

# Avanços tecnológicos na criopreservação de células-tronco e tecidos, aplicados à terapia celular

Technological advances in the cryopreservation of stem cells and tissues, applied to cellular therapy

**Artur Alves Rodrigues da Silva, Cláudio Gabriel Rodrigues, Marcia Bezerra da Silva\***

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-tronco – Dr. Oleg Krasilnikov.

\*Contato: mbsilva05@gmail.com

**Resumo.** As pesquisas com células-tronco visam melhorias na qualidade de vida da população por meio da terapia celular. Apesar das pesquisas vigentes demonstrarem a efetividade da aplicação dessas células no processo de regeneração de diversos tecidos, o único tratamento efetivo de rotina são os transplantes de células-tronco sanguíneas. Contudo, as dificuldades referentes à disponibilidade de células-tronco para aplicação clínica a médio e longo prazo, expôs um cenário carente de bancos de células-tronco e tecidos criopreservados. O processo de criogenia permite a preservação de células e tecidos por meio da aplicação de agentes crioprotetores em temperaturas adequadas, dois fatores necessários para o sucesso dessa técnica. As pesquisas nessa área são importantes e promissoras, permitindo a utilização segura das células-tronco na terapia celular.

**Palavras-chaves.** Células-tronco; criopreservação

Recebido:  
28nov2016  
Aceito:  
16fev2017  
Publicado:  
25ago2017

Editado por Carlos  
Vilela e revisado  
por Anônimo

**Abstract.** The stem cell research aims improvement on population life quality through cellular therapy. Despite the current research demonstrating the effectiveness of these cells in different tissue regeneration process, the unique effective treatment is blood stem cells transplant. However, the hardships to maintain stem cell availability for clinical application for long and midterm expose a scenario that lacks banks of both cryopreserved stem cells and tissues. The cryogenic process allows the stem cells and tissues preservation through application of cryoprotectants in adequate temperatures; two necessary factors to be successful on this technique. Researches on this area are important and promising, allowing the safe stem cells use on cell therapy.

**Keywords.** Stem cell; Cryopreservation

## Introdução

O acelerado desenvolvimento científico e consequentemente o gigantesco avanço tecnológico das últimas décadas vêm revolucionando a qualidade de vida e longevidade do ser humano. Dentro desse contexto surgiu a terapia celular, visando restabelecer a integridade e o funcionamento dos tecidos e órgãos lesados, a partir da utilização de células-tronco. Considerada uma das maiores descobertas dos últimos tempos, as células-tronco vêm sendo utilizadas para o tratamento de muitas doenças degenerativas e autoimunes (Zorzanelli *et al.*, 2015). Contudo as limitações quanto à estabilidade em cultura depois de várias passagens, bem como a necessidade de criopreservação dessas células por longos períodos com garantia de suas funções, para aplicações clínicas, levaram à busca e ao desenvolvimento de novos

protocolos de criopreservação (Chatzistamatiou *et al.*, 2014). O principal objetivo é cessar de maneira controlada e reversível, todas as funções biológicas das células em temperaturas ultrabaixas. A viabilidade obtida após submeter as células a esse processo, depende basicamente de sua capacidade de resistir à desidratação e ao dano mecânico decorrente da formação de cristais de gelo no seu interior (Marquez-Curtis *et al.*, 2015). Diversos protocolos de criopreservação vêm sendo apresentados visando eliminar ou minimizar a formação dos cristais de gelo, visto que os danos provocados por estes cristais prejudicam a capacidade de proliferação das células, levando-as quase sempre a morte. A necessidade cada vez maior de estocar células-tronco e tecidos que contém essas células vem despertando o interesse em aprimorar as técnicas de congelamento para que no descongelamento um percentual elevado de células viáveis

veis seja preservado. De forma que as células-tronco a serem utilizadas para transplantes futuros, visando o tratamento de doenças hematológicas, neoplásicas e genéticas (Miyazaki e Suemori, 2014), sejam corretamente preservadas e possam permanecer por mais tempo no ambiente crioprotetor. Nesse trabalho de revisão abordamos os principais avanços na área da criopreservação.

