando os achados deste estudo, Kam *et al.*, 2000, afirmaram que, em um processo apoptótico, os corantes supravitais são capturados apenas no final deste processo. Sugere-se tal afirmativa como uma justificativa para a diferença encontrada nos marcadores.

O estudo mostrou evidências de que, se comparados entre si nos momentos pré e pós-criopreservação, os marcadores que fazem parte do método Citometria de

fluxo não mostraram diferença estatística significativa. Porém, é possível sugerir que há uma tendência de o marcador de apoptose Anexina ser mais sensível que o marcador 7-AAD.

Humpe *et al.*, 2005, sugeriram que o método Citometria de fluxo, utilizando o corante 7-AAD para a determinação da viabilidade celular, forneceu dados de diferença significativa se comparado com o método da determinação da viabilidade utilizando o corante Azul de Trypan. Por meio do método Azul de Trypan, os resultados da viabilidade celular fornecidos foram de diferença significativa se comparados com o método da Citometria de fluxo.

Os valores indicativos de morte celular pelo método da Citometria de fluxo são derivados da marcação comum dos marcadores 7-AAD e Anexina. O intuito deste parâmetro é identificar o percentual de células que estão realmente mortas, ou seja, aquelas células que, além de expor o fosfolipídio fosfatidilserina, translocando-o do interior para o exterior celular, também já produziram poros na estrutura da membrana plasmática.

Os valores de morte celular no momento pré-criopreservação foram em média de 14,48%. Após este processo, os valores foram em média de 33,75%. Foram encontrados valores de morte celular significativos na criopreservação das células-tronco mesenquimais. Da mesma forma, Humpe *et al.*, 2005, afirmaram que a criopreservação e o descongelamento de células podem resultar em morte celular de valores significativos, assim como em processos de apoptose.

Neste estudo, os valores de viabilidade celular obtidos pelo método Citometria de fluxo, na etapa pré-criopreservação, foram em média de 85,52%. Após este processo, os valores encontrados foram em média de 66,25%. Foram encontrados valores de significância estatística.

A determinação da viabilidade celular pelo método da Citometria de fluxo fornece valores próximos da real situação de integridade da membrana plasmática, por combinar marcadores que avaliam apoptose e porosidade celular.

Para a comparação dos testes de viabilidade pelo método do Azul de Trypan e pelo método da Citometria de fluxo, no período pré-congelamento, foi possível observar,

com o respaldo dos testes estatísticos, uma diferença significativa entre tais métodos.

De posse destas informações, sugere-se que os métodos Azul de Trypan e Citometria de fluxo possuem diferenças significativas quanto ao grau de sensibilidade.

O mesmo acontece na comparação dos dois métodos no período pós-congelamento, no qual também foram encontradas diferenças significativas.

Os achados deste estudo sugerem que o método da Citometria de fluxo possui maior sensibilidade para a determinação da viabilidade celular. Humpe *et al.*, 2005 afirmaram que este método é objetivo, fornecendo dados claros e de fácil interpretação. Os autores enfatizaram ainda que, em face dos diferentes métodos de avaliação da viabilidade celular atualmente disponíveis, seria necessária uma padronização das técnicas. Além disso, sugeriram que padrões interlaboratoriais de análises de células criopreservadas deveriam ser implementados para melhorar o controle de qualidade das amostras.

Divergindo dos resultados encontrados neste estudo, Kim *et al.*, 2002, realizaram um experimento com células hematopoiéticas CD34⁺, obtidas de cordão umbilical. A viabilidade durante o período de cultivo celular foi determinada pelo método do Azul de Trypan e pela Citometria de fluxo, por meio da combinação da molécula anexina V e do corante 7-AAD. Os resultados indicaram que a viabilidade foi de 88±6% pelo método de Azul de Trypan, e 95±2% por Citometria de fluxo, sugerindo uma maior sensibilidade do primeiro método.

Os valores obtidos por este estudo, tanto na etapa pré criopreservação quanto na etapa pós-criopreservação, foram superiores na determinação da viabilidade celular, quando utilizado o método Azul de Trypan, ao método da Citometria de fluxo. Disso se depreende que o método pela Citometria de fluxo fornece valores que refletem o real estado de integridade celular, os quais são produzidos pela combinação dos dois diferentes parâmetros. O método Azul de Trypan apresenta artefatos em sua determinação; os valores por ele fornecidos podem não refletir o real estado de integridade celular. Na determinação da viabilidade celular por este método, o corante pode, inclusive, mascarar a positividade das células, uma vez que tal

corante é capaz de corar também estruturas que não sejam células, mas fragmentos de morfologia semelhante às células.

A importância da etapa de cultivo celular relaciona-se à obtenção de uma maior quantidade de células. O período de cultivo das células-tronco mesenquimais estabelecido neste estudo foi de duas semanas. Experimentos foram realizados nos quais células-tronco obtidas do cordão umbilical foram cultivadas em um período que variou de três a cinco semanas, sendo observadas características morfológicas semelhantes a fibroblastos, peculiares a este tipo celular (Lee *et al.*, 2005). O período estabelecido neste estudo foi devido a fatores externos, alheios ao bom andamento do experimento, durante o qual foram observadas contaminações nos frascos de cultivo. Em duas semanas foi possível observar o crescimento das células em cultivo, bem como as características morfológicas semelhantes a fibroblastos.

