

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDOS DE
CORDÃO UMBILICAL**

ORIENTADA: Lilian Da Croce

ORIENTADORA: Ana Lúcia Brunialti Godard

CO-ORIENTADORA: Greicy Helen Ribeiro Gambarini Paiva

BELO HORIZONTE - MG

2011

LILIAN DA CROCE

CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDOS DE CORDÃO UMBILICAL

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Brunialti Godard

Co-orientadora: Dr^a. Greicy Helen Ribeiro Gambarini Paiva

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte - MG

2011

Mestranda: Lilian Da Croce

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia Brunialti Godard

Co-orientadora: Dr^a Greicy Helen Ribeiro Gambarini Paiva

Colaboradores: Prof. Dr. Eduardo Alves Bambirra

Prof. Dr. Antônio Carlos Vieira Cabral

Ms. Patrícia Caroline Ângelo

Dr. Ricardo Santoro Meirelles

Linha de Pesquisa

Bases Moleculares de Patologias Humanas

Área de Conhecimento

Genética

Instituições participantes

Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

Instituto Hermes Pardini

Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas – UFMG

Dedico este trabalho aos meus pais, Ana e Degmar, às minhas irmãs Ana Paula e Ana Caroline, à minha família e ao Caligo, que sempre me incentivaram a progredir, buscar meus objetivos e me deram força nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard, pela calorosa recepção em seu laboratório e orientação deste trabalho.

À Dra. Greicy Helen R. Gambarini Paiva, pela amizade e enorme dedicação na co-orientação deste trabalho.

A todos os amigos e colaboradores do setor de Citogenética do Hermes Pardini, que me incentivaram e auxiliaram para que este trabalho fosse realizado. Agradeço em especial à coordenadora Cristiane Saraiva Ferreira, pela oportunidade e paciência, à Patrícia Caroline Ângelo, pelo treinamento e enorme aprendizado, à Cristiane Maria pelas experiências compartilhadas, à Soraia Patrícia pela dedicação e apoio. A todos grandes amigos e amigas, muito obrigada!

Ao setor e colaboradores do Criovida, pela abertura para os experimentos de congelamento.

Aos colaboradores do setor de Anatomia Patológica, em especial ao Dr. Eduardo Bambirra pela realização da análise histológica.

À equipe de médicos e enfermeiros do Hospital das Clínicas, pela recepção e auxílio na coleta das amostras.

Em especial a todas as mães participantes deste trabalho, que tornaram possível a realização do mesmo e compartilharam experiências e emoções de seu momento tão especial.

À Carla Rasuck, pela amizade e revisão do artigo.

Ao Hermes Pardini, pela oportunidade, apoio e financiamento deste trabalho.

À Pós-Graduação em Genética, coordenadores e secretárias pela disponibilidade e atenção.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. CRIOPRESERVAÇÃO	4
1.1.1. Vitrificação ou congelamento rápido	6
1.1.2. Congelamento lento ou programado	8
1.1.3. Comparação dos métodos de vitrificação e congelamento lento na criopreservação de tecidos	11
1.2. O CORDÃO UMBILICAL	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. ARTIGO “Comparison of vitrification and slow cooling for umbilical tissues”	18
4. CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS	39
5. CONCLUSÕES	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
7. APÊNDICE	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Constituição do cordão umbilical humano.....	13
Figure 2: Experiment outline	21
Figure 3: Histology of the umbilical cord tissue	25
Figure 4: Slow cooling effect on cell viability of the tissue from the umbilical cord	27
Figure 5: Distribution of culture period to obtain 80% confluence	28

LISTA DE TABELAS

Table 1: Results of cell viability, cell culture period, histological and cytogenetic analysis for the tissue of the umbilical cord, Wharton's jelly and cord lining membrane, divided into three groups: fresh (control), post-slow cooling and post-vitrification 26

Tabela 2: Resultados da viabilidade celular, tempo em cultivo celular, análise histológica e análise citogenética para os dois tecidos estudados do cordão umbilical (geléia de Wharton e membrana de revestimento), divididos nos grupos: a fresco (controle), pós-congelamento a -80°C e pós-vitrificação 42

LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO - dimetil sulfóxido

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa

RESUMO

A criopreservação de tecidos mantém o metabolismo celular em estado de quiescência e torna possível sua conservação por tempo indeterminado, possibilitando seu uso futuro para diversos fins. Neste estudo, foram testados os métodos congelamento lento e vitrificação para a criopreservação de tecidos do cordão umbilical, geléia de Wharton e membrana de revestimento. Foram avaliadas 10 amostras, das quais pequenos fragmentos de tecidos foram separados em três grupos: controle (a fresco), congelamento lento e vitrificação. As amostras ficaram congeladas por período de tempo que variou de 5 a 78 dias. Os resultados da análise histológica, viabilidade celular, cultivo celular e análise citogenética foram comparados antes e após os processos de criopreservação, para a avaliação da eficiência dos processos. Alternativamente, foi testado um terceiro método de criopreservação, através do congelamento em freezer -80°C em outras três amostras de cordão umbilical. Os resultados mostraram que o protocolo de congelamento lento utilizado se mostrou mais eficiente que o da vitrificação para criopreservação dos tecidos de cordão umbilical, uma vez que causou menos alterações na estrutura dos tecidos (edema e degeneração do epitélio) e, apesar da diminuição significativa da viabilidade celular em relação às amostras a fresco, a capacidade de proliferação celular *in vitro* foi preservada na maioria das amostras. Em conclusão, este estudo mostrou que é possível criopreservar pequenos fragmentos de tecidos do cordão umbilical e, após o descongelamento, se obter células viáveis com capacidade de proliferação *in vitro*, contribuindo para a criação de um banco de tecidos congelados.

ABSTRACT

The tissue cryopreservation maintains the cellular metabolism in a quiescence state and makes the conservation possible for an indefinite period of time. The choice of an appropriate cryopreservation protocol is essential for maintenance of cryopreserved tissue banks. This study evaluated 10 samples of umbilical cord, from which small fragments of tissue (Wharton's jelly and cord lining membrane) were subjected to two protocols of cryopreservation: slow cooling and vitrification. The samples were frozen for a period of time ranging from 5 to 78 days. The efficiency of cryopreservation was evaluated by testing cell viability, histological analysis, cell culture, cytogenetic analysis and comparison with the results of the fresh samples. Alternatively, for three other samples of umbilical cord, we tested a third cryopreservation protocol by freezing at -80°C . The results showed that the slow cooling protocol was more efficient than the vitrification for cryopreservation of umbilical cord tissue, because it has caused fewer changes in the structure of tissue (edema and degeneration of the epithelium) and, despite the significant decrease cell viability compared to fresh samples, the ability of cell proliferation in vitro was preserved in most samples. In conclusion, this study showed that it is possible to cryopreserve small fragments of tissue from the umbilical cord and, to obtain viable cells capable of proliferation in vitro after thawing.

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A criobiologia é a ciência que estuda os efeitos das baixas temperaturas na manutenção da vida das células, tecidos e órgãos. A criopreservação (congelamento de células e/ou tecidos) tem o objetivo de manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado (GREEN, 2005). A criopreservação tem sido realizada com sucesso em muitas espécies de mamíferos, incluindo camundongos, bovinos e humanos (FAHY et al., 2004; DINNYES et al., 2000; QUINN et al., 1986), e há tempos já contribui com a medicina através de bancos de esperma ou de embriões congelados, seja para reprodução assistida ou para preservação da fertilidade em pacientes sob tratamento quimioterápico (FAHY et al., 2006).

Uma grande contribuição da criopreservação é possibilitar a conservação de células e tecidos, permitindo a criação de bancos de tecidos congelados, que podem ter aplicações numa variedade de estudos, além de aplicações clínicas, como por exemplo a utilização de células-tronco em terapias celulares. Para que seja possível o estabelecimento de um banco de tecidos e utilização das células pós-congelamento, há a necessidade de se utilizar protocolos que recuperem a viabilidade das células e a estrutura dos tecidos após a criopreservação. Vários estudos mostraram sucesso em desenvolver protocolos de congelamento adequados para criopreservação de tecidos, enquanto outros não conseguiram uma metodologia adequada para esse fim. Considerando que ainda não se tem bem estabelecido um protocolo de criopreservação para os tecidos de cordão umbilical, tecidos esses ricos em células-tronco mesenquimais e com grande potencial terapêutico, que normalmente são descartados após o parto, a proposta deste estudo foi testar dois protocolos de criopreservação para o congelamento de tecidos do cordão umbilical, avaliar a eficiência das criopreservações através da realização de testes de viabilidade celular, análise histológica, cultivo celular, análise citogenética e comparar os resultados, permitindo a escolha do método mais adequado para futura implantação de bancos de tecidos criopreservados.

1.1. CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação é a manutenção de células e/ou tecidos em temperaturas criogênicas, conservando quiescente o metabolismo celular, já que os processos químicos, físicos e biológicos se encontram efetivamente 'suspensos' a essas temperaturas (KARLSSON & TONER, 1996).

Durante o processo de criopreservação, a temperatura vai de 37°C a -196°C, tornando o ambiente hostil para as células. A temperaturas inferiores a -0.6°C, a água biológica, sob condições isotônicas, torna-se termodinamicamente instável, favorecendo o

estado cristalino. Devido à abundância de água nos sistemas biológicos, a fase de transição água-gelo nos biomateriais é um fenômeno de importância crítica na criopreservação (KARLSSON & TONER, 1996).

Durante o congelamento, as células podem perder até 95% de água. A concentração de eletrólitos dentro e fora da célula pode aumentar em muitas ordens de grandeza em relação às condições isotônicas. Solventes orgânicos concentrados permeiam as células, cristais de gelo intercalam os tecidos e deformam as células e o gelo pode entrar nas células e perturbar as estruturas intracelulares (KARLSSON & TONER; 1996).

Os crioprotetores são substâncias químicas utilizadas com o objetivo de diminuir os danos às células causados pelo congelamento. Eles são divididos em duas categorias: permeáveis, que podem passar pelas membranas celulares, como o dimetil sulfóxido (DMSO), glicerol, propanodiol; e não permeáveis, que não são capazes de entrar nas células, como os polímeros (polivinil pirrolidona, hidroxietil amido) e açúcares (sacarose). O mecanismo pelo qual esses agentes protegem as células contra o estresse durante o congelamento não é bem conhecido, mas sabe-se que os crioprotetores permeáveis diminuem o dano celular reduzindo as concentrações potencialmente nocivas dos eletrólitos no interior da célula. Além disso, a proteção contra a formação intracelular de gelo é atribuída aos efeitos coligativos dos crioprotetores (KARLSSON & TONER, 1996).

Apesar de sua proteção, os crioprotetores químicos devem ser usados com moderação, porque eles mesmos podem ser tóxicos para as células, principalmente se usados em altas concentrações. Essa toxicidade acontece porque, paradoxalmente, a presença desses agentes pode aumentar a retenção de água citoplasmática, elevando a possibilidade de formação de gelo intracelular e causando injúria às células. Além disso, a adição e remoção dos crioprotetores, antes e depois da criopreservação, respectivamente, causam danos às células, devido ao aumento das forças osmóticas. Sua toxicidade pode ser diminuída pela redução do tempo e/ou temperatura de exposição das células a esses agentes, ou pelo uso de concentrações mais baixas possíveis (KARLSSON & TONER, 1996).

A temperatura de armazenamento também é crítica para o sucesso da criopreservação. Para parar completamente o metabolismo celular a temperatura tem que ser mantida abaixo de -130°C , o ponto de transição abaixo do qual a água líquida não existe e a difusão é insignificante. Culturas celulares podem ser mantidas, com sucesso, de -70°C a -90°C por meses ou anos. Nessas condições, o metabolismo celular se encontra diminuído, de forma que os danos e modificações celulares vão se acumulando. A manutenção em nitrogênio líquido, a -196°C previne efetivamente todas as reações químicas conduzidas por calor. Somente os efeitos foto-físicos causados por radiação

ionizante atuam a essa temperatura, e são necessários milhares de anos antes de terem efeito em culturas celulares criopreservadas (MAZUR, 1984).

Além disso, o sucesso da criopreservação tem que levar em conta o tempo necessário para estabilização do tecido após o descongelamento, que não deve ser muito longo. Durante o descongelamento, todas as células da amostra “desvitrificam”. É necessário um tempo para ela voltar ao equilíbrio osmótico e, ainda pode ocorrer nucleação e formação de mais cristais durante esse processo. Esse fenômeno, chamado de recristalização, ocorre quando pequenas partículas de gelo intracelular, que são formadas durante o congelamento, se tornam maiores e prejudiciais às células durante o descongelamento do tecido. A desvitrificação e a recristalização são mais propensas a ocorrer em células congeladas por protocolos rápidos, já que eles provocam congelamento rápido do citoplasma com formação de gelo intracelular. Para diminuir os danos causados pela desvitrificação e recristalização são usadas taxas de descongelamento rápidas (KARLSSON & TONER, 1996).