## Células-tronco

O termo “Célula-tronco” (CT) foi introduzido na literatura em 1868 pelo biólogo alemão Ernst Haeckel (Ramalho-Santos e Willenbring, 2007). Este termo foi utilizado para descrever um organismo unicelular, o qual se presumia estar envolvido com a origem de todos os organismos multicelulares. As células-tronco podem ser classificadas em embrionárias e não embrionárias (adultas). Todas essas células, em última análise, provêm de uma única célula inicial, resultante da fecundação do óvulo pelo espermatozoide, a chamada célula-ovo ou zigoto (Fischbach e Fischbach, 2004). As células-tronco embrionárias podem ser: *totipotentes*, são células com capacidade de se diferenciar em qualquer tipo de tecido, incluindo os anexos embrionários, podem ser encontradas no início do desenvolvimento embrionário, ou mais especificamente, até a fase de mórula (terceiro dia de desenvolvimento); e *pluripotentes* que são as células-tronco embrionárias retiradas da massa celular interna do blastocisto (quinto dia de desenvolvimento), apresentam a capacidade de se diferenciar nos grupos celulares dos três folhetos germinativos com exceção dos anexos extra-embrionários. As células-tronco adultas têm seu potencial mais limitado que as embrionárias e geralmente são tecido-específicas. Elas são divididas em duas categorias: as multipotentes que dão origem a diferentes tipos celulares dentro de suas respectivas camadas germinativas, a exemplo das células-tronco hematopoéticas (CTHs) e mesenquimais (CTMs); e as *unipotentes* que dão origem a apenas um tecido, a exemplo das células-tronco presentes no tecido nervoso e nos testículos (Hunt et al., 2011; Marquez-Curtis et al., 2015). Inicialmente o consenso era de que apenas as células-tronco embrionárias poderiam se diferenciar em células de origem ectodérmica, mesodérmica e endodérmica. Porém Takahashi e colaboradores (2007) induziram células adultas (fibroblastos) ao estado de pluripotência por meio da introdução de retrovírus transfectados com vários fatores de transcrição, sendo os principais Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4. Esses fatores induziram essas células a adquirirem características morfológicas e proliferativas, de expressão

gênica e de formação de teratomas, semelhantes às células-tronco embrionárias, a partir de então, denominadas células-tronco pluripotentes induzidas (CTPi). Esses resultados quebraram o dogma de que a diferenciação celular seria um processo unidirecional, iniciando uma nova fase na biologia das células-tronco (Yu et al., 2007; Park et al., 2008).

## Aplicações terapêuticas

Diversos estudos com células-tronco demonstraram que estas são capazes de promover o reparo de órgãos e tecidos, devido as suas propriedades de diferenciação celular e secreção de fatores. Acredita-se que futuramente as terapias celulares irão oferecer tratamentos para muitas doenças que hoje são consideradas incuráveis e para as quais, a única solução terapêutica disponível é o transplante de órgãos. Vale ressaltar que no Brasil as únicas terapias celulares realizadas rotineiramente e regulamentadas são os transplantes de células-tronco hematopoéticas, procedimento baseado na sua infusão intravenosa para a reconstituição da medula óssea do paciente por precursores sanguíneos (Voltarelli, 2002). Atualmente o transplante de células-tronco do sangue é reconhecido como um tratamento efetivo para doenças hematológicas neoplásicas (leucemias, linfomas) ou não-neoplásicas (anemia aplástica, talassemia, anemia falciforme) ou doenças metabólicas (Simões et al., 2010). Entretanto há diversos estudos que estão avaliando a possibilidade da aplicação de células-tronco de diversas fontes, em pesquisas clínicas para o tratamento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como diabetes, doenças cardiovasculares, do sistema nervoso e odontológicas (Ma et al., 2012; Pereira e Queiroz, 2013). O cenário desejado para a medicina regenerativa inclui a imediata disponibilidade das células-tronco. No entanto, o pequeno percentual adquirido a partir de tecidos frescos, confirmou que a criopreservação é um processo essencial para a manutenção das células-tronco com fins terapêuticos (Marquez-Curtis et al., 2015).