A obtenção das células da medula óssea pode ser realizada por meio de punção aspirativa ou eutanásia dos animais; em relação ao tempo decorrido entre a coleta das células da medula óssea e o início da técnica de separação celular, pode ter ocorrido uma possível diminuição da viabilidade celular, uma vez que as células, apesar de estarem em contato com o meio de cultivo, estão privadas de aporte de oxigênio e moléculas nutrientes adequadas.

A diminuição da viabilidade celular, observada no momento em que as células foram retiradas do frasco de cultura, pode ser relacionada à ação de substâncias utilizadas nas etapas experimentais do estudo, como a enzima tripsina, por exemplo. Mazur *et al.*, 1972, afirmaram que a tripsina, enzima utilizada para desagregar as células aderidas à superfície de crescimento do frasco de cultivo, afeta a integridade celular.

Em relação à técnica utilizada neste estudo, sugere-se que as substâncias presentes nas etapas do experimento podem ter interferido em algum momento do processo.

O agente crioprotetor DMSO é o mais utilizado em protocolos de criopreservação. A escolha deste crioprotetor foi devida ao fato de que o mesmo é largamente utilizado para a criopreservação de progenitores hematopoiéticos. Entretanto, é possível a utilização de outros agentes crioprotetores, como o glicerol e o etilenoglicol (Milosevic *et al.*, 2005).

O DMSO pode ser utilizado em várias concentrações: 2%, 4%, 5% ou 10%. Neste estudo, foi utilizada a concentração de 10%, a qual é largamente empregada em protocolos de criopreservação de células da medula óssea. Entretanto, em face da possibilidade de utilização das concentrações supracitadas, sugerem-se novos estudos em nível de investigação do comportamento das células-tronco mesenquimais da medula óssea. Em um estudo comparativo, testou-se a viabilidade de células progenitoras do sangue periférico frente às concentrações 2%, 4%, 5% e 10%, bem como a concentração celular criopreservada. Os resultados sugeriram que a concentração de 5% de DMSO mostrou ser uma dose ótima para o armazenamento deste tipo de célula (células progenitoras do sangue periférico), e a concentração celular ideal não deve ser superior a 200×10^6 células/mL (Liseth *et al.*, 2005).

O agente crioprotetor DMSO também pode ser utilizado em associação a outros agentes crioprotetores, como foi observado nos estudos de Ha *et al.*, 2005. Os autores, após experimentos de comparação de diferentes concentrações de DMSO, sugeriram que o mesmo pode ser utilizado a 5%, juntamente com soro bovino fetal a 50% e 10% de etilenoglicol, em um processo de criopreservação sem um decaimento controlado de temperatura.

Para estudos posteriores, sugere-se uma comparação da utilização do DMSO com várias outras concentrações, inferiores ou superiores, bem como a comparação com outros agentes crioprotetores e diferentes concentrações de soro bovino fetal.

Também é possível a adição de diferentes substâncias ao meio de congelamento de células de origem hematopoiética, como relatado por Sasnoor *et al.*, 2005, os quais adicionaram catalase e trealose ao meio de congelamento das células. Os resultados indicaram que a adição destes agentes preservou a capacidade de adesão das células quando transplantadas.

A utilização de outros agentes crioprotetores, em detrimento do DMSO, possibilita a terapia com células criopreservadas sem o inconveniente dos efeitos adversos provocados por este crioprotetor.

A temperatura de armazenamento influi de uma maneira significativa nos processos de criopreservação. Técnicas que utilizam as mais baixas temperaturas melhor preservam as células, em termos de viabilidade e apoptose (Fowke *et al.*, 2000).

A taxa de decaimento de temperatura atua como um fator crítico que pode afetar a recuperação das células pós-criopreservação. A taxa ideal de decaimento de temperatura descrita na literatura é de 1°C por minuto. Os protocolos de criopreservação de amostras biológicas citam a utilização de congeladores automáticos, através do qual é possível o monitoramento da diminuição de temperatura (Shen *et al.*, 2003).

Neste estudo, pela falta de um equipamento de monitoramento de temperatura, o decaimento da temperatura foi baseado em cálculos aproximados, sendo que no início do procedimento, a temperatura registrada era de -4°C, e no final do processo, antes do armazenamento em nitrogênio líquido, a temperatura alcançada era de -90°C. O tempo decorrido durante todo este processo foi de 70 minutos.

Sugere-se que a falta de um monitoramento adequado de temperatura pode interferir na qualidade da viabilidade das células criopreservadas.

Em relação ao tempo de criopreservação de amostras biológicas, a literatura não estabelece um período ideal de armazenamento para análises posteriores. Liseth *et al.*, 2005, relataram períodos de armazenamento de seis a oito semanas, discutindo sobre a concentração do agente crioprotetor e a concentração celular ideal. Kotobuki *et al.*, 2005, relataram experimentos nos quais utilizaram períodos variáveis de criopreservação, 9 dias a 37 meses. Muramaki *et al.*, 2003, relataram casos nos quais a criopreservação de amostras de células-tronco do sangue periférico foi eficaz após cinco anos de criopreservação. O período de armazenamento escolhido, 1 mês, foi suficiente para se analisar os efeitos da criopreservação sobre as células; sugere-se, pois, que não importa o período de tempo armazenado, mas sim o número de ciclos congelamento-descongelamento aos quais as células são submetidas.

