



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LUANA GATTI

**Revisão sistemática de literatura em células-tronco hematopoiéticas
Implicação da metodologia de criopreservação**

CAMPINAS

2019

LUANA GATTI

Revisão sistemática de literatura em células-tronco hematopoiéticas
Implicação da metodologia de criopreservação

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Hemoterapia,
na área de Hemoterapia.

ORIENTADOR: PROF. DR. AFONSO CELSO VIGORITO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA LUANA GATTI E ORIENTADA PELO
PROF. DR. AFONSO CELSO VIGORITO.

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

G229r Gatti, Luana, 1984-
Revisão sistemática de literatura em células-tronco hematopoiética :
implicação da metodologia de criopreservação / Luana Gatti. – Campinas,
SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Afonso Celso Vigorito.
Dissertação (mestrado profissional) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Células-tronco hematopoiéticas. 2. Transplante de células-tronco
hematopoiéticas. 3. Transplante autólogo. 4. Criopreservação. I. Vigorito,
Afonso Celso. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Systematic review of hematopoietic stem cell literature : implication
of cryopreservation methodology

Palavras-chave em inglês:

Hematopoietic stem cells

Hematopoietic stem cell transplantation

Transplantation, Autologous

Cryopreservation

Área de concentração: Hemoterapia

Titulação: Mestra em Hemoterapia

Banca examinadora:

Afonso Celso Vigorito [Orientador]

Jose Francisco Comenalli Marques Junior

Youko Nukui

Data de defesa: 26-07-2019

Programa de Pós-Graduação: Hemoterapia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0127-2062>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6879092848289291>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LUANA GATTI

ORIENTADOR: PROF. DR. AFONSO CELSO VIGORITO

MEMBROS:

- 1. Prof. Dr. Afonso Celso Vigorito**
- 2. Prof. Dr. Jose Francisco Comenalli Marques Junior**
- 3. Prof. Dra. Youko Nukui**

Programa de Pós-Graduação em Mestrado Profissional em Hemoterapia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM

DATA DA DEFESA 26/07/2019

Dedico esta conquista na minha vida
àqueles que fazem parte dela, aos que
me amam incondicionalmente...

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, meus profundos agradecimentos ao meu orientador Prof. Dr. Afonso Celso Vigorito, por todo seu tempo disponibilizado, sugestões e todo conhecimento transferido, sempre muito prestativo.

Agradeço ao meu eterno namorado Cesar Rodrigo da Silva que além de cuidar da manutenção do lar enquanto eu permanecia ocupada com este projeto, foi capaz de me incentivar todos os dias. Grata por me ajudar a realizar este sonho.

Às minhas primas, Aline Pasquoto Perissinotto e Amanda Pasquoto Perissinotto com as orientações e correções, toda dedicação e tempo prestado, vocês são fenomenais, amo incondicionalmente.

Agradeço ao meu primo, Emerson Rafael Lopes e equipe de TMO do Hospital geral de São Jose do Rio Preto pelo conhecimento e tempo disponibilizado, meu muito obrigada.

À minha mais bela e amada filha Letícia Pereira, que mesmo ainda não entendendo muito este mundo das responsabilidades ajudou com tudo que pode, te amo além do infinito.

Agradeço ao meu chefe, Hematologista Dr. Andre Lourenço Gervatosk, por todo conhecimento e disponibilidade que me proporcionou para que completasse este trabalho.

Agradeço à responsável pelo laboratório de criopreservação da UNICAMP, Dra. Suiellen Carvalho Reis Alves pelas orientações, paciência e tempo disponibilizado.

E a Deus, me ensinou que nossa verdadeira força surge junto à nossa fraqueza, que só conseguimos nossas conquistas graças aos pequenos milagres que Ele faz por meio de todos que estão ao nosso redor.