## Bancos de Criopreservação

O sucesso dos transplantes com CTHs para o tratamento de doenças hematológicas benignas e malignas despertou o interesse para o armazenamento dessas células em bancos de criopreservação. As CTHs apresentam como fontes clássicas a medula óssea e o sangue do cordão umbilical. Os transplantes alogênicos das CTHs, a partir da medula óssea de doadores compatíveis é extremamente restrito devido a resposta autoimune gerada no hospedeiro, di-

minuindo o interesse na criopreservação das CTHs provenientes dessa fonte. Já as CTHs derivadas do sangue do cordão umbilical, tornaram-se uma fonte alternativa, pois diminuem os problemas de incompatibilidade (Voltarelli e Stracieri, 2000). O primeiro transplante utilizando CTHs do sangue do cordão umbilical foi realizado em 1989 (Gluckman *et al.*, 1989) e o primeiro banco de criopreservação foi estabelecido em 1993, desde então este procedimento vem ganhando destaque e aceitação no cenário mundial, ampliando o número de bancos no mundo. Outra possibilidade promissora é a criopreservação das CTMs, que podem ser isoladas a partir da medula óssea, tecido adiposo, sangue do cordão umbilical e outros tecidos. O interesse científico e clínico nesse tipo celular também cresceu nos últimos anos, devido ao seu potencial na medicina regenerativa (Marquez-Curtis *et al.*, 2015). Roy e colaboradores (2014), utilizaram vários protocolos com concentrações diferentes de crioprotetores para obtenção de CTMs com maior viabilidade e capacidade proliferativa após o descongelamento. Muitos estudos como esse, estão sendo realizados para estabelecer protocolos padronizados, os quais possibilitem o armazenamento em larga escala das CTMs, a exemplo das CTHs (Chatzistamatiou *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2012). Os estudos confirmam que as células-tronco embrionárias (CTEs) apresentam excelente plasticidade e, portanto são também ferramentas atrativas na aplicação terapêutica. Contudo foi evidenciada a sensibilidade dessas células quanto aos métodos tradicionais de criopreservação, prejudicando sua expansão e diferenciação *in vitro*. Alguns estudos iniciais sugerem a utilização da vitrificação como método benéfico na conservação desse tipo celular (Li *et al.*, 2010). Também há relatos de que algumas soluções melhoram a taxa de recuperação das CTEs após o período de criopreservação. No entanto, as questões inerentes à criação de bancos de criopreservação das CTEs ainda exigem muitos estudos, pois não há até o momento, um método padrão que garanta a viabilidade necessária dessas células (Li e Ma, 2012).

### Criopreservação

Com o objetivo de armazenar CTMs por longos períodos para posterior utilização na terapia celular, novos protocolos de criopreservação estão sendo desenvolvidos, a exemplo dos bancos de células-tronco do sangue de cordão umbilical humano (Da-Croce *et al.*, 2013). O resfriamento de células e tecidos interfere nas diversas vias metabólicas, na diminuição da atividade da bomba de sódio e potás-