Considerando que diferentes fatores influenciam o sucesso da criopreservação, incluindo a composição do meio de criopreservação, a natureza dos crioprotetores, o processo de congelamento, a taxa de resfriamento, o processo de descongelamento e a intrínseca susceptibilidade das células para sofrer danos pelo congelamento (MAZUR, 1984; HENGLSTER et al., 2000; IEROPOLI et al., 2004; SON, et al., 2004; MIYAMOTO et al., 2006; MERYMAN, 2007; MURUA et al., 2009), diversas estratégias para a criopreservação de células já foram relatadas: congelamento ultra-rápido, congelamento controlado, congelamento com polímeros não penetrantes, congelamento equilibrado e vitrificação (MERYMAN & KAFIG, 1955; ROWE, 1973; TAKAHASHI, 1988; VALERI, 2000; FAHY, et al., 2004; AGUDELO & IWATA, 2008). No entanto, as duas abordagens básicas de criopreservação são a vitrificação e o congelamento lento (KARLSSON & TONER, 1996), que serão abordadas com mais detalhes a seguir.

1.1.1. Vitrificação ou congelamento rápido

A vitrificação é um processo de congelamento rápido, baseado no uso de taxas rápidas de resfriamento sob o uso de altas concentrações de crioprotetores. Ela pode ser realizada por meio da substituição parcial da água intracelular, através do uso de crioprotetores penetrantes, que são fáceis formadores de vidro simples, ou pela desidratação das amostras biológicas, através da utilização de crioprotetores não penetrantes. Na prática, as amostras biológicas são brevemente mergulhadas em soluções crioprotetoras, geralmente à temperatura ambiente. Imediatamente depois disso, as

amostras biológicas são submetidas às temperaturas criogênicas, sendo geralmente imersas diretamente em nitrogênio líquido (KULESHOVA et al., 2007).

A vitrificação produz uma solidificação “do tipo vidro” de células vivas que evita completamente a formação de cristais de gelo durante o congelamento. Igualmente importante, durante o descongelamento, o processo também evita a formação de cristais de gelo em células criopreservadas, a fim de recuperá-las para as aplicações biológicas (KULESHOVA & LOPATA, 2002). O fenômeno da vitrificação foi primeiramente investigado e descrito na virada do século 19 (TAMMANN, G; 1898). O fundador da Criobiologia, Luyet, reconheceu há 60 anos e descreveu em seus estudos clássicos, o potencial de atingir um estado de ausência de gelo na criopreservação (LUYET, B; 1937).

O uso da vitrificação para criopreservação de embriões e ovócitos de mamíferos, inclusive de humanos, tem sido objeto de intensas pesquisas ao longo de muitos anos. Em 1985, Rall e Fahy (RALL & FAHY, 1985) mostraram pela primeira vez que embriões de camundongos podiam ser criopreservados com sucesso por vitrificação. Hoje, já existem vários estudos relatando sucesso da criopreservação em diferentes tipos celulares e tecidos (YOKOTA et al., 2000; HUANG et al., 2005; YU-BIN et al., 2007; HUANG et al., 2008; KEROS et al., 2009).

Huang e colaboradores utilizaram a vitrificação em embriões de camundongos. Eles coletaram 308 blastocistos murinos e os dividiram em três grupos: o grupo 1 foi o da vitrificação, em que os embriões foram vitrificados após adição de crioprotetores e altíssima taxa de resfriamento. O grupo 2 foi o do efeito tóxico das soluções, em que os embriões foram tratados com altas concentrações de crioprotetores, mas sem grande esforço em usar taxas rápidas de congelamento. E o grupo 3 foi controle, em que os embriões não foram congelados. Eles avaliaram as taxas de sobrevivência dos embriões após o descongelamento e cultura de 24 horas e obtiveram como resultados uma recuperação de viabilidade de 100% para o grupo controle, de 95,5% para o grupo 2 e de 87% para o grupo 1. Os autores não encontraram diferenças estatisticamente significantes entre as taxas de sobrevivência e sugeriram que, no estudo, a vitrificação e as altas taxas de crioprotetores não pareceram apresentar grande toxicidade celular (HUANG et al., 2005).

Yokota e colaboradores relataram uma gravidez com sucesso resultante da implantação de um embrião que havia sido vitrificado. Blastocistos frescos foram submetidos a uma criosolução modificada (ISHIMORI et al., 1993), contendo fluido tubário humano, soro fetal, etileno glicol e DMSO, e posteriormente congelados em nitrogênio líquido. Os dois blastocistos vitrificados permaneceram viáveis após o descongelamento e cultura, sendo que de um deles resultou uma gestação humana normal (YOKOTA et al., 2000).

Keros e colaboradores utilizaram a vitrificação em tecidos. Eles coletaram pequenos fragmentos de biópsias de tecido ovariano de 20 pacientes. Os fragmentos foram passados em três soluções de crioprotetores, com aumento sequencial das concentrações dos mesmos, e logo depois imersos em nitrogênio líquido. Após o descongelamento, foi realizada a cultura dos fragmentos e a análise histológica revelou que a vitrificação manteve intacta a morfologia dos folículos. A arquitetura do estroma ovariano também não foi prejudicada pela vitrificação, não havendo células necrosadas, núcleos picnóticos ou espaços vazios na matriz extracelular das amostras avaliadas. Os autores concluem que a vitrificação é uma boa alternativa para a criopreservação de tecido ovariano (KEROS et al., 2009).

Apesar disso, há estudos mostrando que as concentrações altas de crioprotetores utilizados, ou a própria metodologia da vitrificação podem ser prejudiciais para as células, tornando esse processo ineficiente para manter a viabilidade celular após o descongelamento (KULESHOVA & LOPATA, 2002; LUCIANO et al., 2009; KIM et al., 2011). Kim et al (2011) utilizaram a vitrificação para criopreservação de ovários de camundongos. Eles mergulharam as amostras em soluções crioprotetoras, contendo DMSO, glicerol e sacarose, e posteriormente as colocaram em nitrogênio líquido. Após o descongelamento, os autores notaram que haviam surgido numerosos vacúolos e deformidades mitocondriais nos folículos derivados do tecido ovariano vitrificado, ao contrário do tecido a fresco, que estava intacto. Eles notaram ainda que, em comparação com o tecido a fresco, houve um decréscimo significativo de viabilidade dos folículos derivados do tecido ovariano vitrificado. Além disso, foi observado que no grupo vitrificado utilizado para fertilização *in vitro*, houve uma diminuição significativa de clivagem do zigoto e formação do blastocisto. Os autores concluem que a vitrificação induz danos ao tecido ovariano que podem ser prejudiciais aos procedimentos de reprodução assistida (KIM et al., 2011).

Como pôde ser observado a vitrificação também pode apresentar limitações. Kuleshova & Lopata (2002) comentam que a vitrificação pode ser substituída por uma abordagem de congelamento lento, mostrando, em alguns casos, resultados mais eficientes. Essa técnica será abordada a seguir com maiores detalhes.

1.1.2. Congelamento lento ou programado

O congelamento lento é uma técnica de criopreservação que consiste no congelamento programado da amostra, utilizando taxas de resfriamento que diminuem progressivamente. Apresenta a vantagem de usar concentrações baixas de crioprotetores, os quais estão associados à toxicidade química e choque osmótico, mas tem potencial reduzido de evitar formação de cristais de gelo (LUCIANO et al., 2009).

La Sala et al (2006) utilizaram um protocolo de congelamento lento para oócitos humanos (LA SALA et al., 2006). Eles utilizaram 4548 oócitos de 696 pacientes que não obtiveram sucesso na técnica de injeção intracitoplasmática de esperma. As amostras foram banhadas em solução contendo crioprotetores e posteriormente levadas ao freezer de congelamento controlado. A temperatura inicial da câmara controlada foi de 20°C, que foi reduzida para -7°C a uma taxa de -2°C/min. Após 10 minutos a -7°C, as amostras foram congeladas lentamente até -30°C a uma taxa de -0,3°C/min, e então rapidamente até -150°C a uma taxa de -50°C/min. Posteriormente, foram submetidas ao nitrogênio líquido (-196°C) e mantidas até o descongelamento. Após o descongelamento, os resultados obtidos foram uma taxa de sobrevivência dos oócitos de 72,8%, dos quais 73,3% apresentaram alta qualidade para serem utilizados em terapias de reprodução assistida. Os autores relataram, então, que, em contraste com o congelamento de esperma e embriões, a criopreservação de oócitos é uma boa alternativa para a reprodução assistida (LA SALA et al., 2006).

Gonda et al (2008) obtiveram amostras de tecido adiposo de 18 pacientes submetidas à lipoaspiração e isolaram células-tronco do tecido para realizar o congelamento lento (GONDA et al., 2008). Após isolamento e cultura das células-tronco, elas foram ressuspensas em meio contendo crioprotetores e congeladas no freezer programado. As células ficaram 5 minutos a 4°C, depois a temperatura diminuiu até -50°C a uma taxa de -1°C por minuto, e então até -80°C a -5°C por minuto. Após isso as amostras foram transferidas para o nitrogênio líquido. E mantidas a -196°C. Os resultados mostraram que as células não perderam a capacidade de proliferação após o descongelamento nem o potencial multipotente (medido pela diferenciação condrogênica, adipogênica e osteogênica), e também não houve alteração do perfil de marcadores de expressão. Os autores concluíram que o congelamento lento é um bom protocolo para conservar o potencial de proliferação e diferenciação das células-tronco derivadas de tecido adiposo, mesmo após seis meses criopreservadas (GONDA et al., 2008).

Kvist et al (2006) utilizaram o congelamento lento para realizar criopreservação de tecido testicular (KVIST et al., 2006). Eles coletaram amostras de tecido testicular de 11 biópsias de oito garotos com criptorquidia, sendo que cada uma foi dividida em seis partes de igual tamanho. Um dos fragmentos foi fixado, um encaminhado para cultura e os outros quatro para criopreservação. Foram utilizados dois tipos de crioprotetores: para dois fragmentos foi utilizado meio de cultura Leibovitz L15 suplementado com etileno glicol, sacarose e albumina; e, para outros dois fragmentos, foi utilizado PBS no lugar do meio de cultura, mantendo-se os outros componentes. Cada fragmento foi colocado em um criotubo contendo 1mL de solução crioprotetora e encaminhado para o freezer de congelamento programado. O programa usado iniciava a 1°C, diminuía a temperatura até -9°C a 2°C/min,

até -40°C a $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e até -140°C a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sendo as amostras imersas em nitrogênio líquido depois disso. A análise histológica do tecido não mostrou diferenças consideráveis entre as amostras a fresco e as criopreservadas, exceto que o tecido pós-descongelamento às vezes apresentou células necróticas, que não foram observadas no tecido a fresco. A produção de testosterona pelos testículos em cultura não foi diferente entre os grupos a fresco e pós-criopreservação, e nem entre os dois tipos de crioprotetores. Também não houve diferença significativa entre os grupos com relação à função das células de Sertoli, avaliada pela secreção de inibina B. Os autores concluem que, o congelamento lento é um método eficiente para criopreservar tecido testicular sem induzir perda da capacidade de produção de hormônios masculinos *in vitro*, além de manter a sobrevivência da espermatogônia, tornando-se então uma boa possibilidade de preservação da fertilidade em garotos com criptorquidia (KVIST et al., 2006).

Oskam et al (2011) utilizaram o congelamento lento para criopreservação de tecido ovariano de ovinos, mas não encontraram resultados satisfatórios (OSKAM, LUND & SANTOS, 2011). Eles coletaram ovários de 10 ovelhas e os dissecaram em fragmentos, sendo cinco destes imediatamente fixados e usados como controle, outro fixado para ser utilizado em microscopia eletrônica de transmissão e outros 12 fragmentos foram colocados em cultura. Outros fragmentos foram criopreservados, sendo colocados em criotubos contendo solução de propanodiol e sacarose e congelados em freezer programado seguindo o seguinte protocolo: as amostras foram resfriadas até -7°C a $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, depois até -40°C a $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, congeladas até -140°C a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e então colocadas em nitrogênio líquido. Após o descongelamento, 12 fragmentos ovarianos foram cultivados e depois fixados para avaliação de microscopia eletrônica de transmissão, e outros 13 fragmentos foram utilizados para xenotransplante em fêmeas de camundongos receptoras, as quais foram posteriormente sacrificadas para avaliação dos enxertos de ovários. Como resultados, eles encontraram que houve uma diminuição significativa da porcentagem de folículos pré-antrais normais após o descongelamento, se comparados com o controle. Além disso, esses folículos pré-antrais do tecido descongelado estavam prejudicados, com ovócitos vacuolados e cromatina condensada. O estroma do tecido também foi conservado pobremente durante a criopreservação, e se mostrou como estruturas vesiculares largas, com as células apresentando núcleos picnóticos e vacúolos visíveis. A análise histológica pós xenotransplante mostrou que o tecido estava atrofiado e com fibrose intersticial, além de ter havido perda de folículos e extensa degeneração de células estromais, evidentes pelas grandes áreas de vacuolização. Ainda, a avaliação por microscopia eletrônica mostrou que não houve folículos normais ou tecido estromal preservado após a criopreservação. Os autores concluíram que o uso de propanodiol como crioprotetor nesse protocolo de

congelamento lento causou danos irreversíveis ao tecido ovariano ovino, mas ele não deve ser excluído como crioprotetor e mais estudos são necessários para o desenvolvimento do melhor protocolo de criopreservação para o tecido ovariano ovino (OSKAM, LUND & SANTOS, 2011).

