

**ACADEMIA DE CIENCIA E TECNOLOGIA  
NATHALIA RAYSSA SILVA REMIGIO**

**CRIOPRESERVAÇÃO NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO  
HEMATOPÓIÉTICAS**

**2022**

**SÃO JOSE DO RIO PRETO**

**ACADEMIA DE CIENCIA E TECNOLOGIA**  
**NATHALIA RAYSSA SILVA REMIGIO**

**CRIOPRESERVAÇÃO NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO  
HEMATOPÓIETICAS**

Trabalho de conclusão do curso de pós-graduação para o título de pós-graduado em Hematologia e Banco de Sangue apresentado a Academia de Ciência e Tecnologia de São Jose do Rio Preto - SP

**2022**

**SÃO JOSE DO RIO PRETO**

## **RESUMO**

O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) consiste na infusão intravenosa de célula tronco hematopoiéticas (CTH), que possuem capacidade de auto renovação e potencial proliferativo, tornando-as responsáveis pela formação das células maduras de toda linhagem sanguínea. Existem três possibilidades de transplantes: autólogo, alogênico e singênico. As CTH's podem ser resgatadas de três fontes distintas: cordão umbilical; medula óssea e também sangue periférico, após mobilização. As CTH's podem ser infundidas a fresco após coleta em até setenta e duas horas, e excedendo este prazo faz-se necessário à criopreservação para garantia da viabilidade e posterior adesão à medula condicionada.

**Palavras-chaves:** *criopreservação; células tronco hematopoiéticas, congelamento.*

## **INTRODUÇÃO**

O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) consiste na infusão intravenosa de célula tronco hematopoiéticas (CTH), que possuem capacidade de auto renovação e potencial proliferativo, tornando-as responsáveis pela formação das células maduras de toda linhagem sanguínea e escolha na terapia celular para tratamento de doenças do sangue como a anemia aplástica grave, anemias adquiridas e congênitas, e nas leucemias. O transplante também pode ser indicado para tratamento de mais de 80 doenças, incluindo casos de mieloma múltiplo, linfomas e doenças autoimunes.<sup>1, 2, 5.</sup>

Existem três possibilidades de transplantes: autólogo, alogênico e singenico. Na modalidade autóloga as células são previamente coletadas do próprio paciente e após condicionamento infundidas. No transplante alogênico há possibilidade de receber as células de um doador saudável que possua compatibilidade HLA (antígeno leucocitário humano), podendo ser encontrado na própria família (doação aparentada) ou no banco de doadores de medula óssea (doação não-aparentada). O transplante singenico acontece quando a doação vem de um irmão gêmeo idêntico.<sup>1,3</sup>

As CTH's podem ser resgatadas de três fontes distintas: cordão umbilical; medula óssea e também sangue periférico, após mobilização. Estas células são identificadas por meio do antígeno glicoproteico CD34+ situado na membrana plasmática. As células podem ser infundidas a fresco após coleta em até setenta e duas horas, e excedendo este prazo faz-se necessário à criopreservação para garantia da viabilidade e posterior adesão à medula condicionada.<sup>1,4</sup>

## **METODOLOGIA**

A metodologia utilizada para desenvolvimento deste trabalho consiste em um levantamento bibliográfico, buscando a partir de embasamento em referencial teórico sobre o tema de Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas em livros e artigos científicos.

# **CRIOPRESERVAÇÃO**

## **1.1 Congelamento**

O resfriamento das células em temperaturas aproximadas a 0°C interfere em diversas vias metabólicas celulares, por exemplo na bomba de sódio e potássio, na fase lipídica da membrana plasmática, na atividade enzimática e até na precipitação de substâncias. Apesar da redução do metabolismo nessas baixas temperaturas, continuamente a célula insiste em progredir para a perda da viabilidade. Há a possibilidade ainda da morte ou lesão celular por “choque-térmico” quando o processo é realizado rapidamente. Por esse motivo é necessário que seja feito o congelamento de maneira a interromper a atividade celular sem causar a lesão ou morte.<sup>2</sup>