RESUMO

O Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH) baseia-se no princípio de infusão de Células-Tronco Hematopoiéticas CD34⁺, autólogas ou alogênicas, em um receptor condicionado, consiste no tratamento de quimioterapia de alta dosagem levando a uma ablação da medula óssea. Até recentemente, apenas a Medula Óssea (MO) era utilizada como fornecedora de células-tronco hematopoéticas, mas outras fontes como o sangue de cordão umbilical (SCUP) e o sangue periférico (SP) são alternativas de enxerto. A infusão das células precursoras pode ser realizada dias ou meses após a sua coleta, nesta situação, o seu congelamento faz-se necessário para que as células permaneçam viáveis. Durante a criopreservação e o descongelamento, a principal causa para a morte celular não está associada ao armazenamento em longo prazo, a baixas temperaturas, mas sim aos processos de resfriamento e aquecimento que ocorrem em diferentes temperaturas, o que pode levar a formação de cristais de gelo e lise celular. O mecanismo de ação do crioprotetor é complexo e seu efeito protetor está ligado à sua capacidade de se unir às moléculas de água no intracelular, ou na membrana celular, para evitar a formação de gelo no intracelular. O objetivo deste trabalho é elaborar um manual técnico operacional de criopreservação de células tronco hematopoiética do sangue periférico (SP) e da medula óssea (MO). A metodologia empregada foi uma revisão sistemática da literatura, considerando os métodos existentes em relação ao processamento e criopreservação das CTH e um conjunto de ações organizacionais conforme legislação vigente. Foi elaborado um manual técnico operacional que inclui as descrições do recebimento, processamento, crioprotetores utilizados, metodologia de congelamento controlado e não controlado, utilizando freezer mecânico, nitrogênio líquido e vapor e o controle de qualidade das células tronco hematopoiéticas (CTH). Para maior segurança no tratamento de pacientes submetidos ao TCTH, o laboratório de criopreservação deve estabelecer critérios que garantam a qualidade em todo o processo de congelamento e armazenamento.

Palavras-chave: Células-tronco hematopoiéticas; transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogo; criopreservação.

ABSTRACT

Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) is based on the principle of infusion of autologous or allogeneic CD34 + Hematopoietic Stem Cells into a conditioned recipient. It is the treatment of high-dose chemotherapy leading to bone marrow ablation. Until recently, only bone marrow (MO) was used as a supplier of hematopoietic stem cells, but other sources such as umbilical cord blood (SCUP) and peripheral blood (SP) are graft alternatives. The infusion of the precursor cells can be performed days or months after their collection, in this situation, their freezing is necessary for the cells to remain viable. During cryopreservation and thawing, the main cause for cell death is not associated with long-term storage at low temperatures, but rather with cooling and heating processes occurring at different temperatures, which can lead to the formation of crystals of ice and cell lysis. The mechanism of action of the cryoprotectant is complex and its protective effect is linked to its ability to bind to water molecules in the intracellular or cell membrane to prevent intracellular ice formation. The objective of this work is to elaborate an operational technical manual for cryopreservation of hematopoietic stem cells from peripheral blood (SP) and bone marrow (MO). The methodology used was a systematic review of the literature, considering the existing methods in relation to the processing and cryopreservation of HTCs and a set of organizational actions according to current legislation. A technical operational manual was prepared, which includes the descriptions of the reception, processing, cryoprotectants used, controlled and uncontrolled freezing methodology, using mechanical freezer, liquid nitrogen and steam and quality control of hematopoietic stem cells (HTCs). For a greater safety in the treatment of patients undergoing HSCT, the cryopreservation laboratory should establish criteria to guarantee quality in all freezing and storage processes.