De acordo com o exposto, pode se notar que os protocolos disponíveis para a criopreservação de tecidos podem não ser totalmente adequados, resultando, muitas vezes, em taxas baixas de recuperação de tecidos viáveis. A seguir serão comentados alguns estudos que compararam ambos os métodos (vitrificação e congelamento lento) na criopreservação de tecidos e os respectivos resultados obtidos após o descongelamento.

1.1.3. Comparação dos métodos de vitrificação e congelamento lento na criopreservação de tecidos

Huang et al (2008) compararam vitrificação e congelamento lento em tecido ovariano humano (HUANG et al., 2008). Eles coletaram amostras de tecido ovariano de 26 pacientes, divididas em grupo de vitrificação e de congelamento lento. As amostras submetidas à vitrificação foram banhadas em soluções contendo altas concentrações de crioprotetores permeáveis e então congeladas em nitrogênio líquido. Os fragmentos de tecido ovariano submetidos ao congelamento lento foram colocados em criotubos, contendo meio suplementado com DMSO e sacarose, por 30 minutos e, posteriormente, foram congelados lentamente, por meio de freezer programado. Como resultados, observaram que não houve diferença significativa em relação à porcentagem de folículos viáveis entre os grupos: 85,26% no grupo da vitrificação e 84,31% no de congelamento lento. Não houve diferença significativa entre os grupos, também, com relação ao crescimento dos folículos em cultura. Os autores concluem que ambos os métodos mantêm o córtex ovariano viável após o congelamento, mas que, em comparação com o congelamento lento tradicional, a vitrificação é um método mais barato, mais conveniente e promissor para criopreservação de tecido ovariano humano (HUANG et al., 2008).

Gouk et al (2011) colaboradores compararam a vitrificação e o congelamento lento para congelamento de tecido testicular de camundongos (GOUK et al., 2011). Eles coletaram tecido testicular imaturo de filhotes de 6 a 10 dias e testaram os dois protocolos de congelamento. Para a vitrificação foram utilizadas soluções crioprotetoras contendo etileno glicol e sacarose, e o tecido foi rapidamente imerso em nitrogênio líquido. Para o congelamento lento, os fragmentos de tecido foram colocados em criotubos contendo solução crioprotetora e levados ao freezer de congelamento programado, seguindo o protocolo: amostras resfriadas até 4°C a 2°C/min, a té -30°C a 0,3°C/min, até -130°C a 10°C/min, e então transferidas para o nitrogênio líquido. A viabilidade celular foi avaliada

antes do congelamento e após os dois protocolos, para comparação. Como resultados, os autores obtiveram que a maior viabilidade pós-congelamento foi do protocolo de vitrificação (95%), enquanto do congelamento lento foi significativamente menor (6-24%). Após 9 dias de cultura *in vitro*, os autores avaliaram as produções de testosterona e de inibina B, tendo encontrado que a produção de testosterona diminuía progressivamente nas amostras criopreservadas, enquanto a de inibina B foi mantida. Esses resultados não foram diferentes entre os dois protocolos de criopreservação e nem em relação ao controle, e mostram que essas condições de cultura não foram adequadas para as células de Leyding, mas sim para as de Sertoli. Os autores concluíram que, pelos resultados obtidos, o protocolo da vitrificação se mostrou mais adequado para criopreservação de tecido testicular de camundongos, já que o congelamento lento resultou em baixas taxas de recuperação de viabilidade celular (GOUK et al., 2011).

Yu-bin et al (2007), em outro estudo, também compararam os métodos de vitrificação e congelamento lento para tecido ovariano humano (YU-BIN et al., 2007). Eles coletaram amostras de córtex ovariano de 15 pacientes e as dividiram em fragmentos, alguns submetidos à vitrificação e outros ao congelamento lento. Os fragmentos submetidos à vitrificação foram banhados em duas soluções contendo altas concentrações de crioprotetores e, então, foram congelados diretamente em nitrogênio líquido. Já os submetidos ao congelamento lento foram mergulhados em solução pouco concentrada de DMSO por 5 minutos, depois colocados em criotubos contendo meio suplementado com DMSO e sacarose e congelados lentamente por meio de freezer programado. Os resultados mostraram que nos dois grupos de congelamento houve redução da proporção de folículos viáveis em relação ao grupo a fresco, mas não houve diferença significativa entre os grupos de congelamento (80,3% de folículos viáveis na vitrificação e 72,6% no congelamento lento). Também não houve diferença significativa entre os grupos com relação ao crescimento das amostras em cultura. A conclusão dos autores é que os dois métodos de criopreservação são adequados para o congelamento de tecido ovariano, pois não apresentaram diferenças significativas entre si, mas, o protocolo de vitrificação utilizado tem a vantagem de ser mais simples e barato do que o congelamento lento para criopreservação de tecido ovariano humano (YU-BIN et al., 2007).

1.2. O CORDÃO UMBILICAL

O cordão umbilical humano começa a ser formado a partir do 26º dia da gestação, e cresce para formar um órgão helicoidal de 30 a 50 cm de comprimento ao nascimento. Ele faz a ligação entre a mãe (através da placenta) e o feto, sendo a parte mais importante da unidade feto-placentária e exercendo um papel nas trocas gasosas e nutrição do feto

(NARO et al., 2001). É constituído por duas artérias e uma veia, envoltas pela geléia de Wharton e revestido por uma camada externa de membrana amniótica, também denominada membrana de revestimento (KITA et al., 2010) (Figura 1).

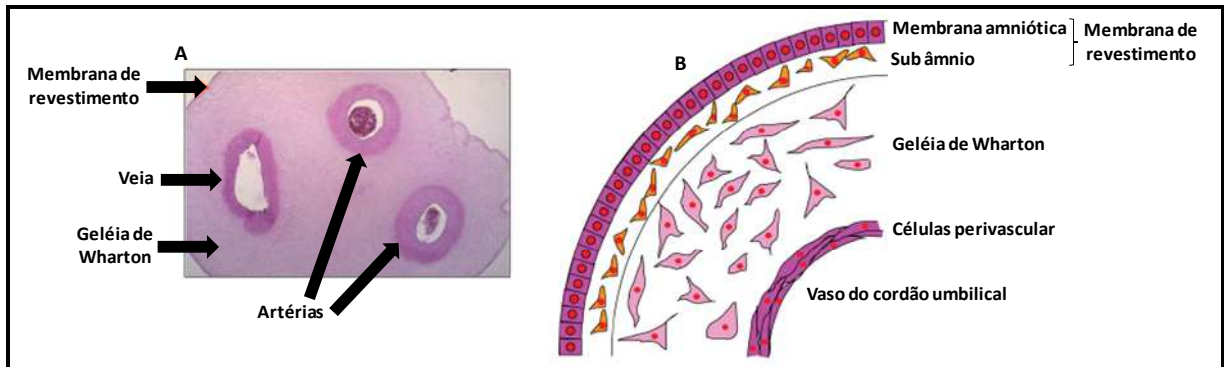


Figura 1: Constituição do cordão umbilical humano. A) Imagem histológica de corte transversal do cordão umbilical; B) Esquema detalhando características dos tecidos que compõem o cordão umbilical. (Adaptado de Kita et al. 2010).

As artérias umbilicais não possuem camada adventícia como os vasos cardiovasculares, em vez disso, a rígida geléia de Wharton realiza tal função (FERGUNSON & DODSON, 2009). As células endoteliais do interior das artérias e veias são geralmente ricas em organelas que participam da formação do líquido amniótico (GEBRANE-YOUNES, 1986). O âmnio é estruturalmente semelhante ao encontrado nas membranas fetais e pode manter ativamente a pressão do líquido na geléia de Wharton (BENENIRSCHKE e KAUFMANN, 2000).

A geléia de Wharton foi primeiramente descrita por Thomas Wharton em 1656 (WHARTON, 1996). Ela consiste de uma matriz mucóide de tecido conjuntivo, em outras palavras, é formada por uma base porosa de matriz extracelular e substância fundamental. Esta estrutura fibrosa e porosa é feita de fibras de colágeno e elastina e, provavelmente, contribui para a firmeza e manutenção intacta da medula (FERGUNSON & DODSON, 2009).

Vários estudos já demonstraram que os diferentes tecidos do cordão umbilical contém células-tronco hematopoéticas e mesenquimais com potencial de diferenciação multipotente que poderiam ser utilizadas em uma variedade de propostas terapêuticas (COVAS et al., 2003; MITCHELL et al., 2003; PANEPUCCI et al., 2004; LEE et al., 2004; WANG et al., 2004; SARUGASER et al., 2005; SECCO et al., 2008). Considerando isso e o

fato de que a coleta do cordão umbilical, realizada imediatamente após o nascimento, não oferece riscos para o recém-nascido nem para a mãe e não há problemas éticos em sua utilização, por se tratar de tecido que geralmente é descartado após o parto, o cordão umbilical foi o objeto desse estudo, na busca de um método adequado para a criopreservação de tecidos de cordão umbilical, visando a futura implantação de um banco de tecidos criopreservados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo geral comparar dois métodos de criopreservação, a vitrificação e o congelamento lento, para tecidos do cordão umbilical.

2.2. Objetivos específicos

- Padronizar os métodos de congelamento lento, vitrificação, descongelamento e cultura celular.
- Comparar a eficiência do congelamento lento e da vitrificação para a criopreservação de tecidos do cordão umbilical, através dos ensaios de análise histológica, avaliação de viabilidade celular, capacidade de proliferação em cultura e análise citogenética, realizados antes e após os processos de congelamento.
- Avaliar a eficiência do congelamento a -80°C para criopreservação dos tecidos de cordão umbilical, através dos mesmos ensaios realizados para o congelamento lento em comparação com a vitrificação.

A seguir, serão apresentados em forma de capítulos, os resultados obtidos nesse estudo. O capítulo 1 consiste no artigo, intitulado “Comparison of vitrification and slow cooling for umbilical tissues” submetido à revista científica “Cell and tissue banking”, mostrando os resultados obtidos da análise de 10 amostras de cordão umbilical. O capítulo 2 consiste em “Considerações adicionais: Resultados da padronização dos métodos de criopreservação e de cultura”, em que serão mostrados como foi a padronização dos experimentos e os resultados do método alternativo de congelamento a -80°C.

3. ARTIGO:

“Comparison of vitrification and slow cooling for umbilical tissues”

Submetido ao periódico *Cell and Tissue Banking*

(Submetido sob número CATB-S-11-00055)

Abstract

The tissue cryopreservation maintains the cellular metabolism in a quiescence state and makes the conservation possible for an indefinite period of time. The choice of an appropriate cryopreservation protocol is essential for maintenance of cryopreserved tissue banks. This study evaluated 10 samples of umbilical cord, from which small fragments of tissue (Wharton's jelly and cord lining membrane) were subjected to two protocols of cryopreservation: slow cooling and vitrification. The samples were frozen for a period of time ranging from 5 to 78 days. The efficiency of cryopreservation was evaluated by testing cell viability, histological analysis, cell culture, cytogenetic analysis and comparison with the results of the fresh samples. The results showed that the slow cooling protocol was more efficient than the vitrification for cryopreservation of umbilical cord tissue, because it has caused fewer changes in the structure of tissue (edema and degeneration of the epithelium) and, despite the significant decrease cell viability compared to fresh samples, the ability of cell proliferation in vitro was preserved in most samples. In conclusion, this study showed that it is possible to cryopreserve small fragments of tissue from the umbilical cord and, to obtain viable cells capable of proliferation in vitro after thawing, contributing to the creation of a frozen tissue bank.

Introduction

The human umbilical cord is a helical body that makes the connection between the mother (via the placenta) and the baby, being the most important part of the fetal-placental, playing a role in gas exchange and baby's nutrition (Naro et al. 2001). It consists of two arteries and one vein surrounded by Wharton's jelly and covered by an outer layer of amniotic membrane, also called cord lining membrane (subamniotic region) of the umbilical cord (Kita et al. 2010). Mesenchymal stem cells were isolated from different compartments of the umbilical cord, like from the epithelium and subendothelium of the umbilical vein, arteries and perivascular area of the umbilical vein, as well as Wharton's jelly and cord lining membrane (Covas et al. 2003; Sarugaser et al. 2005; Weiss et al. 2006; Secco et al. 2008; Ishige et al. 2009; La Rocca et al. 2009; Kita et al. 2010). For the therapeutic usages of these stem cells to become possible, it is necessary to have an efficient method of cryopreservation, which keeps preserved the viability and potential of these cells.

The two basic approaches to cryopreservation is vitrification and slow cooling (Karlsson and Toner 1996). Vitrification is a rapid freezing process, based on fast cooling rates under high concentrations of cryoprotectants. In this technique, biological samples are briefly soaked in cryoprotectant solutions, usually at room temperature. Immediately thereafter, the samples are subjected to cryogenic temperatures, usually immersed directly

into liquid nitrogen (Kuleshova et al. 2007). The advantage is that solidification induces a glasslike solidification of living cells that completely avoids the formation of ice crystals, which are able to damage the cells during freezing and thawing (Kuleshova and Lopata 2002). However, high concentrations of cryoprotectants, which are associated with chemical toxicity and osmotic shock, or the vitrification method itself can be harmful to the cells, leading to a low-efficiency process of maintaining cell viability after thawing (Kuleshova and Lopata 2002, Luciano et al. 2009; Kim et al. 2011). For this reason, in some cases, vitrification has been replaced by slow cooling, which requires low concentrations of cryoprotectants and programmed freezing of the samples by using controlled freezing chambers and cooling rates that decrease gradually (Kuleshova and Lopata 2002). The low concentration of cryoprotectant used in slow cooling is an advantage, however, the fact that the freezing process occurs gradually does not efficiently avoid the formation of ice crystals, which is considered a disadvantage (Luciano et al. 2009).