Desse modo, devido à falta de um período ideal de armazenamento, durante o qual seria possível uma análise do comportamento celular a baixas temperaturas, padronizou-se para este estudo o período de um mês.

Embora dados da literatura relatem os danos decorrentes de processos de criopreservação de células, Dumont *et al.*, 2004, sugeriram que os protocolos de criopreservação devem fornecer a maior taxa possível de recuperação da viabilidade celular, pois este é o método mais comumente utilizado de armazenamento celular.

Para este estudo foi proposta a utilização de um teste para evidenciar o grau de alteração da integridade da membrana plasmática, aludindo à hipótese de que o processo de apoptose é induzido pela criopreservação. Abrahamsem *et al.*, 2002, e Humpe *et al.*, 2005, utilizaram a apoptose como uma forma de verificação da viabilidade celular.

A importância em relacionar os efeitos da criopreservação ao fenômeno da apoptose deve-se ao fato de que este é um processo característico por apresentar translocação dos fosfolípidios da membrana plasmática, quando a membrana celular sofreu algum tipo de agressão.

Foram encontradas, com o término deste estudo, alterações morfológicas celulares em nível de membrana celular, refletidas em termos de apoptose. Guimarães *et al.*, 2004, afirmaram que esta é uma forma de morte celular na qual certas características morfológicas se fazem presente, como a perda de assimetria da membrana plasmática e a perda de sua capacidade de adesão.

Sugere-se, de posse dos dados obtidos neste estudo, que a detecção da apoptose em processos de criopreservação é uma confirmação dos danos que este processo pode causar às células. Pincet *et al.*, 1994, relataram danos que um processo de criopreservação pode causar a amostras biológicas, principalmente aqueles que se referem à membrana plasmática.

Os métodos disponíveis para a determinação da apoptose procuram ser cada vez mais precisos. Para tanto, a combinação de diferentes moléculas e corantes se faz presente em vários testes disponíveis atualmente, cujo objetivo é aumentar a sensibilidade e a especificidade das técnicas. Em se tratando de detecção da apoptose, verifica-se que os métodos utilizam-se desta propriedade com o intuito de refletir para o pesquisador o real estado de integridade da membrana plasmática, evitando, desta forma, o uso de corantes únicos que produzem artefatos durante a análise, comprometendo a qualidade do teste.

De posse dos dados, foi possível verificar o comportamento da amostra em toda a trajetória do estudo. Sugere-se, desta forma, que a diminuição da viabilidade celular foi devida ao estresse físico, ou seja, condições artificiais de cultivo das células e o processo de criopreservação provocaram a perda de viabilidade celular.

A identificação das células-tronco mesenquimais neste estudo não foi realizada por marcação fenotípica, como sugeriu Kotobuki *et al.*, 2005, sendo negativa para os marcadores de células hematopoiéticas (CD14, CD 34, CD45 e HLA-DR) e positiva para os marcadores mesenquimais (CD29 e CD105); mas apenas por características morfológicas, pela sua semelhança a fibroblastos em cultura, e pela sua capacidade de adesão à superfície de crescimento dos frascos de cultivo, bem como a marcação com o anticorpo anti-vimentina, o qual marca células de origem mesenquimal.

A análise da viabilidade celular, de acordo com o que se depreende deste estudo, mostra-se como um parâmetro fidedigno para a avaliação do real estado de integridade de amostras biológicas, incluindo tipos celulares específicos. Também é possível avaliar a funcionalidade das células por meio da atividade de enzimas específicas relacionadas ao tipo celular em questão (Suh *et al.*, 1999).

Lee *et al.*, 2004, realizaram um experimento onde cultivaram células-tronco do cordão umbilical após um processo de criopreservação. Os resultados indicaram que o número de células CD34+/CD38- aumentou após o cultivo celular. Nesse estudo a viabilidade não foi determinada, tomando-se como parâmetro para a efetividade da integridade celular a capacidade que estas células possuem para se expandir em cultivo, evidenciada pelo aumento do seu número em quantidade. Os autores sugerem que serão necessários estudos futuros relacionados à efetividade do transplante dessas células após o cultivo celular, avaliando também os receptores que tais células expressam. Em se tratando das células-tronco mesenquimais, os achados deste estudo sugerem que serão necessárias maiores investigações acerca do comportamento destas células antes e após o congelamento.

Sugere-se, para estudos posteriores, continuidade do mesmo tipo de estudo a fim de verificar a funcionalidade das células-tronco mesenquimais quanto ao seu grau de proliferação e adesão.

Apesar de o processo de criopreservação ser considerado o melhor método de armazenamento de amostras biológicas, foram constatados valores de morte celular significativos no término deste estudo. Deste modo, sugere-se que os protocolos de criopreservação ainda necessitam de um maior refinamento no seu desenvolvimento.