Keywords:

Hematopoietic stem cells; autologous hematopoietic stem cell transplantation; cryopreservation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Grau Celsius

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Art. - Artigo

CEP - Código de Endereçamento Postal

CID - Classificação Internacional de Doenças

CN - Células nucleadas

CRM - Conselho regional de Medicina

CTH - Células tronco hematopoiéticas

CTH-MO - Célula tronco hematopoiética de medula óssea

CTH-SP - Célula tronco hematopoiética de sangue profético

CTP - Células tronco pluripotentes

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EG- Etilenoglicol

EPC - Equipamento de proteção coletiva

EPI - Equipamentos de proteção individual

HBV - Vírus da hepatite B

HCV - Vírus da Hepatite C

HEA - Hidroxietilamido

HIV - vírus da imunodeficiência humana

HTLV - vírus T-linfotrófico humano

kg - Quilograma

Me₂SO - Dimetilsulfóxido

mL - Mililitro

MO - Medula Óssea

NAT - Detecção de ácido nucleico

NOTIVISA - Sistema de Notificações de Vigilância Sanitária

PCMSO - Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional

PGRSS - Plano de Gerenciamento de resíduos de serviços de saúde

POPs - Protocolos Operacionais Padrão

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RPM - rotações por minuto

SCUP- Sangue de cordão umbilical

SNC - Sistema Nervoso Central

SP - Sangue periférico

TCTH - Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas

UV - Ultravioleta

VF - Volume Final

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	12
2.OBJETIVOS	13
4. METODOLOGIA	21
5. RESULTADOS	23
5.1 Objetivo	25
5.2 Aplicação.....	25
5.3 Responsabilidades	25
5.4 Amostras	25
5.5 Equipamentos	25
5.5.1 Instrumentos	26
5.5.2 Reagentes	26
5.6. Procedimento	27
5.6..1. Coleta das amostras de CTH SP e MO.....	27
5.6.2. Recebimento das amostras.....	27
5.6.3. Dados necessários para cadastro	28
Para cadastro do doador/paciente é necessário informações pessoais que devem estar preenchidas no Formulário (Apêndice 1).	28
5.6.4 Inspeção da amostra	28
5.7.Preparo para processamento	29
5.8. Controle de Qualidade do processamento	30
5.9.Congelamento e Armazenamento:	31
5.10. Recomendações.....	32
5.11. Registros da qualidade e rastreabilidade	32
5.12.Sorologia.....	33
5.13.Liberação e distribuição para uso	34
5.14. Transporte	34
5.15 Descarte.....	37
5.16 Biossegurança:	37
6.DISSCUSSÃO.....	38
7.CONCLUSÃO.....	40
8.REFERÊNCIAS	41
9. APÊNDICE 1	45
9.1.APÊNDICE 2	46

INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

O Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH) baseia-se no princípio de infusão de Células-Tronco Hematopoiéticas CD34⁺, autólogas ou alogênicas, em um receptor condicionado. O congelamento das células-tronco hematopoiéticas (CTH) é necessário, pois a viabilidade em temperatura ambiente é de cerca de setenta e duas horas (1). Contudo as limitações quanto à estabilidade em cultura e a necessidade de criopreservação dessas células por longos períodos com garantia de suas funções, para aplicações clínicas, levaram à busca e ao desenvolvimento de novos protocolos de criopreservação (2). A viabilidade obtida após submeter as células a esse processo, depende basicamente de sua capacidade de resistir à desidratação e ao dano mecânico decorrente da formação de cristais de gelo no seu interior (3). A formação de gelo, vitrificação, é amplamente dependente de três fatores: (I) viscosidade da célula; (II) taxas de resfriamento e aquecimento; e (III) volume do produto (4).

O resfriamento de células e tecidos interfere em diversas vias metabólicas, como na diminuição da atividade da bomba de sódio e potássio, na mudança de fase dos lipídios da membrana plasmática, na função de enzimas e na precipitação de substâncias. Nas técnicas de criopreservação, as células são primeiramente tratadas com agentes crioprotetores, a fim de protegê-las dos danos causados pela desidratação ou geração de cristais de gelo. Estes danos estão correlacionados com a velocidade com que a suspensão celular é congelada. A desidratação e a geração de cristais de gelo ocorrem em baixas e altas velocidades de congelamento, respectivamente. Os procedimentos que são aplicados, na tentativa de minimizar esses danos, são basicamente dois: a utilização de agentes crioprotetores e a velocidade adequada da temperatura de congelamento (2)(5).