sio e na mudança de fase dos lipídios da membrana plasmática, interferindo na função de enzimas e na precipitação de substâncias. Nas técnicas de criopreservação, as células são primeiramente tratadas com agentes crioprotetores, a fim de protegê-las dos danos causados pela desidratação ou geração de cristais de gelo que se formam dentro das células durante o resfriamento. Estes dois tipos de lesões estão correlacionados com a velocidade com que a suspensão celular é congelada; o primeiro ocorre em baixas velocidades, já o segundo, em altas velocidades de congelamento. Os procedimentos que são aplicados na tentativa de minimizar esses danos são basicamente dois: a utilização de agentes crioprotetores e a aplicação adequada da temperatura de congelamento (Lauterboeck *et al.*, 2016). Os crioprotetores são substâncias químicas utilizadas para diminuir os danos causados no processo de criopreservação, podem agir interna ou externamente na célula ou no tecido. Os crioprotetores apresentam ação coligativa com as moléculas de água, evitando a formação de gelo intracelular ou ainda reduzindo os danos causados pelas altas concentrações dos solutos presentes na suspensão de células, evitando a desidratação das proteínas. Os crioprotetores são divididos em duas categorias: *permeáveis* ou *intracelulares*, que podem passar pelas membranas celulares, como o dimetil-sulfóxido (DMSO), glicerol, etilenoglicol (EG); e *não permeáveis* ou *extracelulares*, que não são capazes de penetrar nas células e nos tecidos por serem macromoléculas com alto peso molecular, entre eles se destacam os açúcares complexos como a trealose e sacarose (Cui *et al.*, 2007; Motta *et al.*, 2010). Todavia, a utilização dos crioprotetores deve ser moderada, pois apesar da proteção, eles podem ser tóxicos para as células e tecidos, principalmente se usados em altas concentrações, isso se deve em parte à retenção exagerada de água citoplasmática, elevando a formação de cristais de gelo. Outro fator crucial para o sucesso da criopreservação é a temperatura de armazenamento. Alguns estudos sugerem que culturas mantidas entre -70 e -90 °C podem ficar estáveis por meses ou anos. Porém, a manutenção em nitrogênio líquido a -196 °C previne efetivamente as células e tecidos contra os danos e as modificações que acontecem e se acumulam quando as amostras são congeladas a -90 °C (Santis e Prata, 2009).

### Crioprotetores permeáveis

São caracterizados por serem substâncias com baixa massa relativa, ausência de carga residual, alta solubilidade em meio aquoso, penetrando na célula. A ação desses agentes em reduzir os danos cau-

sados pelo processo de criogenia se deve, em grande parte, as estruturas dessas substâncias, as quais fazem ligações de hidrogênio com as moléculas da água; além de prevenir a exposição das células a elevadas concentrações de eletrólitos. As características químicas desses compostos diminuem a formação de cristais de gelo, contribuindo desta forma para estabilização das biomembranas. Neste grupo se encontram o DMSO, glicerol e EG como os principais agentes crioprotetores (Hunt *et al.*, 2011). O DMSO é um composto incolor e inodoro com capacidade de absorção de umidade, usado na indústria como solvente. É uma substância composta por um grupo sulfóxido hidrofílico e dois grupos metila hidrofóbicos. O DMSO é o crioprotetor mais utilizado devido a sua propriedade coligativa com moléculas de água livres, diminuindo a temperatura do ponto de congelamento (Castro *et al.*, 2011). Estudos como o de Liu e colaboradores (2008), utilizaram o DMSO para analisar a influência da criopreservação sobre a capacidade de diferenciação e proliferação das células-tronco mesenquimais. Após 24 horas de congelamento, as células foram descongeladas, plaqueadas e submetidas ao meio indutor. Os resultados desse estudo demonstraram que a criopreservação com DMSO não altera significativamente a capacidade de diferenciação e proliferação das CTMs, além de produzir uma matriz mineralizada, um avanço para a engenharia de tecidos (Liu *et al.*, 2008). Além da utilização *in vitro*, muitos estudos analisam o armazenamento de célula-tronco hematopoéticas para transplantes, acentuando a necessidade de permanecer protegidas em bancos de sangue. No entanto sob essa perspectiva, a utilização do DMSO pode afetar o paciente devido a sua toxicidade, causando náuseas, dor de cabeça, hipotensão e outros sintomas mais graves, além de causar alterações químicas nas células como a produção de radicais livres que levam a lesão celular e a sua inviabilidade. Para minimizar esses efeitos tóxicos, antioxidantes, como o ácido ascórbico é combinado com baixas concentrações de DMSO (Motta *et al.*, 2010). O glicerol por sua vez foi um dos primeiros crioprotetores a ser utilizado no congelamento de células. O uso do glicerol em soluções crioprotetoras reduz os efeitos da desidratação, diminuindo o acúmulo de sais no interior da célula. Porém a redução desses efeitos dependerá da relação molar entre o soluto neutro (glicerol) e tóxicos (sais). Logo, se as concentrações de sais forem baixas, a ação crioprotetora do glicerol será efetiva (Precht *et al.*, 1973). Nesse contexto, Oishi e colaboradores (2008) demonstraram a eficiência desse crioprotetor na conservação das células-tronco derivadas do tecido adiposo. Contudo, Roy e colaboradores (2014),