Infere-se, com o término do estudo, que é necessária uma contínua busca para o aperfeiçoamento de técnicas de criopreservação de amostras biológicas em baixas temperaturas, assim como métodos cada vez mais sensíveis de determinação da viabilidade celular, cujo objetivo seja refletir o real estado de integridade celular, após processos indutores de danos celulares.

6 CONCLUSÃO

Baseado nos dados deste estudo, sugere-se que a criopreservação das células-tronco mesenquimais induziu morte celular tanto pelo método Azul de Trypan como pelo método Citometria de Fluxo, de forma significativa.

Sugere-se que o método de determinação da viabilidade celular Citometria de Fluxo é mais sensível que o método Azul de Trypan, pela sua maior sensibilidade em identificar células mortas, tanto no período pré como no período pós-criopreservação,

Não houve diferença estatística significativa entre os marcadores Anexina e 7-AAD, tanto no período pré como pós-criopreservação, para a determinação da viabilidade celular.

7 REFERÊNCIAS

Armandola EA. Tissue regeneration and organ repair: Science or science fiction. Highlights of the ACHEMA 27th International Congress on Chemical Engineering, Environmental Protection and Biotechnology; 2003 Maio 19-24; Frankfurt am Main, Alemanha.

Yeh ETH, Zhang S, Wu HD, Körbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34⁺-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells and smooth muscle cells *in vivo*. *Circulation*. 2003; 108(17): 2070-73.

Lee MS, Lill M, Makkar RR. Stem cell transplantation in myocardial infarction. *Rev Cardiovasc Med*. 2004; 5 (2): 82-8.

Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, *et al*. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001; 107 (11): 1395-02.

Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL. One strategy for cell and gene therapy: Harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci*. 2003; 100 Suppl 1: 11917-23.

Gao DY, Chang Q, Liu C, Farris K, Harvey K, McGann LE, *et al*. Fundamental cryobiology of human hematopoietic progenitors cells I: osmotic characteristics and volume distribution. *Cryobiology*. 1998; 36: 40-8.

Karow JR AM, Webb WR. Tissue Freezing. A theory of injury and survival. *Cryobiology*. 1965; 2 (3): 99-08.

Wolfe J, Bryant G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology*. 1999. 39: 103-29.

Ishiguro H, Koile K. Three-dimensional behavior of ice crystals and biological cells during freezing of cell suspensions. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 858: 235-44.

Cui ZF, Dykhuizen RC, Nerem RM, Sembanis A. Modeling of cryopreservation of engineered tissues with one-dimensional geometry. *Biotechnol Prog.* 2002; 18: 354-61.

Dumont F, Marechal PF, Gervais P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(1): 268-72.

Mascotti K, McCullough J, Burger SR. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion.* 2000; 40: 693-96.

Höppner M, Luhm J, Schlenke P, Koritke P, Frohn C. A flow-cytometry based cytotoxicity assay using stained effector cells in combination with native target cells. *J Immunol Methods.* 2002; 267 (2): 157-63.

Bacsó Z, Everson RB, Eliason JF. The DNA of annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. *Cancer Res.* 2000; 60: 4623-28.

Scorsin M, Marrote F, Sabri A, Le Dref O, Demirag M, Samuel JL, Rappaport L, Menasche P. Can grafted cardiomyocytes colonize peri-infarcted areas? *Circulation.* 1996; 94 Suppl 2: 337-40.

Souza LCG. Transplante de células musculares adultas no infarto do miocárdio. Estudo experimental em ratos [Tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2001.

Kocher AA, Schuster MD, Szaboles MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, *et al.* Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived

angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001; 7(4): 430-36.

Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002; 105(1): 93-98.

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, *et al.* Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002; 106 (15): 1913-18.

Satomi-Kobayashi S, Kawashima S, Sakoda T, Ueyama T, Kawai M, Toh R, *et al.* Cardiac myocytes are recruited by bone marrow-derived cells in intact murine heart. *Kobe J Med Sci.* 2002; 48 (6): 161-66.

Thompson RB, Emani SM, Davis BH, Van der Bos EJ, Morimoto Y, Craig D, *et al.* Comparison of intracardiac cell transplantation: autologous skeletal myoblasts versus bone marrow cells. *Circulation.* 2003; 108 Suppl 2: 264-71.

Chen SL, Fang WW, Qian J, Ye F, Liu YH, Shan SJ, *et al.* Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardium infarction. *Chin Med J.* 2004; 117(10): 1443-48.

Kirschstein R. Stem cells: scientific progress and future research. Bethesda: The National Institute of Health. Department of Health and Human Services. 2001.

Friedenstein A, Petrakova K, Kurolesova A. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 2002; 6: 230-47.

La Russa VF, Schwarzenberger P, Miller A, Agrawal K, Kolls J, Weiner R. Marrow stem cells, mesenchymal progenitor cells and stromal progeny. *Cancer Invest.* 2002; 20 (1): 110-23.

Devine S. Mesenchymal stem cells: will they have a role in the clinic? *J Cell Biochem. Suppl* 2002; 38: 73-9.

Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL. One strategy for cell and gene therapy: Harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100 Suppl1: 11917-23.

Cardoso FP, González JH, Ezquerro EA. Stem Cells to regenerate cardiac tissue in heart failure. *Rev Esp Cardiol.* 2003; 56 (10): 935-39.

Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium. *Circulation.* 2003; 108(7): 863-68.

Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, Amado LC, Martin JB, Pittenger MF, *et al.* *In vivo* magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardium infarction. *Circulation.* 2003; 107(18): 2290-93.

Wang J, Li C, Fan Y, He H, Sun Y. Allograft bone-marrow derived mesenchymal stem cells transplanted into heart infarcted model of rabbit to renovate infarcted heart. *J Zhejiang Univ Sci.* 2004; 5(10): 1279-85.

Avilés FF, San Roman JA, Frade JG, Valdés M, Sánchez A, De la Fuente L, *et al.* Regeneración miocárdica mediante la implantación intracoronaria de células madre en el infarto agudo de miocardio. *Rev Esp Cardiol.* 2004; 57 (3): 201-08.

Agbulut O, Vandervelde S, Attar NA, Larghero J, Ghostine S, Léobon B, *et al.* Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133⁺

progenitors for the repair of infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44(2): 458-63.

Souza LCG, Carvalho KAT, Rebelato C, Senegaglia A, Furuta M, Miyague N, *et al.* O transplante de células mioblásticas esqueléticas e mesenquimais (cocultivo) na disfunção ventricular pós-infarto do miocárdio. *Arq Bras Cardiol.* 2004; 83(4): 288-93.

Romano G. Stem cell transplantation therapy: controversy over ethical issues and clinical relevance. *Drug News Perspect.* 2004; 17(10): 637-45.

Jing Z, Geng-Shan L, Guo-Cao L, Qing Z, Wen-Qiang L, Hong-Xin X. Autologous mesenchymal stem cells transplantation in adriamycin-induced cardiomyopathy. *Chin Med J.* 2005; 118(1): 73-6.

Muldrew K, McGann LE. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys J.* 1990; 57: 525-32.

Seiyama A, Kosaka H, Maeda N, Shiga T. Effect of hipotermia on skeletal muscle metabolism in perfused rat hindlimb. *Cryobiology.* 1996; 33: 338-46.

Gao DY, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.* 2000; 41 (4): 187-96.

Rabin Y, Steif PS, Taylor MJ, Julian TB, Wolmark N. An experimental study of the mechanical response of frozen biological tissues at cryogenic temperatures. *Cryobiology.* 1996; 33: 472-82.

Acker JP, Larese A, Yang H, Petrenko A, McGann LE. Intracellular ice formation in affected by cell interactions. *Cryobiology.* 1999; 38: 363-71.

Pincet F, Perez E, Wolfe J. Do trealose and dimetyl sulphocide affect intermembrane forces? *Cryobiology.* 1994; 31: 531-39.

McGrath JJ. Quantitative measurement of cell membrane transport: technology and applications. *Cryobiology*. 1997; 34: 315-34.

Zenhäusern R, Tobler A, Leoncini L, Hess OM, Ferrari P. Fatal cardiac arrhythmia after infusion of DMSO-cryopreserved hematopoietic stem cells in a patient with severe primary amyloidosis and end-stage renal failure. *Ann Hematol*. 2000; 79: 523-26.

Abrahamsen JF, Bakken AM, Bruserud O. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5% rather than 10% DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34⁺ cells. *Transfusion*. 2002; 42: 1573-80.

Hunt CJ, Armitage SE, Pegg DE. Cryopreservation of umbilical cord blood: 1. Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity and permeability of CD34⁺ cells to dimethyl sulphoxide. *Cryobiology*. 2003; 46: 61-5.

Fowke KR, Behnke J, Hanson C, Shea K, Consentino LM. Apoptosis: a method for evaluating the cryopreservation of whole blood and peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods*. 2000; 244: 139-44.

Ohno N, Fedak PWM, Weisel RD, Mickle DAG, Fuji IT, Li RK. Transplantation of cryopreserved muscle cells in dilated cardiomyopathy: effects on left ventricular geometry and function. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003; 126: 1537-48.

Pang Y, Cui P, Chen W. Incipient establishment of human bone marrow mesenchymal stem cells bank. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2005; 19(7): 578-82.

Guerrero A, Arias AM. Apoptosis. In: SPERELAKIS N. *Cell Physiology Source Book*. San Diego: Academic Press, 1998. p. 1031-41.

Bennett MR, Gibson DF, Schwartz SM, Tait JF. Binding and Phagocytosis of Apoptotic Vascular Smooth Muscle Cells Is Mediated in Part by Exposure of Phosphatidylserine. *Circ Res.* 1995; 77: 1136-42.

Green DR. Apoptosis and Sphingomyelin Hydrolysis: The Flip Side. *J Cell Biol.* 2000; 150 (1): 5-8.

Kam PCA, Ferch NI. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia* 2000; 55: 1081-93.