Outro aspecto a ser considerado é o transporte da célula colhida até o laboratório processador. A distância entre o local de coleta e os centros de processamento pode variar significativamente. O tempo ideal para processamento é até 72 horas pós coleta, portanto, o tempo entre a colheita e o início da criopreservação deve ser estabelecido para não comprometer a viabilidade das CTH (6).

Outro fator crucial para o sucesso da criopreservação é a temperatura de armazenamento. Alguns estudos sugerem que CTH mantidas entre -70 e -90 °C podem ficar estáveis por meses ou anos. A manutenção em nitrogênio líquido a -196 °C, comparadas a fase de vapor e -80°C, protege mais efetivamente as células e os tecidos dos danos que podem vir acontecer devido à exposição de temperaturas mais elevadas, geradas pela abertura de suas tampas, se frequente (7). Porém, o método de congelamento -80°C é tão eficaz com custo acessível quando comparado ao nitrogênio líquido.

Atualmente não existem diretrizes estabelecidas em relação ao melhor crioprotetor e ao volume ideal que deve ser utilizado. A maioria dos centros de criopreservação tem desenvolvido e validado seus próprios protocolos.

2.OBJETIVOS

Elaborar um manual técnico operacional de criopreservação de CTH, do sangue periférico (SP) e medula óssea (MO), baseado em estudos que garantam a melhor técnica para a manutenção do número e viabilidade celular, durante o período pós coleta, pré congelamento, congelamento e descongelamento, com menor custo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

O TCTH é um tratamento efetivo para doenças hematológicas neoplásicas (leucemias, linfomas) ou não-neoplásicas (anemia aplástica, talassemia, anemia falciforme) ou doenças metabólicas e auto-imunes (8)(9). Ele consiste no tratamento de quimioterapia de alta dosagem levando a uma mieloablação e posterior infusão de CTH para reconstituição da função da MO. Esta quimioterapia prévia à infusão das CTH é denominada de condicionamento.(9)

O tipo de TCTH pode ser classificado de acordo com o tipo de doador das CTH. Transplante alogênico é aquele em que a CTH é fornecida por um doador que não é o paciente, este doador pode ser aparentado ou não aparentado (9).

O transplante autólogo é aquele em que o doador das CTH é o próprio paciente. O transplante singênico é quando o doador é um irmão gêmeo idêntico (9).

O TCTH também pode ser classificado de acordo com a fonte de CTH. As fontes de CTH são a MO, SP e o sangue de cordão umbilical (SCUP). O antígeno CD34⁺ é o identificador das células tronco pluripotentes (CTP) nos diferentes tipos de enxerto. Ele está presente em 1% a 4% das células da MO responsáveis pela formação das colônias hematopoéticas e que são capazes de reconstituir a hematopoese, indicando que as células progenitoras pluripotenciais estão presentes. No entanto, as células CD34⁺, na periferia, correspondem a 1/10 da concentração da MO, em condições fisiológicas normais (10).

Por este motivo, as CTP precisam ser mobilizadas com quimioterapia e/ou fatores de crescimento de granulócitos para se atingir o número adequado no sangue periférico e viabilizar o TCTH (10). Após o condicionamento, o enxerto geralmente é infundido a fresco, nos TCTH alogênicos, e nos autólogos podem ser coletadas e criopreservadas para manter a viabilidade das CTH e posterior infusão (11).