evidenciaram que a utilização do glicerol junto a sacarose na criopreservação das CT não foi eficaz quando comparado com a capacidade proliferativa das células não criopreservadas. Uma das limitações pode estar relacionada à maneira lenta com que o glicerol penetra nas células, dificultando sua ação efetiva na atenuação dos efeitos da desidratação (Meryman, 2007; Roy *et al.*, 2014). O outro reagente utilizado para crioproteção é o EG assim como o DMSO, é incolor e inodoro, além de ser pouco volátil em temperatura ambiente, quando adicionado à água eleva o ponto de ebulição da mistura, ao mesmo tempo em que reduz o ponto de congelamento (Castro *et al.*, 2011). Em alguns estudos o EG foi utilizado junto ao DMSO com o intuito de atenuar o choque osmótico causado pelo DMSO, contribuindo para a melhor recuperação da célula e prevenindo apoptose (Imaizume *et al.*, 2014). Imaizume e colaboradores (2014) padronizaram uma solução de criopreservação composta por hidroxietil-amido (HES) e DMSO em salina, com 5% de EG, a qual apresentou um desempenho superior (80%) na recuperação das células-tronco pluripotentes humanas, quando comparada com o desempenho (20%) das formulações existentes no mercado. No entanto ainda não se conhece o mecanismo de ação do EG na atenuação dos efeitos deletérios do DMSO sobre as células-tronco.

### Crioprotetores não permeáveis

Esse grupo de crioprotetores atua aumentando a osmolaridade do meio extracelular, promovendo a passagem de água do interior das células para o meio extracelular, o que impede a formação de cristais de gelo em seu interior durante o congelamento. Os agentes crioprotetores não penetrantes são moléculas com massa relativa alta, como os açúcares trealose e sacarose (Hunt *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2008). A utilização dos crioprotetores naturais está relacionada com a sua baixa toxicidade quando comparados ao DMSO, pois como já foi discutido, o uso do DMSO está relacionado com diversos efeitos nocivos quando as células-tronco são transplantadas para o hospedeiro. O mecanismo proposto para a ação desses dissacarídeos é baseado na capacidade dessas substâncias fornecerem uma maior proteção para a membrana celular devido a interação com os grupos de fosfolipídios da membrana plasmática (Rodrigues *et al.*, 2008; Balci e Can, 2013). A partir desses achados diversos estudos passaram a utilizar soluções de criopreservação contendo 30 mM/L de trealose, 2,5% de DMSO ou 60 mM/L de sacarose e 5% de DMSO. Os resultados foram semelhantes aos das soluções nas quais foram utilizados apenas



10% de DMSO (Rodrigues *et al.*, 2008). Balci e Can (2013) relataram que soluções com concentração padrão de DMSO (10%) podem apresentar redução dos efeitos tóxicos se estiverem na presença de 100 mM de sacarose. Os resultados desse estudo comprovaram que o perfil proliferativo e imunofenotípico das células-tronco foram preservados. Estudos realizados por Solocinski e colaboradores (2017) demonstraram que a trealose quando adicionada as soluções de criopreservação, diminuem o tamanho dos cristais de gelo, atenuando os danos físicos causados pelo gelo intracelular.