De Boer F, Dräger AM, Pinedo HM, Kessler FL, Muijen MM, Weijers G, Westra G, *et al.* Early apoptosis largely accounts for functional impairment of CD34 positive cells in frozen-thawed stem cell grafts. *J Hematother Stem Cell.* 2002; 11 (6): 951-63.

Cornelissen M, Philippé J, De Sitter S, De Ridder. Annexin-V expression in apoptosis peripheral blood lymphocytes: an electron microscopic evaluation. *Apoptosis.* 2002; 7: 41-7.

Lecoeur H, Ledru E, Prévost MC, Gougeon ML. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J Immunol Methods.* 1997; 209: 111-23.

Gatti R, Belletti S, Orlandini G, Bussolati O, Dall'Asta V, Gazzola, GC. Comparison of Annexin V and Calcein-AM as Early Vital Markers of Apoptosis in Adherent Cells by Confocal Laser Microscopy. *J Histochem Cytochem.* 1998; 46: 895-00.

Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, Davis RE, Naumovski L, Ohtsuki K, *et al.* *In vivo* detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95 (11): 6349-54.

Kahn E, Lizard G, Frouin F, Bernengo JC, Souchier C, Bessède G, *et al.* Confocal analysis of phosphatidylserine externalization with the use of biotinylated annexin V

revealed with streptavidin-FITC, -europium, -phycoerythrin ou –texas red in oxysterol-treated apoptotic cells. *Anal Quant Cytol Histol.* 2001; 23: 47-5.

Rudolf E, Cervinka M. Time dependent appearance of selected apoptotic markers and usefulness of their detection *in vitro*. *Acta Medica.* 2002; 45 (4): 135-44.

Tait JF, Gibson DF, Smit HC. Measurement of the affinity and cooperativity of annexin V-membrane binding under conditions of low membrane occupancy. *Anal Biochem.* 2004; 329: 112-19.

Gyls KH, Fein JA, Wiley DJ, Cole GM. Rapid annexin-V labeling in synaptosomes. *Neurochem Int.* 2004; 44: 125-31.

Bøyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human human blood. *Scand J Clin Lab Invest.* 1968; Supp 21: 77-79.

Barry FP, Murphy JM, English K, Mahon BP. Immunogenicity of adult stem cells: lessons from the fetal allograft. *Stem Cells Dev.* 2005; 14(3): 252-65.

Strauer BE, Kornowski R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation.* 2003; 107: 929-34.

Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I, Kollet O, Di Persio JF, Link D, Devine S. Stem cell mobilization. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2003; 419-37.

Pouzet B, Vilquin JT, Hagège AA, Scorsin M, Messas E, Fiszman M, *et al.* Intramyocardial transplantation of autologous myoblast. Can tissue processing be optimized? *Circulation.* 2000; 102 Supp 3: 210-15.

Kuo RC, Baxter GT, Alajoki L, Miller DL, Libby JM, Owicki JC. A metabolic view of receptor activation in cultured cells following cryopreservation. *Cryobiology.* 1993; 30: 386-95.

Massumoto CM, Mizukami S, Campos MF, Silva LAG, Mendrone Jr A, Sakashita A, *et al.* Criopreservação de medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos. Rev Assoc Med Bras. 1997; 43 (2): 93-8.

Chauffaille MLF, Pinheiro RF, Stefano, JT. Kerbauy J. Karyotype of cryopreserved bone marrow cells. Braz J Med Biol Res. 2003; 36 (7): 845-50.

Kudo Y, Minegishi M, Itoh T, Miura J, Saito H, Takahashi H. Evaluation of hematological reconstitution potencial of autologous peripheral blood progenitor cells cryopreserved by a simple controlled-rate freezing method. Tohoku J Exp Med. 2005; 205: 37-3.

Bustamente JO, Jachimowicz D. Cryopreservation of human heart cells. Cryobiology 1998; 25: 394-08.

Humpe A, Beck C, Schoch R, Kneba M, Horst HA. Establishment and optimization of a flow cytometric method for evaluation of viability of CD34⁺ cells after cryopreservation and comparison with trypan blue exclusion staining. Transfusion. 2005; 45: 1208-13.

Kim H, Whartenby KA, Georgantas RW, Wingard J, Civin, CI. Human CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Express High Levels of FLIP and Are Resistant to Fas-Mediated Apoptosis. Stem Cells. 2002; 20: 174-82.

Lee MW, Yang MS, Park JS, Kim HC, Kim YJ, Choi J. Isolation of mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. Int J Hematol. 2005; 81(2): 126-30.

Mazur P, Leibo SP, Chu EHY. A two factor hypotesis of freezing injury. Exp Cell Res. 1972; 71: 345-55.

Milosevic J, Storch A, Schwarz J. Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells. *Stem Cells*. 2005; 23(5): 681-88.

Liseth K, Abrahamsen JF, Bjorsvik S, Grottebo K, Bruserud O. The viability of cryopreserved PBPC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft. *Cytotherapy*. 2005; 7(4): 328-33.

Ha SY, Jee BC, Suh CS, Kim HS, Oh SK, Kim SH, Moon SY. Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer. *Hum Reprod*. 2005; 20(7): 1779-85.