A reconstituição hematopoética após a quimioterapia mieloablativa para TCTH alogênico ou autólogo depende do número de células CD34⁺ coletadas. Segundo Sator et al.(11), um limiar mínimo de $2-2,5 \times 10^6$ células CD34⁺/kg em colheitas de SP foi associado com um enxerto adequado, mas a reconstituição acelerada foi observada com doses mais elevadas de células (11). Outros estudos relataram que $2.5-5.0 \times 10^6$ células CD34⁺/kg são associadas com enxertia mais rápida, mas as células CD34⁺ mínimas/kg no produto para o TCTH autólogo não foram definidas ou padronizadas.(12).

Para coletas de CTH-SP e CTH-MO autólogas e ou alogênicas a resolução Brasileira RDC 214/2018 não define o número de células, mas diz que a contagem celular deve ser relevante e com consentimento do médico do paciente (13). Parkins et al.(14), demonstraram que nos TCTH autólogos os enxertos provenientes do SP contendo $>5 \times 10^6$ células CD34⁺/ kg podem ser armazenados, durante a noite, em temperaturas entre 2-6°C, sem afetar negativamente o tempo de enxertia precoce. Dúvidas existem se o mesmo é verdadeiro para produtos contendo entre 2 e 5×10^6 Células CD34⁺/ kg. O uso da criopreservação no dia seguinte permite uma melhor avaliação do produto, controles da contaminação antes da criopreservação e permite ao pessoal processar e congelar de forma mais conveniente e econômica, sem precipitações. (14).

A criopreservação de CTH é tipicamente feita utilizando o dimetilsulfóxido (Me_2SO) seguido de congelamento lento (5), com temperatura controlada, usando equipamentos de congelamento controlado, ou congelamento mecânicos, sem controle da temperatura.

No congelamento controlado, as CTH do cordão umbilical, MO e as do SP, as temperaturas são reduzidas 1-2°C/min. até atingirem a -40°C. Após atingir esta temperatura, a redução torna-se mais acelerada, 3-5°C/min., até chegar -120°C (15). No congelamento não controlado as CTH são resfriadas a -4°C, e logo após, congeladas a temperatura de -80°C em congelador mecânico (15).

Ao longo dos últimos 20 anos, as CTH do SP foram criopreservadas a -196°C, -152°C, ou -80°C, refletindo as temperaturas do nitrogênio líquido, nitrogênio em fase de vapor e congeladores mecânicos, respectivamente. O Nitrogênio em fase de vapor é o mais utilizado para evitar a contaminação de agentes infecciosos através do nitrogênio líquido (16).

Embora a criopreservação usando nitrogênio líquido e o congelamento controlado sejam adequados para o armazenamento a longo prazo (mais de 10 anos), Detry et al. (16) mostraram que as CTH do SP submetido a congelamento não controlado suportam a reconstituição hematopoiética (16).

No estudo retrospectivo de Detry et al. (16), a reconstituição hematopoética foi analisada em 666 pacientes que receberam TCTH com SP após congelamento a -80°C mantidos com uma duração mediana de 500 dias (variação de 3 - 4148). Foram divididos conforme o período de armazenamento em três grupos. Grupo I armazenamento <6 meses (tempo mediano de criopreservação: 51 dias, intervalo: 3 - 180), Grupo II de 6 a 12 meses (tempo mediano de criopreservação: 232 dias, intervalo: 186 - 359) e grupo III mais de 12 meses (tempo mediano de criopreservação: 714 dias, intervalo: 399 - 4148). A quantidade de células CD34^+ e o uso de fatores de crescimento foram positivamente correlacionados com a recuperação de neutrófilos. A mediana do tempo necessário para atingir os neutrófilos de $0,5 \times 10^9/\text{L}$ foi de 12 (1-43), 11 (7-28) e 11 (5-22) dias nos grupos I, II e III, respectivamente. Em contraste, a reconstituição de neutrófilos foi mais rápida nos grupos II e III em comparação com o grupo I ($P < 0,001$), enquanto nenhuma diferença significativa entre os grupos II e III ($P = 0,8$) foi observada (16).