Durante o processo de congelamento, a célula fica exposta a dois tipos de lesão: a desidratação e o dano mecânico. Ambos os tipos são consequências da velocidade de congelamento do produto. Buscando utilizar a velocidade ideal para o tipo de célula em procedimento e associando a aplicação de crioprotetores, que possam auxiliar na diminuição do processo de desidratação e também na formação de cristais de gelo, evitamos tais lesões. A esse processo nomeamos criopreservação.<sup>2,4,7</sup>

## **1.2 Crioprotetores**

Os crioprotetores podem agir na parte externa ou interna da célula, por meio da ligação com as moléculas de água, a substância crioprotetora evita a formação de cristais de gelo ou até mesmo reduz possíveis danos devido alta concentração de soluto, presente na suspensão da célula, evitando a desidratação. Esses compostos são divididos em duas categorias: os capazes de passar pela membrana celular como glicerol e dimetilsulfóxido denominados de permeáveis, e os não permeáveis que apesar de não terem capacidade de entrar no interior das células devido ao seu tamanho e peso molecular, atuam na parte extracelular aumentando a osmolaridade e influenciando na passagem da água da região intracelular para a extracelular. Exemplo destes compostos são os hidroxietilamido (HEA), polivinilpirrolidona, trealose, frutose, sacarose e glicose.<sup>2,8</sup>

O reagente dimetilsulfóxico ou DMSO ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ) é a substância não permeável mais utilizada na criopreservação. É um composto polar, incolor e inodoro com capacidade de absorção de umidade, com baixo peso molecular, usado na indústria como solvente. Sendo o mais utilizado por sua capacidade de ligação com moléculas de água livre, reduzindo a produção de gelo e diminuindo a temperatura do início do congelamento. Esse reagente entra na célula numa velocidade maior que o glicerol, contudo apresenta maior toxicidade em temperatura ambiente, trazendo aos serviços à padronizada na condução de sua utilização, sendo feita sua adição lenta seguindo rapidamente do início do congelamento. O DMSO possui meia-vida de 20 horas sendo eliminado após infusão por via renal e respiratória.<sup>2,8</sup>

Dentre os não permeáveis destaca-se o hidroxietilamido (HEA) é uma macromolécula que reduz o efeito osmótico para o seu peso molecular, não se tem conhecimento por completo do mecanismo desse reagente, mas acredita-se que esteja relacionado com o auxílio da vitrificação do espaço exterior e quando associado a uma reagente permeável traz a diminuição do processo de desidratação celular. Existe a possibilidade de sua utilização ampliar as taxas e velocidades de congelamento tornando-se escolha preferencial na criopreservação com temperatura não programada em freezer mecânico -  $80^\circ\text{C}$ .<sup>2,8</sup>

Um terceiro elemento utilizado como solução crioprotetora é o conteúdo proteico. Sua relevância está na modificação da viscosidade da solução crioprotetora, é comum a utilização de plasma do próprio paciente ou como substituição solução de albumina.<sup>3</sup>

### **1.3 Concentração celular**

As CTH's podem ficar misturadas com outros materiais que não possuem relevância para o transplante pois nenhum processo de coleta traz um produto com apenas o material desejado para infusão. Tais componentes podem exercer influência no processo de congelamento e, neste caso, o produto pode ser manipulado para a redução do volume e como consequência ocasiona no aumento da concentração de células nucleadas.<sup>2</sup>

Há evidências que a quantidade de células nucleadas totais (TCN) no material criopreservado fica diretamente relacionado com o aumento da morte celular e perda da viabilidade. Feito justificado pelos possíveis granulócitos residuais que não resistiram a baixa temperatura sofrendo lise e liberando citocinas inflamatórias. Além da toxicidade, produtos com grande concentração celular podem conter presença de pequenos coágulos e agregados celulares.<sup>3</sup>

O protocolo para criopreservação de material obtido a partir da medula óssea trazia como sugestão a concentração celular máxima de  $2 \times 10^7$ /mL. Contudo ao usar o mesmo protocolo para produtos obtidos em sangue periférico teríamos a obtenção de um grande volume no produto final, e conseqüentemente o aumento do volume de crioprotetores para garantia da viabilidade do material.<sup>2,3</sup>