Even though several strategies for cryopreservation of cells and tissue have already been described (Käfig and Meryman 1955; Rowe 1973; Takahashi 1988; Valeri 2000, Fahy et al. 2004; Agudelo & Iwata 2008), the available protocols for cryopreservation may not be fully adequate for the target tissue, often resulting in low recovery rates of viable tissue (Kuleshova and Lopata, 2002; Luciano et al. 2009; Kim et al. 2011; Oskam, Lund and Santos 2011). Taking into consideration that different factors can influence the success of cryopreservation, including the components of the cryopreservation media, the nature of cryoprotectants, the freezing process, the rate of cooling, the thawing process and the intrinsic susceptibility of cells to be damaged during the freezing process (Mazur, 1984; Hengster et al. 2000; Ieropoli et al. 2004; Son, et al. 2004; Miyamoto et al. 2006; Meryman 2007; Murua et al. 2009), and still do not have a well-established protocol for the cryopreservation of umbilical cord tissue, this study tested two protocols of cryopreservation, slow cooling and vitrification for the cryopreservation of this type of tissue. In addition, the effectiveness of these methods we evaluated for maintaining the integrity, tissue morphology and structure, cell viability, the ability of cell to proliferate *in vitro*, as well as the ability to induce chromosomal alterations, in order to establish a cryopreservation method suitable for future implementation of banks of cryopreserved umbilical cord tissue.

Material and methods

Sample collection and Experimental design

Ten samples of umbilical cord were collected from patients who had cesarean or natural delivery, term delivery without pregnancy complicating factors, from the Hospital das

Clinicas, UFMG, Belo Horizonte - MG. The collections were also performed in the operating room soon after birth, without offering risks or discomfort for the mother and/or the baby. All participants signed an informed consent (appendix 1). This study was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais (COEP), No 0326.0.203.000-10.

From each umbilical cord, four fragments of approximately 10 cm were collected. The samples were placed in sterile containers, properly identified, containing saline and transported at 4° C to the laboratory. The samples were dissected macroscopically, also sterile, to obtain small fragments of approximately 5x2x2mm. In total 138 fragments were obtained per sample, with 69 fragments dissected from Wharton's jelly and 69 from the cord lining membrane of the umbilical cord. The dissected fragments of each tissue were arranged in three groups, each containing 23 fragments. For each sample, a group of Wharton's jelly and a group of cord lining membrane were subjected to slow cooling, another group of each tissue was subjected to the vitrification process and the third group of each tissue served as an experimental control (fresh). The fresh samples and those submitted to slow cooling and vitrification, after being thawed, were submitted to histological study, evaluation of cell viability, cell culture and cytogenetic analysis (Figure 2).

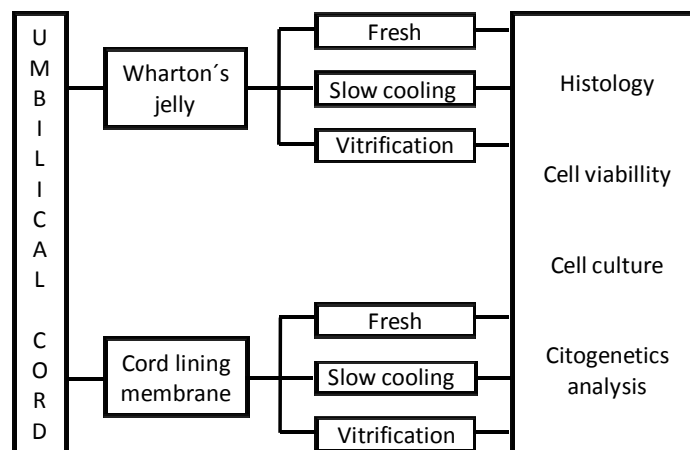


Figure 2: Experiment outline. From each umbilical cord 69 Wharton's jelly and 69 cord lining membrane fragments have been dissected. The fragments of each tissue were arranged in three groups, each containing 23 fragments. One group as control (fresh tissue), another group was subjected to slow cooling and the other to the vitrification process. After thawing the samples, three fragments from each group (including the control group) were sent for histological analysis. The remaining 20 fragments were used to assess cell viability, cell culture and cytogenetic analysis.

Slow cooling

The slow cooling process was carried out as described by Yu-bin et al (2007), with modifications. The fragments were initially incubated for 15 minutes in base medium: RPMI 1640 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 20% fetal bovine serum (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). After that time, they were immersed for 5 minutes in cryo-solution 3 (1.5 mol/L of DMSO diluted in basic medium) and cooled down to 4°C. Thereafter, each fragment was transferred to a cryotube containing 1 mL of cryo-solution 4 (1.5 mol/L DMSO and 0.1 mol/L sucrose diluted in basic medium) and cryovials were taken to the Cryomed Controlled Rate Freezer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The program consisted of keeping the samples at 4°C for 30 minutes, reducing the temperature from 4°C to -8°C at -2°C/min, maintaining at -8°C for 10 minutes, then cooling down again from temperature of -8°C to -40°C at -0.3°C/min and then down to -150°C at -30°C/min. After the program was finished, the cryovials were stored in the tank of liquid nitrogen for periods ranging from 5 to 78 days.

Vitrification

The vitrification process was also performed according to the method described by Yu-bin (2007), with modifications. The fragments were placed for 15 minutes in the base medium. After that, they were incubated for 5 minutes in a cryo-solution 1 cooled down to 4°C: 2.0 mol/L DMSO (Baxter, Bioniche Teoranta, Gal way, Ireland) and 0.1 mol / L sucrose (Merck, Darmstadt, Germany) diluted in base medium. They were then transferred to cryo-solution 2: 2.0 mol/L DMSO, 2.0 mol/L propanediol (Merck, Darmstadt, Germany) and 0.2 mol/L sucrose diluted in base medium, cooled down to 4°C maintained for 5 minutes. Each fragment was then removed from the solution and immediately plunged into liquid nitrogen, being then removed with cooled forceps, placed in cryovials (Corning Incorporation, NY, USA) and stored in liquid nitrogen tank for periods of time ranging from 5 to 78 days .

Thawing of the samples

The thawing process was the same for the samples submitted to slow cooling and vitrification. The cryovials were removed from liquid nitrogen and immediately placed in a water bath at 37°C for about 7 minutes. Soon after the samples were washed three times with base medium.

Histological analysis

A cross section of approximately 5 cm was obtained from each umbilical cord and fixed in neutral formalin. Besides the cross-section, three fragments from Wharton's jelly and

three from cord lining membrane of each fresh umbilical cord, post-vitrification and post-slow cooling were also fixed in neutral formalin. The fixed samples were embedded in paraffin, and from 5 µm cuts slides were prepared slides and stained with hematoxylin-eosin for histological analysis performed by experienced pathologist. A cross section of each cord was first evaluated and taken as reference for comparison with the fragments of Wharton's jelly and cord lining membrane after cryopreservation processes.

Assessment of cell viability and cell culture

The assessment of cell viability by Trypan Blue method was performed immediately before the entry into cell culture. The time between sample collection and processing analysis of cell viability and cell culture ranged from two to eighteen hours.

For each umbilical cord, both Wharton's jelly and the cord lining membrane, the 20 fragments from each of the three groups (fresh, post-vitrification and post-slow cooling) were digested with collagenase type II (3 mg/mL, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) for about three hours. A counting of viable cells were performed using Trypan blue in a Neubauer chamber, from an aliquot of 10 mL of the packed cell obtained from each sample. The rest of the digested material was subjected to cell culture. The cell cultures were performed in T25 flasks (Greiner Bio-One, Brazil) using 5 mL of culture medium Amniomax (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), incubated at 37° C in a CO₂ incubator (Thermo model 3111), supplemented as recommended by the manufacturer, being the culture medium changed every 4 days. When necessary, treatment with 0.25% Trypsin EDTA (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) was performed to promote cell expansion in the bottle, but no cell culture was undercultivated. The cell growth was monitored daily under inverted light microscopy and, after reaching 80% confluence (80% of the cultivable area of the bottle covered by cells), were sent to a karyotype preparation.

Cytogenetic analysis

To obtain chromosomes hypotonization was performed with 0.075 M KCl (Merck, Darmstadt, Germany) and fixation was made with methanol/acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany). An average of five slides per case were prepared, incubated overnight at 55°C and subsequently held a GTG banding with trypsin solution diluted in Dulbecco's buffer (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) at a ratio of 1:250 and Giemsa staining (Gustashaw 1997). Chromosomal analysis was performed using an optical microscope (Nikon E400) coupled to a digital system and a karyotyping analysis software (Applied Spectral Imaging, version 6.0). The results of the karyotype followed the ISCN 2009 recommendations.

Statistical analysis

The results were analyzed using Prism software (version 4.0, GraphPad Software Inc., CA, USA). Paired Student's t tests and correlation (r Pearson) were performed in the statistical analysis results of cell viability and culture period. Mean values and standard deviations were presented as mean \pm standard deviation. P <0.05 was considered statistically significant.

Results

The samples were frozen for a period of time ranging between 5 and 78 days, averaging 19.60 ± 21.96 days. The efficiency of criopreservations was evaluated by testing cell viability, histological analysis, cell culture, cytogenetic analysis and comparison with the results from the fresh samples.

Histological analysis

Histological analysis of the umbilical cord, after the cryopreservation process, showed interstitial edema both in the Wharton's jelly and in the cord lining membrane. The latter also showed epithelial degeneration as a result of intracellular edema in the epithelial cells (vacuoles). The edema was classified as mild (1+), moderate (2+), intense (3+) or very intense (4+). For the Wharton's jelly, the 10 fresh samples showed normal morphology. After slow cooling, only 2/10 samples showed very intense interstitial edema (4+) and after vitrification, the majority (9/10) showed interstitial edema (3+) or very intense (4+) (Table 1, Figure 3). For the cord lining membrane, 2/10 fresh samples showed very intense interstitial edema (4+) and vacuole in epithelial cells, culminating in the total degeneration of the epithelium, while the other samples maintained their normal morphology. After both slow cooling and vitrification cryopreservation process all the samples from the cord lining membrane showed interstitial edema, ranging from moderate (2+) to very intense (4+), and vacuole in epithelial cells, leading to degeneration of the epithelium (Table 1, Figure 3).

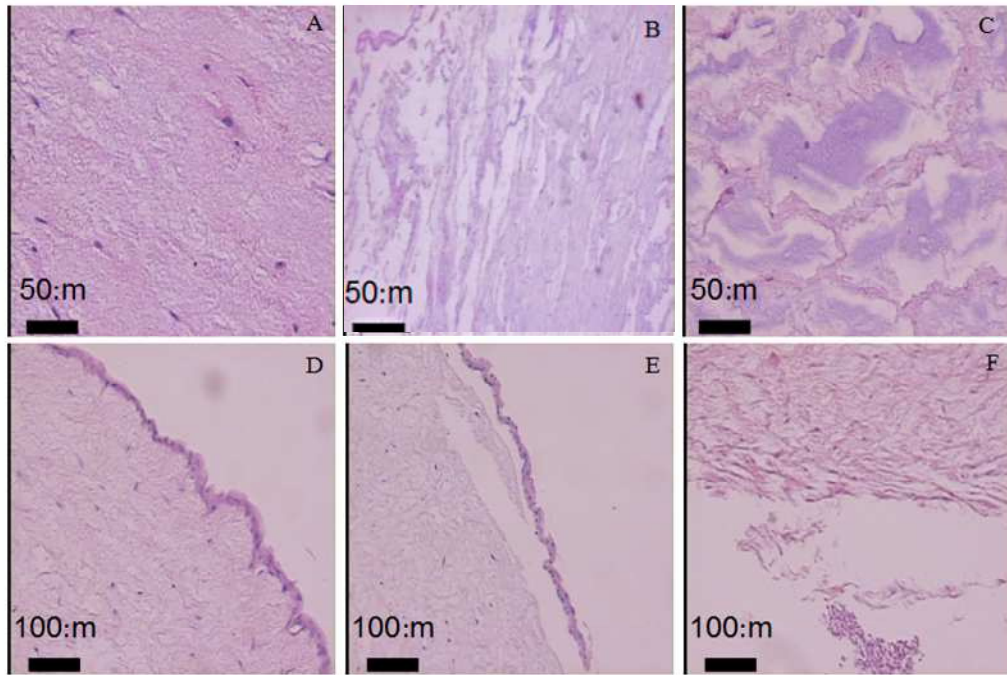


Figure 3: Histology of the umbilical cord tissue. A) fresh Wharton' Jelly presenting normal morphology, B) Wharton's Jelly after vitrification showing intense degree of interstitial edema (3+) (C) Wharton's Jelly after slow cooling showing very intense interstitial edema (4+), (D) Cord lining membrane featuring fresh normal morphology and preservation of the epithelium, (E) Cord lining membrane after slow cooling showing moderate interstitial edema (2+) and degeneration of the epithelium showing detachment of the same subamniotic region; (F) Cord lining membrane after slow cooling showing very intense interstitial edema (4+) and epithelial degeneration and disintegration. A, B and C: increase of 200X, D, E and F: an increase of 100X.