Concluiu-se que o TCTH com SP submetido a congelamento não controlado a -80°C e com solução criopreservante com 5% de DMSO e HES suportou a reconstituição hematopoiética, comparável aos resultados dos enxertos submetidos a congelamento controlado e criopreservados em vapor de nitrogênio líquido, mesmo após um período prolongado de armazenamento (16).

A principal preocupação com a criopreservação celular reside no processo de congelamento que pode danificar as CTH, por isso, a necessidade de adição de crioprotetores para manter a viabilidade celular e a função celular no momento do descongelamento (14).

Os crioprotetores são substâncias químicas utilizadas para diminuir os danos causados no processo de criopreservação e podem agir interna ou externamente na célula ou no tecido. Os crioprotetores apresentam ação coligativa com as moléculas de água, evitando a formação de cristais de gelo intracelular ou ainda reduzindo os danos causados pelas altas concentrações dos solutos presentes na suspensão de células, evitando a desidratação das proteínas (2). São divididos em duas categorias: permeáveis ou intracelulares, que podem passar pelas membranas celulares, como o glicerol, etilenoglicol (EG), 1,2-propanodiol e dimetilsulfóxido (Me_2SO ou DMSO); e não permeáveis ou extracelulares; esse grupo de crioprotetores atua aumentando a osmolaridade do meio extracelular, promovendo a passagem de água do interior das células para o meio extracelular, o que impede a formação de cristais de gelo em seu interior durante o congelamento. Não são capazes de penetrar nas células e nos tecidos por serem macromoléculas com alto peso molecular, entre eles se destacam os hidroxietilamido (HEA), polivinilpirrolidona, trealose, frutose, sacarose e glicose. (17)(18).

O reagente DMSO é um composto incolor e inodoro com capacidade de absorção de umidade, usado na indústria como solvente. É o crioprotetor mais utilizado devido a sua propriedade coligativa com moléculas de água livres, diminuindo a temperatura do ponto de congelamento (2).

O hidroxietilamido (HEA), usado também como expansor da volemia e como agente sedimentante de eritrócitos, é uma macromolécula (há apresentações comerciais com diferentes pesos moleculares) que tem reduzido efeito osmótico para o seu peso molecular e que não se difunde para o interior das células, sendo por isso denominado de crioprotetor não-penetrante. (7).

Os mecanismos crioprotetores do HEA não são plenamente conhecidos, mas envolveria o favorecimento da vitrificação do espaço extracelular e, por isso, em associação com um crioprotetor penetrante, reduziria a intensidade das lesões provocadas pela desidratação celular, e formaria uma camada em torno das células, o que as protegeria da lesão mecânica pelos cristais de gelo formados no espaço extracelular. Stiff et al.(19) conseguiram bons resultados com a associação de DMSO a 5% com HEA a 6% (19)

Imaizumi et al. (20) padronizaram uma solução de criopreservação composta por hidroxietilamido (HES) e DMSO em salina, com 5% de Etilenoglicol (EG) a qual apresentou recuperação celular pós descongelamento superior a 80%, quando comparada com recuperação de 20% das formulações existentes no mercado. No entanto ainda não se conhece o mecanismo de ação do EG na atenuação dos efeitos deletérios do DMSO sobre as CTH (2)(20).

Em alguns estudos o EG foi utilizado junto ao DMSO com o intuito de atenuar o choque osmótico causado pelo DMSO, contribuindo para a melhor recuperação da célula e prevenindo a apoptose.(20)

Balci e Can (21) apresentaram a utilização de agentes crioprotetores não penetrantes, como os açúcares trealose e sacarose, por estarem relacionados com baixa toxicidade quando comparados ao DMSO. O mecanismo proposto para a ação desses dissacarídeos é baseado na capacidade dessas substâncias fornecerem uma maior proteção para a membrana celular devido à interação com os grupos de fosfolipídios da membrana celular. Os autores relataram que as soluções com concentração padrão de DMSO (10%) podem apresentar redução dos efeitos tóxicos se estiverem na presença de 0,1M de sacarose (21).