Sasnoor LM, Kale VP, Limaye LS. A combination of catalase and threosulose as additives to conventional freezing medium results in improved cryopreservation of human hematopoietic cells with reference to *in vitro* migration and adhesion properties. *Transfusion*. 2005; 45(4): 622-33.

Shen HP, Ding CM, Chi ZY, Kang ZZ, Tan WS. Effects of different cooling rates on cryopreservation of hematopoietic stem cells from cord blood. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2003; 19(4): 489-92.

Kotobuki N, Hirose M, Machida H, Katou Y, Muraki K, Takakura Y, *et al.* Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue Eng*. 2005; 11(5-6): 663-73.

Muramaki M, Hara I, Miyake H, Yamada Y, Okada H, Kamidono S. Long-term cryopreservation of peripheral blood stem cells in patients with advanced germ cell tumors using the dump-freezing method at -80 degrees C. *Oncol Rep*. 2003; 10(6): 1993-98.

Guimarães CA, Lindem R. Programmed cell death: Apoptosis and alternative death styles. *Eur J Biochem.* 2004; 271: 1638-50.

Suh H, Lee JE, Park JC, Han DW, Yoon S, Park YH. Viability and enzymatic activity of cryopreserved porcine heart valve. *Yonsei Med J.* 1999; 40 (2): 184-90.

Lee YH, Han JY, Seo SY, Kim KH, Lee YS, Lee HS, *et al.* Stem cells expressing homing receptors could be expanded from cryopreserved and unselected cord blood. *J Korean Med Sci.* 2004; 19(5): 635-39.

ANEXOS

Anexo 1: Tabela de resultados obtidos com os métodos de determinação da viabilidade celular, os quais originaram os gráficos e demais tabelas do capítulo Resultados.

Tabela de resultados de experimentos

Número do Experimento	Parâmetros Pré-Congelamento					
	Contagem absoluta	Viabilidade Azul de Tripán %	% céls. 7-AAD +	% céls. Anexina +	Morte Celular	Viabilidade Citometria
Rato 1	1,5 x10 ⁶	95,83	26,7	24,3	23,78	76,22
Rato 2	1,08 x 10 ⁶	92	15,99	19,44	12,7	87,3
Rato 3	1,5 x10 ⁶	96	13,33	14,74	20,83	79,17
Rato 4	1,5 x10 ⁶	97	11,42	12	10,64	89,36
Rato 5	1,5 x10 ⁶	95	18,55	22,08	23,37	76,63
Rato 6	1,6 x10 ⁶	95,34	15,54	13,12	13,69	86,31
Rato 7	1,2 x10 ⁶	95,45	15,65	11,4	11,63	88,37
Rato 8	1,5 x10 ⁶	90,9	24,31	13,34	10,73	89,27
Rato 9	1,6 x10 ⁶	96	11,94	9,3	8,2	91,8
Rato 10	1,6 x10 ⁶	94,12	14,44	10,5	9,24	90,76

Número do Experimento	Parâmetros Pós-Congelamento					
	Contagem absoluta	Viabilidade Azul de Tripán %	% céls. 7-AAD +	% céls. Anexina +	Morte Celular	Viabilidade Citometria
Rato 1	2,3 x10 ⁶	92,1	35,88	26,67	26,18	73,82
Rato 2	1 x10 ⁶	90	20,85	24,01	29,01	70,99
Rato 3	3,2 x10 ⁶	93,33	22,78	22,83	30,62	69,38
Rato 4	2,85 x10 ⁶	83,33	21,36	27,96	29,26	70,74
Rato 5	3,6 x10 ⁶	89,9	19,13	26,79	28,82	71,18
Rato 6	4,0 x10 ⁶	89	13,74	34,67	33,98	66,02
Rato 7	4,5 x10 ⁶	92,85	8,91	27,59	42,23	57,77
Rato 8	5,35 x10 ⁶	90,24	41,17	30,36	29,91	70,09
Rato 9	4,7 x10 ⁶	93	7,44	31,05	32,36	67,64
Rato 10	1,6 x10 ⁶	92	15,13	60,13	55,14	44,86

Anexo 2: Requerimento para importação de material para pesquisa científica.

Anexo 3: e-mail de solicitação de suporte técnico à empresa fornecedora do reagente Annexin V Apoptosis Detection Kit

De: [Fernanda C Natalone@bd.com](mailto:Fernanda_C_Natalone@bd.com) [mailto:Fernanda_C_Natalone@bd.com]

Enviada em: segunda-feira, 12 de setembro de 2005 12:07

Para: claudia.pardi@ambriex.com.br

I'm not sure if Annexin V/7-AAD staining will tell which cells are "functional" vs. just being "alive". 7-AAD is a live/dead cell discriminator, so anything that has retained membrane integrity will not take up the dye (therefore "alive").

Cells which are in the early stages of apoptosis should still have an intact membrane, but if has "flipped" to expose the phosphatidylserine, then the Annexin will bind (but 7-AAD should not get in). Technically, these cells are still alive, but I don't know how functional they would be (in terms of normal function). Cells that are Annexin V and 7-AAD negative should theoretically still be "normal", or they may just not have reached the stage of apoptosis where the outer membrane begins to "flip".