### Taxa de Congelamento

Os procedimentos com resultados bem sucedidos para o congelamento de células e tecidos são de extrema importância para a terapia celular, e controlá-los é crucial e necessário, pois a quantidade de calor que é liberada no momento do resfriamento diminui severamente a população de células-tronco após o descongelamento. Atualmente existem protocolos que empregam equipamentos para controlar a taxa de congelamento. Dessa forma, o tempo de congelamento é igualmente distribuído entre as células, diminuindo os danos causados pelo procedimento (Marquez-Curtis *et al.*, 2015). Nesse procedimento de criopreservação controlado, as células-tronco do cordão umbilical, medula óssea, células do sangue periférico ou tecidos, Geleia de Wharton, tecido adiposo entre outros, sofrem diminuição de 1-2 °C/min (taxa ideal 1 a 3 °C/min) até atingirem -40 °C. Após atingir esta temperatura, a taxa de congelamento aumenta de forma mais rápida (3-5 °C/min), até chegar a -120 °C (Berz *et al.*, 2007). Outra forma de controlar o congelamento das células é através do uso de congeladores mecânicos. Com esses equipamentos, as células são inicialmente resfriadas a -4° C, depois transferidas para o *ultra low freezer* a -80 °C e logo após, transferidas para -120 °C (Berz *et al.*, 2007). Os estudos confirmaram que esse processo é seguro e que não há diferença de viabilidade entre os dois métodos, desde que as células sejam mantidas a -120° C até o momento do uso.

### Considerações finais

O número cada vez maior e diversificado de estudos com células-tronco vem ampliando as possibilidades de aplicações em várias terapias regenerativas. Conforme citado ao longo do texto, alguns desses procedimentos já foram utilizados em seres humanos. Novas metodologias estão sendo constantemente desenvolvidas e testadas, visando a regene-

ração de tecidos, e recuperação de pacientes de uma maneira mais rápida e sem sequelas. Muitos esforços estão sendo somados para que as células-tronco sejam preservadas qualitativa e quantitativamente após o processo de criopreservação, no intuito de garantir a disponibilidade tanto imediata quanto tardia dessas células nas aplicações clínicas. O alto custo e a escassez de bancos de criopreservação de células e tecidos limitam os tratamentos, ficando restrito às pessoas economicamente privilegiadas. Acreditamos que o aperfeiçoamento das técnicas de criopreservação permitirá a disponibilização desses tratamentos com baixos custos, beneficiando a sociedade como um todo, através dos serviços públicos de saúde.

### Referências Bibliográficas

- Balci D, Can A. 2013. The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking. *Current stem cell research & therapy*, 8(1): 60-72.
- Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. 2007. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *American Journal of Hematology*. 82(6): 463-472.
- Castro SV, Carvalho AA, Silva CM, Da silva CMG, Faustino LR, Figueiredo JR, Rodrigues APR. 2011. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 39(2): 1-18.
- Chatzistamatiou TK, Papassavas AC, Michalopoulos E, Gamaloutsos C, Mallis P, Gontika I, Panagouli E, Koussoulakos SL, Stavropoulos-Giokas C. 2014. Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Whartons jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: An MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transfusion*, 54(12): 3108-3120.
- Cui XD, Gao DY, Fink BF, Vasconez HC, Pu LLQ. 2007. Cryopreservation of human adipose tissues. *Cryobiology*, 55(3): 269-278.
- Da-Croce L, Gambarini-Paiva GHR, Angelo PC, Bambilra EA, Cabral ACV, Godard ALB. 2013. Comparison of vitrification and slow cooling for umbilical tissues. *Cell and Tissue Banking*, 14(1): 65-76.
- Fischbach GD, Fischbach RL. 2004. Stem cells: Science, policy, and ethics. *Journal of Clinical Investigation*, 114(10): 1364-1370.
- Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, Cooper S, English D, Kurtzberg J, Bard J, Boyse EA. 1989. Hematopoietic reconstitution in a patient with fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an hla-identical sibling. *N engl j med*, 321: 1174- 1178.
- Hunt CJ. 2011. Cryopreservation of human stem cells for clinical application: A review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 38(2): 107-123.
- Imaizumi K, Nishishita N, Muramatsu M, Yamamoto T, Takenaka C, Kawamata S, Kobayashi K, Nishikawa S, Akuta T. 2014. A Simple and Highly Effective Method for Slow-Freezing Human Pluripotent Stem Cells Using Dimethyl Sulfoxide, Hydroxyethyl Starch and Ethylene Glycol. *PLoS ONE*,