Estudos demonstraram que a trealose quando adicionada às soluções de criopreservação diminuem o tamanho dos cristais de gelo, atenuando os danos físicos causados pelo gelo intracelular (2).

Segundo Fischer (1) as células tronco têm sido congeladas com eficácia utilizando três diferentes protocolos. No primeiro, as células tronco foram congeladas com DMSO 10%, HES e albumina ou plasma humano a uma taxa de congelamento ideal de 1°C/min. mantidas freezers de congelamento controlado e estocados em nitrogênio líquido; no segundo as células tronco foram congeladas com DMSO 10% e HES ou plasma humano seguido de congelamento em freezer mecânico -80°C,

por um dia, e após estocados em nitrogênio líquido; o terceiro utilizou o DMSO 10% com HES 6% diluídos em uma solução eletrolítica com albumina 1% e congelados em freezer mecânico a -80°C (1). Apesar desses três métodos inicialmente propostos, não existe, na literatura, um método padrão e, em decorrência disso, em diferentes centros do mundo, existem inúmeros protocolos de criopreservação. Ele concluiu em seu estudo que mesmo em concentrações celulares relativamente altas parece possível obter viabilidades aceitáveis, com perdas mínimas, mesmo sem adição de outros agentes crioprotetores, como HES e albumina humana (1).

Martinetti et al. (17), utilizaram como crioprotetor a Trealose, um dissacarídeo não tóxico de glicose que preserva a integridade estrutural das células durante o congelamento e descongelamento. (17). O estudo foi realizado, *in vitro*, apenas para criopreservação de CTH não mobilizadas, tendo como finalidade de pesquisa para identificar de um protocolo mais eficiente evitando a perda de células que ocorre durante o curso normal de criopreservação. As células CD34^{+} foram criopreservadas por um período curto de 20 dias e um outro longo, três meses, com um meio contendo diferentes combinações de catalase, Me_2SO e trealose. O estudo mostrou que o número e a viabilidade das células CD34^{+} foram maiores em todas as amostras criopreservadas com apenas 1 mL de trealose, quando comparadas com as soluções que combinavam um antioxidante (catalase) ou Me_2SO .

Um dos problemas encontrados nos protocolos de criopreservação com uso de DMSO está associado aos sérios efeitos colaterais no receptor, após o descongelamento e lavagem, como mostrou Windrum et al. (22) em estudo realizado em 97 centros de transplante. Um total de 38 centros reportaram casos prováveis ou possíveis de toxicidade cardiovascular relacionada ao DMSO, enquanto 27 mostraram problemas respiratórios, 12 toxicidade no SNC, 11 alterações renais e outros 13, disfunção hepática e anafilaxia (22).

Segundo Shu et al. (23) os mecanismos biológicos que causam as reações após a infusão do produto criopreservado são complexos e ainda não completamente compreendidos. Os fatores prováveis incluem o impacto direto do DMSO, a agregação celular, os resíduos de células mortas pós o descongelamento, a lise dos eritrócitos, a concentração total das células nucleadas, o volume da suspensão celular, as baixas temperaturas dos produtos, os desequilíbrios eletrolíticos e as medicações administradas antes das infusões,

além de fatores específicos do paciente como a idade, o peso, a doença, o sexo, os tratamentos anteriores realizados e quimioterapia (23).

Na última década, vários métodos para a remoção do DMSO foram desenvolvidos. Entretanto, não há consenso em relação à metodologia a ser empregada considerando a rapidez, a segurança, a simplicidade, a automatização ou não, a eficiência e o baixo custo que cause mínimos danos e perdas celulares (23).

Shu et al. (23) em artigo de revisão, apresentaram vários estudos com o uso de DMSO com concentrações mais baixas ou crioprotetores alternativos. A simples redução da concentração de DMSO diminuiu a toxicidade, melhorou a recuperação da CTH após a criopreservação e o descongelamento e a cinética da pega do enxerto. Portanto, outros crioprotetores, como hidroxietilamido ou trealose, são recomendados para serem combinados com DMSO em baixa concentração (23).