Table 1: Results of cell viability, cell culture period, histological and cytogenetic analysis for the tissue of the umbilical cord, Wharton's jelly and cord lining membrane, divided into three groups: fresh (control), post-slow cooling and post-vitrification.

WHARTON'S JELLY													
Samples	Fresh				Post-Slow cooling				Post-Vitrification				Stay at -196°C (Day)
	Histology	Viability (%)	Culture (days)	karyotype	Histology	Viability (%)	Culture (days)	karyotype	Histology	Viability (%)	Culture (days)	karyotype	
1	N	50	20	46,XY[30]	N	33	26	46,XY[30]	4+	0	-	-	78
2	N	67	-	-	N	50	17	46,XY[30]	4+	0	-	-	30
3	N	57	14	46,XX[30]	N	33	31	46,XX[5]	3+	0	-	-	17
4	N	75	21	46,XX[30]	4+	50	-	-	4+	0	-	-	12
5	N	83	14	46,XY[26]	4+	33	-	-	4+	0	-	-	12
6	N	60	12	46,XY[30]	N	33	25	46,XY[30]	4+	0	-	-	5
7	N	50	13	46,XY[30]	N	33	15	46,XY[30]	3+	0	-	-	5
8	N	67	11	46,XX[30]	N	75	20	46,XX[30]	N	0	-	-	21
9	N	50	13	46,XY[30]	N	66	20	92,XXYY[30]	4+	0	-	-	9
10	N	67	21	46,XX[30]	N	60	19	46,XX[30]	4+	0	-	-	7
Mean		63,55	15,44			46,73	21,63						19,60
SD		10,46	4,03			16,05	5,29						21,96
CORD LINING MEMBRANE													
Samples	Fresh				Post-Slow cooling				Post-Vitrification				Stay at -196°C (Day)
	Histology	Viability (%)	Culture (days)	karyotype	Histology	Viability (%)	Culture (days)	karyotype	Histology	Viability (%)	Culture (days)	karyotype	
1	N	69	9	46,XY[30]	*4+	33	30	46,XY[2]	*4+	0	-	-	78
2	N	63	26	46,XY[30]	*4+	33	14	46,XY[30]	*4+	0	-	-	30
3	N	88	11	46,XX[30]	*4+	40	14	46,XX[30]	*4+	0	-	-	17
4	*4+	50	19	46,XX[30]	*4+	0	-	-	*4+	0	-	-	12
5	*4+	100	15	46,XY[30]	*4+	50	24	46,XY[22]	*4+	0	-	-	12
6	N	63	14	46,XY[30]	*3+	50	15	46,XY[30]	*3+	0	18	46,XY[14]	5
7	N	57	11	46,XY[30]	*2+	50	14	46,XY[30]	*3+	0	28	92,XXYY[14]	5
8	N	63	11	46,XX[30]	*3+	57	25	46,XX[30]	*3+	33	28	46,XX[30]	21
9	N	88	9	46,XY[30]	*4+	67	17	46,XY[20]	*4+	0	-	-	9
10	N	67	11	46,XX[30]	*4+	63	15	46,XX[14]	*4+	0	-	-	7
Média		70,51	13,60			44,29	18,66			3,33	24,66		19,60
SD		15,83	5,32			19,19	6,04			10,43	5,77		21,96

SD: standard deviation, -: Absence of cell growth, N: normal morphology, and 2 +: moderate interstitial edema, and 3 +: intense interstitial edema, and 4 +: very intense interstitial edema * presence of vacuoles epithelial cells, culminating degeneration of the epithelium.

Cell viability

The average of cell viability was $63.55\% \pm 10.46$ for fresh samples of Wharton's jelly and $70.51\% \pm 15.83$ for fresh samples of the cord lining membrane. A significant decrease in the percentage of viable cells after slow cooling process for both Wharton's jelly ($46.73\% \pm 16.05$, $P = 0.0119$) and cord lining membrane ($44.29\% \pm 19.19$, $P = 0.0016$) samples was observed (Figure 3). After the vitrification process, viable cells were not detected in Wharton's jelly samples. Only in a sample of the cord lining membrane viable cells were detected after vitrification, showing 33% viability (Table 1).

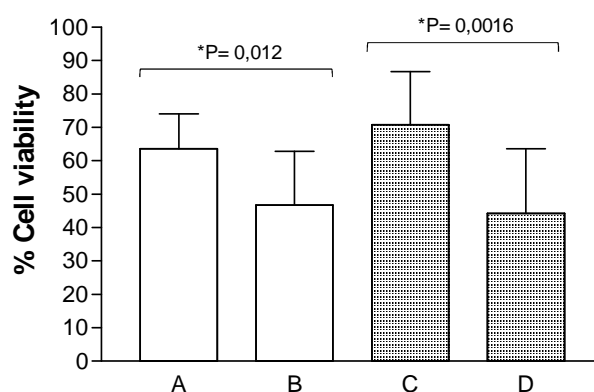


Figure 4: Slow cooling effect on cell viability of the tissue from the umbilical cord. Significant P value (*) was obtained by paired Student's t test, showing significant decrease in cell viability of Wharton's jelly after slow cooling (B) compared to fresh Wharton's jelly (A) and cord lining membrane post-slow cooling (D) in relation to the fresh cord lining membrane (C).

Cell culture

Although there was significant decrease in cell viability after slow cooling, the ability of proliferating in cell culture has been preserved in most samples. For the Wharton's jelly, eight post-slow cooling samples and nine fresh samples showed growth in culture and taking from 15 to 31 days (21.63 ± 5.29) and from 11 to 21 days (15.44 ± 4.03), respectively, to reach 80% confluence (Table 1). The comparison of culture period, reaching 80% confluence, showed significant difference ($P = 0.0219$) before (fresh) and post-slow cooling of Wharton's jelly for seven paired samples (Figure 5). For the cord lining membrane, nine post-slow cooling samples and 10 fresh samples showed cell growth, taking from 14 to 30 days (18.66 ± 6.04) and from 9 to 26 days (13.60 ± 5.32), respectively, to reach 80% confluence (Table 1). The comparison of culture period showed no significant difference before (fresh) and after slow cooling of the cord lining membrane, for the nine paired samples (Figure 5). After vitrification,

no Wharton's jelly samples grew in culture and three samples of the cord lining membrane showed cell growth, taking from 18 to 28 days (24.66 ± 4.44) to obtain 80% confluence.

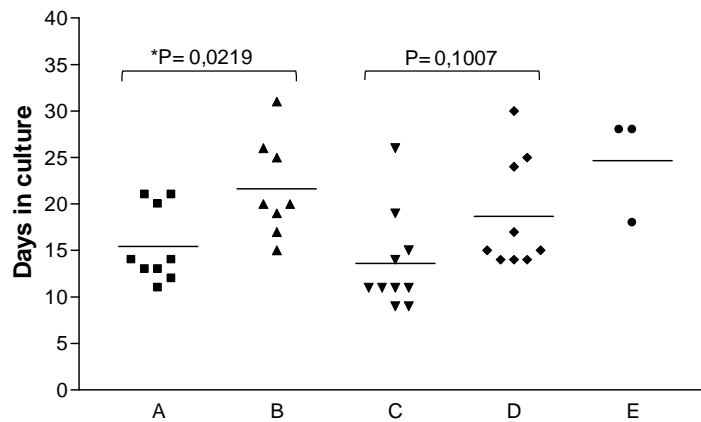


Figure 5: Distribution of culture period to obtain 80% confluence. A) Fresh Wharton jelly (n = 9), B) Wharton's Jelly post-slow cooling (n = 8), C) Fresh cord lining membrane (n = 10), D) cord lining membrane post-slow cooling (n = 9), E) cord lining membrane post-vitrification (n = 3). P value obtained by paired Student's t test, showed significant increase (*) of culture period of Wharton's jelly after slow cooling compared to fresh.

Cytogenetic analysis

For each cell culture medium were analyzed about 25 metaphases in resolution of 250 to 400 bands. Cytogenetic analysis of Wharton's jelly might be held to nine fresh samples and eight post-slow cooling. All samples presented a normal karyotype result, except for one post-slow cooling sample (sample 9), which showed a tetraploid karyotype (92,XXYY) (Table 1). After vitrification, there was no culture growth in any of Wharton's jelly sample to perform karyotyping.

For the cord lining membrane, it was possible to analyze 10 fresh samples and nine post-slow cooling ones. All samples presented a normal karyotype result (Table 1). After vitrification, only three samples showed cell growth and could be analyzed. One of these samples (sample 7) showed a tetraploid karyotype (92,XXYY), the others had normal karyotypes.

Discussion

This study tested the slow cooling and the vitrification process for cryopreservation of the following tissue of the umbilical cord: Wharton's jelly and cord lining membrane. Considerable differences in the results were observed. The vitrification has led to

morphological changes in the tissue, absence of viable cells in culture and growth in most of the samples. The slow cooling process proved to be the most effective method causing fewer changes in the tissue structure, higher rates of cell viability and better results in cell culture.

Histological analysis revealed the presence of moderate (2+), intense (3+) or very intense (4+) interstitial edema (abnormal accumulation of fluid within or between cells) in the umbilical cord tissue after the process of cryopreservation and vacuole (or intracellular edema) in the epithelial cells, leading to epithelial degeneration of the lining membrane samples after cryopreservation process. *In vivo*, the edema can be caused by an increase in intravascular hydrostatic pressure, changes in oncotic pressure (pressure exerted by plasma proteins), obstruction of lymphatic drainage or an increase in capillary permeability. The latter can be caused, among others, by toxic substances to cells (Metze 2004), such as cryoprotectants (sucrose, DMSO and propanediol) used in this study.

Thus, it is possible that cryoprotectants have contributed to the increased capillary permeability in the tissue, leading to the formation of edema. Only the epithelial cells present in the cord lining membrane showed vacuoles after the process of cryopreservation. Probably the structure of the umbilical cord with the presence of collagen and elastin (Kühnel, 2005) can protect Wharton's jelly and subamniotic region fibroblastic cells from the formation of intracellular edema, while the cells of the thin cord lining membrane epithelium (Kühnel, 2005), do not have such protection, may be more prone to vacuoles formation and subsequent epithelial degeneration.

In literature, no reports of cryopreservation of umbilical cord tissue have been found up to date, but other tissue also have shown the presence of edema after cryopreservation. Gelber et al (2008) showed that cryopreservation by direct freezing using a freezer at -80°C, a procedure similar to the vitrification, caused intrafibrillar edema in human meniscal tissue. However, the authors did not suggest a specific cause for the edema, arguing that the set of changes found, such as size variation of the collagen fibers, banding, fiber breakage, shrinkage and edema, may have been caused by meniscus nutritional deficit or lyophilization. Still, in most studies of tissue cryopreservation, the histological findings vary. Gaucher et al (2011) observed the presence of vacuolated cells and a decrease in proliferative activity of keratinocytes in skin tissue after slow cooling. Kim et al (2011) observed the presence of vacuoles and mitochondrial deformations in ovarian tissue after vitrification. Thomas et al (2005) noticed the presence of hyaline degeneration, cytoplasmic vacuolation, pyknosis and stromal lysis in rabbit oocytes after slow cooling process. This difference between the results of the literature and data found in this study can probably be attributed to the peculiarity of the studied tissue. Besides the studies that found histological changes, there are also studies in the literature that reported that cryopreservation did not

induce any morphological changes, such as the vitrification of ovarian tissue (Keros et al. 2009), and the slow cooling of testicular tissue (Kvist et al. 2006). This heterogeneity of data about morphological changes after cryopreservation may be due, beyond the differences between the tissue, to the variety of protocols used for cryopreservation.

In addition to the morphological changes in this study, a significant reduction was observed in cell viability of umbilical cord tissue after thawing when compared with their respective fresh samples. After slow cooling, a significant reduction of cell viability was observed for both Wharton's jelly and cord lining membrane samples. After vitrification, viable cells were not detected in any Wharton's jelly sample and neither in most of the cord lining membrane samples (9 /10). It is possible to notice that the decrease in cell viability was not related to the presence of morphological changes detected, since the samples with higher degree of interstitial edema did not necessarily showed lower cell viability. Probably the interstitial edema found did not affect survival or cell viability, as the intracellular edema (or vacuole) does. Kim et al (2011) suggested that the presence of vacuoles may have affected the cell viability. In the literature, studies have also detected a significant decrease in cell viability after cryopreservation in different evaluated tissue. Succu et al (2008) showed significant loss of cell viability in sheep oocytes after vitrification. Kim et al (2011) observed that both slow cooling and vitrification processes induced reduction in cell viability in murine ovarian tissue. Moreover, Salvetti et al (2010) reported that vitrification had worse results for cell viability than slow cooling in rabbit oocytes.