Existem estudos que demonstram que volumes superiores de células tronco hematopoiéticas obtiveram resultados positivos sem causar efeitos adversos e outros estudos apresentaram, resultados onde mesmo com concentrações elevadas ( $3,7 \times 10^8$ /mL) foi alcançado a estabilidade da viabilidade pós descongelamento. Contudo, ainda não existe definição sobre o limite superior aceitável para padronização.<sup>2,3</sup>

#### **1.4 Temperatura, velocidade de congelamento e armazenamento**

Depois que o produto recebe os crioprotetores, a bolsa é colocada entre duas placas de metal com intuito que a velocidade do congelamento aconteça homogeneamente por todo o volume. A partir desse momento pode-se optar em equipamento tenha a velocidade de congelamento programado, onde o produto é exposto a uma temperatura baixa progressiva em torno de 1 a  $2-3^\circ\text{C}/\text{minuto}$ , até atingir  $-40^\circ\text{C}$  onde o processo é acelerado até  $-12^\circ\text{C}$ . Ou a possibilidade do freezer mecânico  $-80^\circ\text{C}$ , podendo ser posteriormente transferido para tanque de nitrogênio líquido ( $-196^\circ\text{C}$ ). Existindo também a possibilidade de manter o material em freezer  $-80^\circ\text{C}$  até a solicitação do produto para infusão.<sup>3, 4</sup>

A taxa de congelamento influencia diretamente na viabilidade. Entende-se que o fluxo da água sendo mais rápido que o fluxo de calor impede que tenha a cristalização dentro da célula aumentando a vida celular. Contudo se os dois fluxos forem proporcionais a cristalização ocorrerá e a vitrificação intracelular provocará a morte da célula. <sup>2,4</sup>

O armazenamento da CTH's deve proporcionar total impedimento das vias enzimáticas, logo devem ser manter o mais estáveis no modo de estocagem escolhido, com monitoramento constante e o cuidado na abertura e manipulação do equipamento evitando exposição capazes de trazer dano celulares.<sup>2,4,3</sup>

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Entende-se que dentro do escopo do transplante de células tronco hematopoiéticas a criopreservação tem atuação relevante para abrir possibilidades frente ao tratamento médico necessário. Sua utilização traz grandes benefícios sendo importante salientar que todos o processo é rigoroso e delicado sendo necessário manter constantes treinamento e atualização para a garantia da segurança do paciente e melhoria do serviço ofertado. Nessa área faz-se necessária a bom alinhamento da equipe do laboratório e médica para alcance do objetivo comum.

## **REFERENCIA BIBLIOGRAFICA**

1. Freire NCB, Rodrigues AB, Almeida PC de et al. Reações adversas relacionadas à infusão de células tronco hematopoiéticas. Revista de Enfermagem UFPE. Recife, 9(supl. 1):391-8, jan., 2015
2. Santis GC; Prata KL. Criopreservação de células-progenitoras hematopoiéticas. Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP, Ribeirão Preto, v.42, n.1, p.36-47, jan./mar. 200
3. Fischer GB, Alegre P. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul Faculdade De Medicina Programa De Pós-Graduação Em Medicina: Ciências Médicas Tese De Doutorado Efeito Da Concentração E Combinação De Crioprotetores Na Viabilidade Medida Por Citometria De Fluxo Das Células Tronco Hematopoiéticas Congeladas Em Freezer Mecânico. 2014
4. Timoteo MA; Sousa WB; Lopes ICR et al. Criopreservação de células tronco e suas aplicações. Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação; Vol 1, No 1 (Año 2014).

5. INCA, perguntas e respostas sobre o transplante de medula óssea e o cadastro do doador. Ver em: <http://redome.inca.gov.br/campanhas/perguntas-e-respostas-campanha/>. Acesso em 09 DE outubro DE 2018
6. Silva A Da, Rodrigues C, Silva M Da. Avanços Tecnológicos Na Criopreservação De Células-Tronco E Tecidos, aplicados a Terapia Celular. Rev Da Biol [Internet]. 2017
7. Hubel, A. Parameters Of Cell Freezing: Implications For The Cryopreservation Of Stem Cells. Tranfusion Medicine Reviews, Estados Unidos, V. 11, N. 3, P. 224-233, Jul. 1997.
8. Gatti, L. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. Tese de Mestrado. Revisão sistemática de literatura em células-tronco hematopoiéticas Implicação da metodologia de criopreservação.