- 9(2): e88696.
- Lauterboeck L, Wolkers WF, Glasmacher B. 2016. Cryobiological parameters of multipotent stromal cells obtained from different sources. *Cryobiology*, xxx: 1-10.
- Li Y, Tan J-C, Li L-S. 2010. Comparison of three methods for cryopreservation of human embryonic stem cells. *Fertility and sterility*, 93(3): 999-1005.
- Li Y, Ma T. 2012. Bioprocessing of cryopreservation for large-scale banking of human pluripotent stem cells. *BioResearch open access*, 1(5): 205-14.
- Liu G, Zhou H, Li Y, Li G, Cui L, Liu W, Cao Y. 2008. Evaluation of the viability and osteogenic differentiation of cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Cryobiology*, 57(1): 18-24.
- Ma L, Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Hoshino Y, Song G, Kukita T, Nonaka K, Shi S, Yamaza T. 2012. Cryopreserved Dental Pulp Tissues of Exfoliated Deciduous Teeth Is a Feasible Stem Cell Resource for Regenerative Medicine. *PLoS ONE*, 7(12).
- Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JAW. 2015. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. Academic Press Inc, 71(2): 181-197.
- Meryman HT. 2007. Cryopreservation of living cells: Principles and practice. *Transfusion*, 47(5): 935-945.
- Miyazaki T, Suemori H. 2014. Cryopreservation of human pluripotent stem cells: a general protocol. *Methods in molecular biology*, 1235: 97-104.
- Motta JPR, Gomes BE, Bouzas LF, Paraguassú-Braga FH, Porto LC. 2010. Evaluations of bioantioxidants in cryopreservation of umbilical cord blood using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. *Cryobiology*, 60(3): 301-307.
- Oishi K, Noguchi H, Yukawa H, Miyazaki T, Kato R, Kitagawa Y, Ueda M, Shuji H. 2008. Cryopreservation of mouse adipose tissue-derived stem/progenitor cells. *Cell Transplantation*, 17(1-2): 35-41.
- Park I-H, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451(7175): 141-6.
- Pereira LC, Queiroz PR. 2013. Terapia celular em tratamento de doenças do sistema nervoso. *Universitas: Ciências da Saúde*, 11(1): 29-41.
- Ramalho-Santos M, Willenbring H. 2007. On the Origin of the Term "Stem Cell." *Cell Stem Cell*, 1(1), 35-38.
- Rodrigues JP, Paraguassú-Braga FH, Carvalho L, Abdelhay E, Bouzas LF, Porto LC. 2008. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cryobiology*, 56(2): 144-151.
- Roy S, Arora S, Kumari P, Ta M. 2014. A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Whartons jelly mesenchymal stem cells. *Cryobiology*, 68(3): 467-472.
- Santis GCD, Prata KDL. 2009. Criopreservação de células progenitoras hematopoéticas. *Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP*, 42(1): 36-47.
- Simões BP, Pieroni F, Barros GMN, Machado CL, Cançado RD, Salvino MA, Angulo I, Voltarelli JC. 2010. Consenso Brasileiro em Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas: Comitê de Hemoglobinopatias. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 32(1): 46-53.
- Solocinski J, Osgood Q, Wang M, Connolly A, Menze MA, Chakraborty N. 2017. Effect of trehalose as an additive to dimethyl sulfoxide solutions on ice formation, cellular viability, and metabolism. *Cryobiology*, xxx: 1-10.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5): 861-872.
- Precht H, Christophersen J, Hensel H, Larcher W. 1973. *Temperature and life* (1a ed.). Verlag Berlin Heidelberg New York: Springer.
- Voltarelli JC, Stracieri ABPL. 2000. Aspectos imunológicos dos transplantes de células-tronco hematopoéticas. *Medicina*, 33: 443-462.
- Voltarelli J. 2002. Transplante de células tronco hematopoéticas para doenças auto-imunes no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 24(1): 9-13.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858): 1917-1920.
- Zorzanelli RT, Speroni AV, Menezes RA, Leibing A. 2015. Pesquisa com células-tronco no Brasil: a produção de um novo campo científico. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 20(2): 653-673.