Although cryopreservation protocols used have caused cell viability reduction, the ability of cell proliferation in culture was preserved in most of the samples. After slow cooling, most of the cord lining membrane samples (9 /10) and Wharton's jelly samples (8/10) showed culture growth, in contrast to vitrification, in which most of the samples were not successful in cell culture. Considering the use of propanediol, a permeable cryoprotectant highly toxic to the cells, and the direct contact with liquid nitrogen in vitrification, these could be explanations for the lower efficiency of vitrification in preserving the tissue morphology, cell viability and proliferation capacity *in vitro*. In fact, Oskam et al (2011) reported that the propanediol showed irreversible deleterious effects on sheep ovarian tissue, particularly follicular loss, and that some studies with the same tissue even achieved the recovery of cell viability, but none of them managed to recovery of gonadal function after transplantation (Newton et al. 1996; Gook et al. 2001).

However, 3/10 samples of the cord lining membrane grew in cell culture after vitrification, revealing that, for some samples, there are cells with proliferative capacity after vitrification process. The degeneration of the cord lining membrane epithelial, also detected in these samples, did not affect the proliferative capacity of cells in culture since fibroblasts,

which are present in the subamniotic region of the connective tissue (Kita et al., 2010), are the target cells of the cell culture performed in this study. Despite the growth in culture, only one of the three samples showed viable cells by Trypan blue method. This result may be reflecting a limitation of the Trypan blue method, which indicates which cells do or do not have changes in the plasma membrane, which allow dyes to penetrate into the cells, but does not reflect the proliferative or functional capacity of cells (Gouk et al. 2011). Although this method is limited to the assessment of cell viability, the results showed that the vitrification protocol used was not suitable for the cryopreservation of umbilical cord tissue, since most samples were not successful in cell growth *in vitro*.

The time in which the samples were frozen (at -196°C) ranged from 5 to 78 days (Table 1). The results indicate that this does not seem to interfere with the quality of the samples for growing in culture after freezing, since for both samples with short and long freezing period, the results were similar regarding histological data, cell viability and cell culture. Most published studies have also reported a short period of storage of cryopreserved samples, ranging from one week (Goud et al, 2000) to about five months (Suh et al, 1999; Lehle et al, 2004; Yu-Bin et al, 2007; Yu et al, 2007, Zang et al, 2007; Gonda et al., 2008). It has been well-established that the storage time in liquid nitrogen does not affect the viability of the samples after freezing, since at the temperature of -196°C the cellular metabolism is completely stopped, effectively preventing all chemical reactions driven by heat (Aawood - Smith, 1980; Mazur, 1984). Thus, the factors that actually interfere with cryopreservation success are the processes of freezing and thawing (Karlsson and Toner, 1996).

As for the cytogenetic results, no fresh sample had chromosomal abnormality, while after the process of cryopreservation, only two cultures showed tetraploid karyotypes: a Wharton's jelly sample post-slow cooling and a cord lining membrane post-vitrification (Table 1). Previous studies showed that slow cooling induces polyploidy in mice and humans oocytes (Glenister et al. 1987; Ah-Hasani et al. 1987; Bouquet et al. 1992), in addition, it increases the rate of chromosome misalignment in the metaphase II (Coticchio et al. 2009). However, it is hard to state that the cytogenetic changes were caused as a result of cryopreservation, since only two cultures showed chromosomal abnormalities. Still, it must be taken into consideration that the very long-term culture can induce the appearance of tetraploidy, and the longer the time in cell culture, the greater the possibility that changes may occur (Benkhalifa et al. 1993). However, in this study, the period of cell culture seems to have no influence on the tetraploidy occurrence, since both tetraploid samples remained in culture for approximate the same period of the respective group means. The time it remained frozen does not seem to have contributed to the tetraploidy occurrence, since for both samples the period was shorter than the others (Table 1).The tetraploidy may still have

arisen as a result of cell fusion induced by DMSO, even DMSO also causes the membrane to become floppier, which would enhance permeability, facilitate membrane fusion, and enable the cell membrane to accommodate osmotic and mechanical stresses during cryopreservation (Notman et al. 2006).

Overall, the results of this study showed that the slow cooling protocol used was more efficient than the vitrification for cryopreservation of umbilical cord tissue. The success of slow cooling for other tissue and cell types is well-documented in the literature, with several studies showing good results (Donnez et al. 2004; Oktay et al. 2004; Meirow et al. 2005; Kvist et al. 2006; Gonda et al. 2008). It has also been reported that vitrification was not effective, like Succu et al (2007) who reported that vitrification causes molecular changes that affect the development of various cells features (Succu et al. 2007). However, other studies have shown success in achieving vitrification (Yokota et al. 2000; Huang et al. 2007, Yu-bin et al. 2007, Keros et al. 2009, Gouk et al. 2011). Some of these studies used thin straw to accommodate the small tissue fragments and then plunged them into liquid nitrogen (Huang et al. 2005, Keros et al. 2009, Curaba et al. 2011). Yu-bin et al (2007) described a method based on sending the tissue directly into liquid nitrogen and they obtained a successful cryopreservation of ovarian tissue. Considering this is an easy and cheap method, we decided to test it. However, we have not succeeded in the cryopreservation of umbilical cord tissue with this protocol. The use of the thin straw for the vitrification process may be an alternative to improve the obtained results.

This heterogeneity results in the literature, is due to different factors that can influence the process of cryopreservation. As for slow cooling and to vitrification, there are variety of protocols, using different cryoprotectants at different concentrations, temperatures and time, and other variables related to the thawing process. Still, it is necessary to consider the differences between tissue and studied cell types, since they all have their own biological features and the same cryopreservation protocol used successfully for a tissue may not be effective for another. As occurred in this study, in which the vitrification protocol was used successfully by Yu-bin et al (2007) for ovarian tissue, predominantly epithelial, but for umbilical cord tissue, composed primarily of mucosal tissue was not efficient.

In conclusion, this study showed that it is possible to cryopreserve tissue fragments from the umbilical cord and, after thawing, to obtain viable cells capable of proliferation *in vitro*, contributing to the creation of a bank of frozen tissue, which may offer possibilities of using this tissue for a varied of purposes. The slow cooling protocol used was more efficient than the vitrification for cryopreservation of umbilical cord tissue, but more studies with larger number of samples, testing other cryoprotectants, and assessing other parameters such as,

ability of preserving stem cells from umbilical cord tissue, should be conducted to enhance the results here obtained.

References

Agudelo CA, Iwata AH (2008) The development of alternative vitrification solutions for microencapsulated islets. *Biomaterials* 29:167-76

Al-Hasani S, Diedrich K, Van der Ven H et al (1987) Cryopreservation of human oocytes. *Hum. Reprod* 2: 695-700

Benkhalifa MM, Janny L, Vye P, Malet P, Boucher, D, Menezo, Y. et al (1993). Assesment of polyploidy in human morulae and blastocysts using co-culture and fluorescent in-situ hybridization. *Hum. Reprod* 8: 895-902

Bouquet M, Selva J, Aurox M (1992) The incidence of chromosomal abnormalities in frozen-thawed mouse oocytes after in-vitro fertilization. *Hum. Reprod* 7:76-80

Coticchio G, Bromfield JJ, Sciajno R, Gambardella A, Scaravelli G, Borini A, Albertini DF. (2009) Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase II spindle of human mature oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*.19:29-34

Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana (2003) Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36:1179-1183

Curaba M, Poels J, van Langendonck A, Donnez J, Wyns C (2011) Can prepubertal human testicular tissue be cryopreserved by vitrification? *Fertil Steril*. 95(6):2123.e9-2123.e12

Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, van Langendonck (2004) Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 364:1405-1410

Fahy GM, Wowk B, Wu (2006) Cryopreservation of Complex Systems: The Missing link in the Regenerative Medicine Supply Chain. *Rejuvenation Research* 9(2): 279-291

Gaucher S, Elie C, Vérola O, Jarraya, M (2011) Viability of cryopreserved human skin allografts: effects of transport media and cryoprotectant. *Cell Tissue Bank* DOI 10.1007/s10561-011-9239-3

Gelber PE, Gonzalez G, Lloreta JL, Reina F, Caceres E, Monllau JC. (2008) Freezing causes changes in the meniscus collagen net: a new ultrastructural meniscus disarray scale. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 16:353-359

Glenister PH, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG (1987) Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro. *Gamete Res* 16:205-216

Gonda K, Shigeura T, Sato T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Sato K, Murase S, Koshima I, Yoshimura (2008) Preserved Proliferative Capacity and Multipotency of Human Adipose-Derived Stem Cells after Long-Term Cryopreservation. *Plastic and Reconstructive Surgery* 121:401-410

Gook DA, McCully BA, Edgar DH, McBain JC (2001) Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod* 16: 417–422

Goud A, Goud P, Qian C, Van der Elst J, Van Maele G, Dhont M (2000) Cryopreservation of human germinal vesicle stage and in vitro matured M II oocytes: influence of cryopreservation media on the survival, fertilization, and early cleavage divisions. *Fertility and Sterility* 74(3):487-494

Gouk SS, Loh YF, Kumar SD, Watson PF, Kuleshova LL (2011) Cryopreservation of mouse testicular tissue: prospect for harvesting spermatogonial stem cells for fertility preservation. *Fertility and Sterility* 95(7):2399-403

Gustashaw KM (1997) Chromosome stains. In: *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*, 3rd edn. Lippincott-Raven, New York, pp259-324

Hengstler JG, Utesch D, Steinberg P, Platt KL, Diener B, Ringel M, Swales N, Fischer T, Biefang K, Gerl M, Böttger T, Oesch F (2000) Cryopreserved primary hepatocytes as a

constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metab Rev* 32: 81-118

Huang CC, Lee TH, Chen SU, Chen HH, Cheng TC, Liu CH, Yang YS, Lee MS (2005) Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification. *Hum Reprod.* 20(1):122-128.

Huang L, Mo Y, Wang W, Li Y, Zhang Q, Yang D (2008) Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 139(2):193-198

Ieropoli S, Masullo P, Santo Mdo E, Sansone G (2004) Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the fertilization viability of spermatozoa of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Cryobiology* 49: 250-257

Ishige I, Nagamura-Inoue T, Honda MJ, Harnprasopwat R, Kido M, Sugimoto M, Nakauchi H, Tojo A (2009) Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. *Int J Hematol* 90: 261–269

Karlsson JO, Toner M (1996) Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials* 17: 243-256

Keros V, Xella S, Hultenby K, Pettersson K, Sheikhi M, Volpe A, Hreinsson J, Hovatta (2009) Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Human Reproduction* 24: 1670-1683

Kim GA, Kim HY, Kim JW, Lee G, Lee E, Ahn JY, Park JH, Lim JM (2011) Effectiveness of slow freezing and vitrification for long-term preservation of mouse ovarian tissue. *Theriogenology* 75: 1045-1051

Kita K, Gauglitz GG, Phan TT, Herndon DN, Jeschke MG (2010) Isolation and characterization of mesenchymal Stem Cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. *Stem Cells and Development* 9(4):491-502

Kuhnel W (2005) *Citologia, Histologia e Anatomia microscópica*. Artmed, Porto Alegre

Kuleshova LL, Gouka SS, Hutmacher DW (2007) Vitrification as a prospect for cryopreservation of tissue-engineered constructs. *Biomaterials* 28:1585-1596

Kuleshova LL, Lopata AMB (2002) Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and Sterility* 78(3):449-54

Kvist K, Thorup J, Byskov AG, Høyer PE, Mollgard K, Yding Andersen C (2006) Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Human Reproduction* 21(2):484-491

Lehle K, Hoenicka M, Jacobs VR, Schmid FX, Birnbaum DE (2005) Cryopreservation of human endothelial cells for vascular tissue engineering. *Cryobiology* 50:154-161

Luciano AM, Chigioni S, Lodde V, Franciosi F, Luvoni GC, Modena SC (2009) Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. *Cryobiology* 59:90-95

Mazur, P (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physio* 247:125-142

Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, Schiff E, Dor J (2005) Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 353(3):318-21

Meryman HT (2007) Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* 47:935-945

Meryman HT, Kafig E (1955) Rapid freezing and thawing of whole blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 90(3):587-589

Metze, K. *Patologia Geral*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

Miyamoto Y, Suzuki S, Nomura K, Enosawa S. (2006) Improvement of hepatocyte viability after cryopreservation by supplementation of long-chain oligosaccharide in the freezing medium in rats and humans. *Cell Transplant* 15:911-919

- Murua A, Orive G, Hernández RM, Pedraz JL (2009) Cryopreservation based on freezing protocols for the long-term storage of microencapsulated myoblasts. *Biomaterials* 30:3495-3501
- Naro E, Ghezzi F, Raio L, Franchi M, D'Addario V (2001) Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *European Journal of Obstetrics and Reproductive Biology* 96:150-157
- Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R (1996) Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 11:1487-1491
- Notman R, Noro M, O'Malley B, Anwar J (2006) Molecular basis for Dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *J. AM. CHEM. SOC.* 128:13982-13983
- Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, Opsahl M, Rosenwaks Z (2004) Embryo development after heterotopic transplantation ovarian tissue. *Lancet* 363:837-840
- Oskam I, Lund T, Santos R (2011) Irreversible Damage in Ovine Ovarian Tissue after Cryopreservation in Propanediol: Analyses after In vitro Culture and Xenotransplantation. *Reprod Dom Anim* DOI 10.1111/j.1439-0531.2010.01743.x
- Rowe AW (1996) Cryopreservation in blood banking - frozen blood for transfusion Preservation of blood by the low glycerol-rapid freeze process. *Vox Sanguinis* 70(3):50-56
- Salvetti P, Buff S, Afanassieff M, Daniel N, Guérin P, Joly T (2010) Structural, metabolic and developmental evaluation of ovulated rabbit oocytes before and after cryopreservation by vitrification and slow freezing. *Theriogenology* 74: 847-855
- Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE (2005) Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells* 23: 220-229
- Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça LL, Cerqueira A, Carvalho MD, Jazedje T, Okamoto OK, Muotri AR, Zatz M (2008) Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood! *Stem Cells* 26:146-150
- Son JH, Kim KH, Nam YK, Park JK, Kim SK (2004) Optimization of cryoprotectants for cryopreservation of rat hepatocyte. *Biotechnology Letters* 26:829-833