In later stages of apoptosis where there is a loss of membrane integrity, cells should be both 7-AAD and Annexin V positive. Actually, any cell that has lost membrane integrity will be double positive, regardless of the method of cell "death".

I suppose it depends on the customer's definition of alive and functional, and what exactly they want to find out.

(Embedded image moved to file: pic11812.gif)

Fernanda C Natalone - Support Analyst / Biosciences

Anexo 4: Classificação de Periódicos, segundo site da Capes, do *Journal of Cellular Biochemistry*, para o qual o artigo foi enviado.

APÊNDICES

Apêndice 1: Carta de aceitação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

REQUERIMENTO PARA IMPORTAÇÃO DE MATERIAL PARA PESQUISA CIENTÍFICA

I TÍTULO E OBJETO DA PESQUISA	II- PERÍODO NECESSÁRIO PARA REALIZAÇÃO DA PESQUISA
--------------------------------------	---

TITULO:ANÁLISE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS WISTAR SUBMETIDAS À CRIOPRESERVAÇÃO.

01/10/2004 a 30/04/2005

III-NOME/END. COMPLETO DA INSTITUIÇÃO REMETENTE	IV-PAÍS DE FABRICAÇÃO DA MERCADORIA IMPORTADA
--	--

Nome: PROLAB SALES INC
Endereço: 11601 WILSHIRE BLVD, LOS ANGELES, CA90025, USA

USA

V- PAÍS DE ORIGEM DA MATÉRIA PRIMA	VI- PAÍS DE PROCEDÊNCIA DA MERCADORIA
---	--

USA

USA

VII-PRAZO DE VALIDADE DA MERCADORIA IMPORTADA	VIII-NOME E ENDEREÇO COMPLETO DO IMPORTADOR
--	--

A VALIDADE CONSTARÁ DA PETIÇÃO DO ARTIGO 2º DO REGULAMENTO RDC 001/2003

IMPORTAÇÃO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO AMBRIEX S/A
RUA TUPI, 535 - SÃO PAULO - SP
CEP 01233-907

IX- NOME E ENDEREÇO COMPLETO DA INSTITUIÇÃO DESTINATÁRIA	X- NOME E ENDEREÇO COMPLETO DO LOCAL ONDE SERÁ REALIZADA A PESQUISA
---	--

Nome:PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANA - PUC-PR
Endereço: RUA IMACULADA CONCEIÇÃO, 155 PRADO VELHO CURITIBA-PR-BRASIL CEP 80215-901

Nome:LABORATÓRIO EXPERIMENTAL DE CULTIVO CELULAR - PUC-PR
Endereço: RUA IMACULADA CONCEIÇÃO, 155 PRADO VELHO CURITIBA-PR-BRASIL CEP 80215-901

XI-NÚMERO DO DOCUMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO ÓRGÃO COMPETENTE QUE REALIZOU A PESQUISA, QUANDO COUBER	XII-NOME E RESPECTIVO REGISTRO NO CONSELHO DE CLASSE DO PESQUISADOR DA INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL PELA PESQUISA
--	---

NR. DO DOCUMENTO: NÃO HÁ

NOME DO ÓRGÃO: CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA
NR. DO REGISTRO: 15356

XIII-LICENÇA SANITÁRIA OU DOCUMENTO CORRESPONDENTE VÁLIDA, EXPEDIDO PELA AUTORIDADE COMPETENTE NO ESTADO, MUNICÍPIO, OU DISTRITO FEDERAL ONDE SE ENCONTRA O LABORATÓRIO ANALISTA, QUANDO SE TRATAR DE EXIGÊNCIA OBRIGATÓRIA CONSTANTE EM LEGISLAÇÃO PERTINENTE.
--

NÃO HÁ EXIGÊNCIA

XIV CÓDIGO OU IDENTIFICAÇÃO DA MERCADORIA IMPORTADA SOB PESQUISA E XVI INSCRIÇÃO PARA FINS DE IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO

QTD	CÓDIGO	DESCRIÇÃO DO PRODUTO
01	559763	Reagente imunológico anexin-V marcado com PE, 100 testes. Deve ser transportado e armazenado a 4°C.

XV TIPOS DE EMBALAGEM PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA ADEQUADA A MERCADORIA IMPORTADA

EMBALAGEM PRIMÁRIA: FRASCOS

EMBALAGEM SECUNDÁRIA: CAIXA DE ISOPOR

XVIII- NÃO UTILIZAÇÃO DA MERCADORIA EM SERES HUMANOS

Os produtos não serão utilizados em seres humanos. Assumo inteira responsabilidade administrativa, civil e penal pelas informações contidas nesta Declaração, bem como pelo acondicionamento, transporte e manipulação, material de publicidade, pela não utilização em seres humanos, guarda e uso dos produtos e substâncias importadas, e por eventuais danos causados à saúde das pessoas e ao meio ambiente.

LOCAL E DATA: CURITIBA, 05 de OUTUBRO de 2004

Nome (chefe): LUIZ CESAR
GUARITA SOUZA
C.R.M nº 15356

Nome (pesquisador): CAMILA CAPUCHO
CURY
C.R.F nº 13581