Succu S, Leoni GG, Berlinguer F, Madeddu M, Bebbere D, Mossa F, Bogliolo L, Ledda S, Naitana S. (2007) Effect of vitrification solutions and cooling upon in vitro matured prepubertal ovine oocytes. *Theriogenology* 68:107-114

Succu S, Bebbere D, Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Leoni GG, Berlinguer F, Naitana S, Ledda S (2008) Vitrification of In Vitro Matured Ovine Oocytes Affects In Vitro Pre-Implantation Development and mRNA Abundance. *Molecular Reproduction and Development* 75:538-546

Takahashi T, Hirsh A, Erbe E, Williams RJ (1988) Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes. *Biophys J* 54:509-518

Thomaz BAC, Biondo-Simões MLP, Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Ceschin AP, Ioshii SO (2005) Aspectos histológicos do ovário de coelhas após criopreservação. *Rev Bras Ginecol Obstet* 27(11):642-9

Valeri CR, Ragno G, Pivacek LE, Cassidy GP, Srey R, Hansson-Wicher M, Leavy ME (2000) An experiment with glycerol-frozen red blood cells stored at 80 degrees for up to 37 years. *Vox Sang* 79:168-174

Weiss ML, Troyer D (2006) Stem Cells in the Umbilical Cord. *Stem Cell Reviews* 2:155-1663

Yokota Y, Sato S, Yokota M, Ishikawa Y, Makita M, Asada T, Araki Y (2000) Successful pregnancy following blastocyst vitrification. *Human Reproduction* 15(8):1802-1803

Yu HB, Shen GF, Wei FC (2007) Effect of Cryopreservation on the Immunogenicity of Osteoblasts. *Transplantation Proceedings* 39:3030-3031

Yu-Bin L, Zhou CQ, Yang GF, Wang Q, Dong Y (2007) Modified vitrification method for cryopreservation of human ovarian tissues. *Chin Med J* 120:110-114

4. CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS

“Padronização dos métodos”

“Método de criopreservação alternativo (Congelamento a -80°C)”

Padronização dos métodos

Inicialmente, as amostras coletadas foram utilizadas para a padronização dos métodos de cultura e viabilidade celular, congelamento lento, vitrificação e descongelamento. Nove amostras de cordão umbilical foram necessárias até se adequar a quantidade de fragmentos para a realização de todos os processos.

Devido à celularidade baixa dos tecidos de cordão umbilical, foram necessários o mínimo de 20 fragmentos, com 5x2x2mm cada, para o cultivo celular, já que quantidades menores de tecido não apresentaram crescimento em cultura ou o desenvolvimento era muito lento. O tempo de digestão com colagenase foi padronizado em três horas, suficiente para digerir os tecidos, mas manter alguns fragmentos em tamanho ideal para aderirem ao frasco de cultura e iniciar crescimento de colônias celulares. Foi definido também que seriam comparados os tecidos da geléia de Wharton e da membrana de revestimento, uma vez que, aparentemente, a última apresentava melhor crescimento em cultura.

Para a criopreservação, foi estabelecido o uso das soluções crioprotetoras resfriadas a 4°C, em vez de à temperatura ambiente, pois isso diminui a toxicidade. Os protocolos de criopreservação também foram testados. Foi avaliado um protocolo de congelamento lento utilizado para células, que consistia em manter as amostras por 10 minutos a 4°C e depois congelar a taxa de congelamento de -1°C/min até -80 °C, porém, com esse protocolo não houve crescimento celular das amostras após o descongelamento. Testou-se então, o protocolo de congelamento lento de Yu-bin et al (2007), modificando-se o descongelamento. Para a vitrificação também foram feitos testes: 1) os fragmentos foram colocados dentro de criotubos e então mergulhados em nitrogênio líquido; 2) foi usada a metodologia do congelamento lento, com os fragmentos colocados em criotubos com crioprotetores e então mergulhados em nitrogênio líquido; mas esses protocolos não mostraram crescimento em cultura, além de fugirem à definição de vitrificação, então foram abandonados e a vitrificação foi realizada conforme Yu-bin et al (2007), com modificações no descongelamento.

Para o descongelamento, os autores descrevem a passagem do tecido descongelado em três soluções de sacarose e meio de cultura de concentrações decrescentes. Entretanto, nesse estudo esse procedimento não apresentou resultados satisfatórios. Foi observada a destruição dos tecidos, definida pelo aspecto dos fragmentos, que “desmanchavam” ao serem mergulhados nas soluções de sacarose, confirmada pela ausência de viabilidade celular, após o descongelamento, e ausência total de crescimento celular em cultura. Isso provavelmente estava sendo provocado pela desidratação excessiva, decorrente dos banhos de sacarose no descongelamento. E de fato, ao eliminarmos os banhos de sacarose do descongelamento, passando a se colocar o tecido

descongelado imediatamente em meio de cultura, o aspecto do tecido era visualmente melhor, e tinha-se viabilidade celular e crescimento em cultura.

Resultados adicionais e discussão:

Método de criopreservação alternativo (Congelamento a -80°C)

Durante o período de padronização, o equipamento de congelamento programado Cryomed quebrou e foram necessários alguns dias até o conserto. Nesse período, o método de congelamento lento teve de ser substituído por um método alternativo, *congelamento a -80°C*, que consistiu em: preparar as amostras da mesma maneira que para o congelamento lento, utilizando as mesmas soluções crioprotetoras e colocando as amostras em criotubos contendo 1mL de solução crioprotetora 2, porém, ao invés de serem encaminhadas para a câmara de congelamento programado, os criotubos foram levados ao freezer a -80°C, mantidos por 24 horas, e então colocados em nitrogênio líquido. Três amostras (**A**, **B** e **C**) foram submetidas a esse método e à vitrificação e, após o descongelamento, a eficiência das criopreservações foi avaliada através de análise histológica, de viabilidade celular, de cultivo celular, análise citogenética e comparação com os resultados das respectivas amostras a fresco.

O congelamento a -80°C realizado neste estudo, embora seja um procedimento direto em freezer, sem utilização do equipamento controlado, foi mais semelhante ao congelamento lento, pois utilizou das mesmas soluções crioprotetoras e iguais concentrações, diferentemente da vitrificação, que utilizou crioprotetores em maior quantidade e concentração. Provavelmente pela semelhança na metodologia empregada, todos os resultados do congelamento a -80°C foram semelhantes aos encontrados para o congelamento lento nas 10 amostras descritas no capítulo 1.

As amostras permaneceram congeladas de 2 a 3 dias (Tabela 2). A vitrificação mostrou resultados menos satisfatórios do que o congelamento a -80°C tanto na avaliação histológica quanto na viabilidade celular e cultura. Na análise histológica, foi detectada a presença de edema intersticial na totalidade das amostras pós-vitrificação (geléia de Wharton e membrana de revestimento), enquanto apenas uma amostra da geléia de Wharton pós-congelamento a -80°C apresentou edema intersticial. Além disso, todas as amostras da membrana de revestimento apresentaram vacúolo nas células epiteliais, após os processos de criopreservação. Quanto à viabilidade celular, após a vitrificação, a maioria das amostras não apresentou células viáveis. Por outro lado, após o congelamento a -80°C todas as amostras apresentaram células viáveis, com média de 63,33% para geléia de

Tabela 2: Resultados da viabilidade celular, tempo em cultivo celular, análise histológica e análise citogenética para os dois tecidos estudados do cordão umbilical (geléia de Wharton e membrana de revestimento), divididos nos grupos: a fresco (controle), pós-congelamento a -80°C e pós-vitrificação.

GELÉIA DE WHARTON													
Amostras	Fresco				Pós-congelamento a -80°C				Pós-vitrificação				Tempo de congelamento (dias)
	Viabilidade (%)	Cultura (dias)	Histologia	Cariótipo	Viabilidade (%)	Cultura (dias)	Histologia	Cariótipo	Viabilidade (%)	Cultura (dias)	Histologia	Cariótipo	
A	76,6	11	1+	46,XX[30]	75	-	3+	-	0	-	4+	-	2
B	60	13	N	46,XY[30]	56	20	N	46,XY[30]	0	-	4+	-	3
C	66,66	21	N	46,XY[30]	60	19	N	46,XY[30]	0	-	4+	-	3
Média	67,75	15			63,66	19,5							2,67
SD	8,35	5,29			10,01	0,70							0,58
MEMBRANA DE REVESTIMENTO													
Amostras	Fresco				Pós-congelamento a -80°C				Pós-vitrificação				Tempo de Congelamento (dias)
	Viabilidade (%)	Cultura (dias)	Histologia	Cariótipo	Viabilidade (%)	Cultura (dias)	Histologia	Cariótipo	Viabilidade (%)	Cultura (dias)	Histologia	Cariótipo	
A	62,8	11	*4+	46,XX[4]	57,1	18	*4+	46,XX[30]	0	-	*4+	-	2
B	87,5	9	N	46,XY[30]	66,6	17	*4+	46,XY[30]	33,3	21	*4+	46,XY[30]	3
C	66,6	11	N	46,XX[30]	62,8	15	*4+	46,XY[30]	0	-	*4+	-	3
Média	72,3	10,33			62,16	16,66			11,10				2,67
SD	13,3	11,54			4,78	1,52			19,22				0,58

SD: Desvio padrão; -: Ausência de crescimento celular, conseqüentemente, não há cariótipo nem tempo de cultura; N: morfologia normal; E 2+: edema moderado; E 3+: edema intenso; E 4+: edema muito intenso; * presença de vacúolo (ou edema intracelular) nas células epiteliais, culminando na degeneração do epitélio

Wharton e de 62,17% para membrana de revestimento. A vitrificação também prejudicou a capacidade de proliferação em cultura, visto que apenas uma amostra (membrana de revestimento) apresentou crescimento celular *in vitro*, enquanto após o congelamento a -80°C, a maioria das amostras cresceu em cultura. Em relação ao resultado citogenético, todas as amostras apresentaram cariótipos normais.

A amostra **A** foi a única que apresentou edema intersticial nos tecidos a fresco e vacúolo nas células epiteliais, culminando com a degeneração do epitélio, na membrana de revestimento a fresco. Essas alterações podem ser atribuídas a trações e torções do cordão umbilical durante o parto. Fato que talvez também explique a presença de edema intersticial 3+ e a ausência de crescimento em cultura, observados na geléia de Wharton pós congelamento -80°C, diferente dos resultados das outras duas amostras desse grupo.

O protocolo de vitrificação utilizado não se mostrou um método adequado para a criopreservação dos tecidos de cordão umbilical. Isso se deve provavelmente ao procedimento agressivo de contato direto com nitrogênio líquido e da presença de maiores quantidades e concentrações de crioprotetores, inclusive de propanodiol, que é altamente tóxico para as células, e não foi utilizado para o congelamento -80°C. Resultados semelhantes também foram relatados por outros autores, ao avaliarem tecido ovariano humano (Gook et al. 2000, Oskam et al. 2011).

O efeito tóxico dos crioprotetores pode ainda ter causado aumento da permeabilidade capilar, o que pode ter contribuído para a formação de edema e vacúolos. Karlsson & Toner afirmam que os crioprotetores químicos devem ser usados com moderação, porque eles mesmos são tóxicos para as células, principalmente se usados em altas concentrações. Essa toxicidade acontece porque, paradoxalmente, a presença desses agentes pode aumentar a retenção de água citoplasmática, elevando a possibilidade de formação de gelo intracelular e causando injúria às células (Karlsson & Toner, 1996). Provavelmente o edema intersticial encontrado não afetou a sobrevivência ou viabilidade celular, como faz o edema intracelular (ou vacúolo). Kim et al (2011) sugeriram que a presença de vacúolos pode ter interferido na viabilidade celular de ovários murinos. Ainda, a presença de vacúolos nas células epiteliais da membrana de revestimento provavelmente não afetou a capacidade de proliferação celular em cultura, pois as células alvo do cultivo celular realizado nesse estudo foram os fibroblastos presentes na região subamniótica do cordão umbilical.

O tempo de armazenamento das amostras em nitrogênio líquido foi curto, com média de 2,67 dias, o que não interferiu nos resultados das análises realizadas. Está bem estabelecido também que o tempo de armazenamento no nitrogênio líquido não interfere nas características das amostras após o congelamento, já que a essa temperatura o metabolismo celular está parado e não ocorrem reações (Mazur, 1984).

De uma forma geral, os resultados do congelamento a -80°C mostraram que este foi um protocolo eficiente para criopreservação dos tecidos do cordão umbilical, capaz de preservar as células viáveis com capacidade de proliferação *in vitro* após o descongelamento. Já a vitrificação, também nessas três amostras adicionais, não foi um método eficiente para o proposto, configurando uma necessidade de mais estudos, testando outros protocolos de vitrificação na tentativa do estabelecimento de uma metodologia adequada de vitrificação para tecidos do cordão umbilical.

5. CONCLUSÕES

Com os resultados deste estudo concluímos que:

- É possível criopreservar pequenos fragmentos de tecidos de cordão umbilical, obter células viáveis e com capacidade de proliferação *in vitro*, após o descongelamento.
- O protocolo de congelamento lento se mostrou adequado para criopreservação dos tecidos de cordão umbilical, principalmente por apresentar taxas mais altas de células viáveis e melhores resultados de crescimento em cultura celular.
- O protocolo de vitrificação utilizado não foi eficiente para a criopreservação dos tecidos de cordão umbilical, por mostrar maior proporção de alterações histológicas, taxas muito baixas de viabilidade celular e de proliferação celular *in vitro*.
- O protocolo de congelamento a -80°C se mostrou adequado para criopreservação de tecidos do cordão umbilical, mostrando resultados semelhantes aos do congelamento lento. No entanto são necessários mais estudos com maior número de amostras para confirmar sua eficiência.
- Esses resultados contribuem para criação e implantação de um banco de tecidos criopreservados, entretanto mais estudos, com um número maior de amostras, testando-se outros crioprotetores, e avaliando-se outros parâmetros como, por exemplo, a capacidade de preservação das células-tronco dos tecidos do cordão umbilical, deverão ser realizados buscando-se aprimorar os resultados aqui obtidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUDELO, C. A.; IWATA, H. The development of alternative vitrification solutions for microencapsulated islets. *Biomaterials*, v. 29, p. 1167–76, 2008.

BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P. Anatomy and Pathology of the Umbilical Cord, in *Pathology of the Human Placenta*. York: Springer-Verlag, p. 380–451, 2000.

COVAS DT, SIUFI JL, SILVA AR, ORELLANA. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, p. 1179-1183, 2003.

DINNYÉS A, DAI Y, JIANG S, YANG X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 513-518, 2000.

FAHY GM, WOWK B, WU J, PHAN J, RASCH C, CHANG A, ZENDEJAS E. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology*, Rancho Cucamonga, CA, USA, v. 48, p. 157–178, 2004.

FAHY, G. M.; WOWK, B; WU, J. Cryopreservation of Complex Systems: The Missing link in the Regenerative Medicine Supply Chain. *Rejuvenation Research*, v.9, n. 2, 2006.

FERGUSON, V. L.; DODSON, R. B. Bioengineering aspects of the umbilical cord. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 144, p.108–113, 2009.

GEBRANE-YOUNES, J; HOANG, N. M.; ORCEL, L. Ultrastructure of human umbilical vessels: a possible role in amniotic fluid formation? *Placenta*, v.7, p.173–85, 1986.

GONDA K, SHIGEURA T, SATO T, MATSUMOTO D, SUGA H, INOUE K, AOI N, KATO H, SATO K, MURASE S, KOSHIMA I, YOSHIMURA. Preserved Proliferative Capacity and Multipotency of Human Adipose-Derived Stem Cells after Long-Term Cryopreservation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v.121, n. 2, 2008.

GOOK, D. A.; EDGAR, D. H.; STERN, C. The effects of cryopreservation regimens on the morphology of human ovarian tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 169, p. 99 – 103, 2000.

GOUK SS, LOH YF, KUMAR SD, WATSON PF, KULESHOVA LL. Cryopreservation of mouse testicular tissue: prospect for harvesting spermatogonial stem cells for fertility preservation. *Fertility and Sterility*, v. 95, n. 7, 2011.

GREEN, R. E. Princípios e Técnicas da Vitrificação de Embriões dos Animais Domésticos. Monografia apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da UNESP-Botucatu, p. 21, 2005.

HENGSTLER JG, UTESCH D, STEINBERG P, PLATT KL, DIENER B, RINGEL M, SWALES N, FISCHER T, BIEFANG K, GERL M, BÖTTGER T, OESCH F. Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metab Rev*, v. 32, p. 81-118, 2000.

HUANG CC, LEE TH, CHEN SU, CHEN HH, CHENG TC, LIU CH, YANG YS, LEE MS. Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification. *Human Reproduction*, v.20, n.1, p. 122–128, 2005.

HUANG L, MO Y, WANG W, LI Y, ZHANG Q, YANG D. Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification. *Reproductive Biology*, v. 139, p. 193–198, 2008.

IEROPOLI S, MASULLO P, SANTO MDO E, SANSONE G. Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the fertilization viability of spermatozoa of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Cryobiology*, v. 49, p. 250-257, 2004.

ISHIMORI H, SAEKI K, INAI M, NAGAO Y, ITASAKA J, MIKI Y, SEIKE N, KAINUMA H. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology*, v. 40, p. 427-433, 1993.

KARLSSON, J. O. M.; TONER, M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*, v. 17, p. 243-256, 1996.

KEROS V, XELLA S, HULTENBY K, PETTERSSON K, SHEIKHI M, VOLPE A, HREINSSON J, HOVATTA. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Human Reproduction*, v.24, n.7, p. 1670–1683, 2009.

KIM GA, KIM HY, KIM JW, LEE G, LEE E, AHN JY, PARK JH, LIM JM. Effectiveness of slow freezing and vitrification for long-term preservation of mouse ovarian tissue. *Theriogenology*, v. 75, p. 1045–1051, 2011.

KITA K, GAUGLITZ GG, PHAN TT, HERNDON DN, JESCHKE MG. Characterization of Mesenchymal Stem Cells From the Sub-Amniotic Human Umbilical Cord Lining Membrane. *Stem Cells and Development*, v. 19, n. 4, 2010.

KULESHOVA, L. L.; GOUK, S. S.; HUTMACHER, D.W. Vitrification as a prospect for cryopreservation of tissue-engineered constructs. *Biomaterials*, v. 28, p. 1585–1596, 2007.

KULESHOVA, L. L.; LOPATA, A.M.B. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and Sterility*, v. 78, n. 3, 2002.

KVIST K, THORUP J, BYSKOV AG, HØYER PE, MOLLGARD K, YDING ANDERSEN C. Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Human Reproduction*, v.21, n.2, p. 484–491, 2006.

LA SALA GB, NICOLI A, VILLANI MT, PESCARINI M, GALLINELLI A, BLICKSTEIN I. Outcome of 518 salvage oocyte-cryopreservation cycles performed as a routine procedure in an in vitro fertilization program. *Fertility and Sterility*, v. 86, n. 5, 2006.

LEE MW, CHOI J, YANG MS, MOON YJ, PARK JS, KIM HC, KIM YJ. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 320, p.273–278, 2004.

LUCIANO AM, CHIGIONI S, LODDE V, FRANCIOSI F, LUVONI GC, MODINA SC. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. *Cryobiology*, v. 59, p. 90 – 95, 2009.

LUYET, B. Working hypotheses on the nature of life. *Biodynamica*. v. 1; p. 1–7, 1937.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physio*, v. 247, p. 125-142,1984.

MERYMAN, H. T. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion*, v. 47, p. 935-945, 2007.

MERYMAN, H. T.; KAFIG, E. Rapid freezing and thawing of whole blood. *Exp Biol Med*, v. 90, p. 587-589, 1955.

MITCHELL KE, WEISS ML, MITCHELL BM, MARTIN P, DAVIS D, MORALES L, HELWIG B, BEERENSTRAUCH M, ABOU-EASA K, HILDRETH T, TROYER D, MEDICETTY S. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*, v. 21 (1), p. 50-60, 2003.

MIYAMOTO Y, SUZUKI S, NOMURA K, ENOSAWA S. Improvement of hepatocyte viability after cryopreservation by supplementation of long-chain oligosaccharide in the freezing medium in rats and humans. *Cell Transplant*, v. 15, p. 911-919, 2006.

MURUA A, ORIVE G, HERNÁNDEZ RM, PEDRAZ JL. Cryopreservation based on freezing protocols for the long-term storage of microencapsulated myoblasts. *Biomaterials*, v. 30, p. 3495–3501, 2009.

NARO E, GHEZZI F, RAIIO L, FRANCHI M, D'ADDARIO V. Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *European Journal of Obstetrics and Reproductive Biology*, v. 96, p. 150 – 157, 2001.

OSKAM, I. C.; LUND, T.; SANTOS, R.R. Irreversible Damage in Ovine Ovarian Tissue after Cryopreservation in Propanediol: Analyses after In vitro Culture and Xenotransplantation. *Reprod Dom Anim*, v.10. p. 1-7, 2011.

PANEPUCCI RA, SIUFI JL, SILVA WA JR, PROTO-SIQUIERA R, NEDER L, ORELLANA M, ROCHA V, COVAS DT, ZAGO MA. Comparison of Gene Expression of Umbilical Cord Vein and Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, v. 22, p. 1263-1278, 2004.

QUINN P, KERIN JFP, STONE BA, WILSON LA. Successful cryopreservation of human oocytes. *Ann Mtg Canadian Fertil. Androl. Soc.*, p. 72, 1986.

RALL ,W. F.; FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, v.313, p. 573–5, 1985.

ROWE, A. W. Preservation of blood by the low glycerol-rapid freeze process. *Association of Blood Banks*; p. 55–72, 1973.

SARUGASER R, LICKORISH D, BAKSH D, HOSSEINI MM, DAVIES JE. Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells*, v. 23, p. 220-229, 2005.

SECCO M, ZUCCONI E, VIEIRA NM, FOGAÇA LL, CERQUEIRA A, CARVALHO MD, JAZEDJE T, OKAMOTO OK, MUOTRI AR, ZATZ M. Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood! *Stem Cells*, v. 26, p. 146–150, 2008.

SON JH, KIM KH, NAM YK, PARK JK, KIM SK. Optimization of cryoprotectants for cryopreservation of rat hepatocyte. *Biotechnology Letters*, v. 26, p. 829-833, 2004.

TAKAHASHI T, HIRSH A, ERBE E, WILLIAMS RJ. Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes. *Biophys J*, v. 54, p 509-518, 1988.

TAMMANN, G. Ueber die abh angkeit der Zahl der Kernr, welche sich in verschiedenen unterkohlten flussigkeiten bilden, von der temperatur. *Phys Chem*, v. 25, p.441–79, 1898.

VALERI CR, RAGNO G, PIVACEK LE, CASSIDY GP, SREY R, HANSSON-WICHER M, LEAVY ME. An experiment with glycerol-frozen red blood cells stored at 80 degrees for up to 37 years. *Vox Sang*, v. 79, p. 168-174, 2000.

WANG HS, HUNG SC, PENG ST, HUANG CC, WEI HM, GUO YJ, FU YS, LAI MC, CHEN CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton’s jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, v. 22, p. 1330–1337, 2004.

WHARTON, T.W. *Adenographia*. Oxford: Oxford Press; p. 242–8, 1996.

YOKOTA Y, SATO S, YOKOTA M, ISHIKAWA Y, MAKITA M, ASADA T, ARAKI Y. Successful pregnancy following blastocyst vitrification. *Human reproduction*, v. 5, n. 8, p. 1802-1803, 2000.

YU-BIN L, ZHOU CQ, YANG GF, WANG Q, DONG Y. Modified vitrification method for cryopreservation of human ovarian tissues. *Chin Med J*, v. 120, p. 110-114, 2007.

7. APÊNDICE

Apêndice 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DESTINADO ÀS MULHERES DOADORAS DE CORDÃO UMBILICAL

Projeto: CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL

Coordenadora: Prof^ª. Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG: Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – SL 2005 – CEP: 31.270-901 – BH/MG – Tel: (031) 3409-4592 – Fax: (31) 3409-4516 – e-mail: prpq@coep.ufmg.br

Neste estudo pretende-se congelar amostras de cordão umbilical para avaliar a integridade e a viabilidade das células após o descongelamento. Os tecidos do cordão umbilical são fontes de células-tronco adultas e a padronização da técnica de congelamento/descongelamento contribuirá para futura criação de bancos de tecidos criopreservados, visando uma possibilidade futura de uso de células-tronco para terapia celular.

A amostra será coletada imediatamente após o nascimento do bebê, a partir do cordão umbilical que é desprezado após o parto. O procedimento não é invasivo, portanto, não proporciona riscos para a mãe e/ou bebê.

A doação do cordão umbilical irá contribuir para a realização desse estudo (Criopreservação de tecido de Cordão Umbilical) e não trará nenhum benefício direto ou imediato para os pacientes, ou seja, não implicará em nenhum tipo de remuneração financeira para os doadores, não visa fins lucrativos e em hipótese alguma o cordão umbilical será coletado para fins terapêuticos. A amostra colhida será utilizada somente neste estudo, seu uso em outro estudo só acontecerá mediante um novo consentimento dos pacientes.

Os pacientes terão a garantia: de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa; de que suas identidades serão mantidas em sigilo; da liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo algum ao atendimento e acompanhamento médico da mãe e/ou do bebê.

Dados de identificação da mãe

Nome da mãe _____

Identidade _____ CPF _____

Endereço _____

Bairro _____ Cidade _____ Estado _____

Telefone _____ Data de nascimento _____

_____, _____ de _____, de 2010.

Participante da pesquisa

Pesquisadora responsável: Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard

Laboratório de Genética Animal e Humana/Departamento de Genética/Universidade Federal de Minas Gerais

Telefone: (31) 34092594