A perda celular é outro aspecto importante que se deve levar em consideração durante o processo de criopreservação. Vários fatores podem influenciar a perda celular, entre eles, podemos destacar a centrifugação, as condições de armazenamento, o descongelamento e a destruição dos granulócitos. Os granulócitos são componentes importantes das células nucleadas totais, que podem não resistir ao congelamento e descongelamento, liberando várias citocinas que podem influenciar na velocidade de enxertia após o TCTH (24). Os granulócitos têm menor tolerância osmótica e se decompõem durante o processo de descongelamento e são a principal causa de perda de viabilidade celular entre as células nucleadas totais do produto de leucaférese pós-descongelamento (24).

O controle de qualidade das amostras processadas deve seguir os requisitos da agência reguladora local. Recentemente, um Fórum Internacional solicitou a vários centros no mundo a metodologia empregada no controle de qualidade pós-descongelamento. Concluiu-se que há uma grande variação entre os centros no que diz respeito ao controle de qualidade pós-descongelamento. Muitos realizam a contagem total de células no hemocitômetro, a contagem de células CD34⁺ e a sua viabilidade, bem como testes clonogênicos, estes não realizados universalmente. Além disso, os testes de viabilidade não são bem padronizados.

Dependendo da técnica e do reagente de lise utilizado, diferentes resultados podem ser obtidos (24).

No Brasil, recomenda-se a quantificação de células nucleadas totais e as células CD34⁺, e sua viabilidade, logo após a coleta. Entretanto a necessidade de repetir essa avaliação pós-descongelamento não é obrigatória (24)

Para a Garantia da Qualidade, a RDC No 214, de 07 de Fevereiro de 2018 (13) no Art.19 recomenda que o laboratório de processamento de CTH de medula óssea (MO) e sangue periférico (SP) devem implantar e implementar um sistema de garantia da qualidade de seus processos, o qual deverá incluir:

- I - equipe técnica e os recursos necessários para o desempenho de suas atribuições;
- II - proteção das informações confidenciais;
- III- supervisão do pessoal técnico por profissional de nível superior legalmente habilitado durante todo o período de funcionamento do serviço;
- IV - equipamentos, instrumentos, materiais, reagentes e produtos para diagnóstico de uso in vitro utilizados, bem como sua qualificação e verificação antes de serem colocados em uso;
- V - utilização de técnicas conforme recomendações do fabricante (equipamentos e produtos) ou, quando couber, conforme validação realizada pelo serviço;
- VI - realização de procedimentos com base em protocolos definidos e, quando couber, validados;
- VII - procedimentos para detecção, registro, correção e prevenção de erros e não conformidades, incluindo a realização de controle de qualidade interno do laboratório e controle de qualidade da unidade de CTH; e
- VIII- rastreabilidade de todos os seus processos.

O controle de qualidade dos produtos depende das características do serviço que os processa, das características e origem dos produtos. Em geral, deve-se medir o volume do produto (mL), seu conteúdo de células nucleadas e de CTH (em geral, definido pela contagem de células CD34⁺). Também é importante realizar testes de esterilidade, mesmo que a unidade venha a ser infundida antes da obtenção de seu resultado, como costuma ocorrer com o TCTH com enxerto a fresco, em geral feito no mesmo dia da coleta. Ensaios clonogênicos também podem ser realizados com o objetivo de avaliar a capacidade funcional das CTH, entretanto,

estes testes são demorados (podem requerer várias semanas de incubação), trabalhosos e até certo ponto subjetivos, e por isso, devem idealmente ser feitos sempre no mesmo laboratório e de preferência pelas mesmas pessoas.(7).

A realização de testes para avaliar a viabilidade das células pode ser feita pelo método de citometria de fluxo, ou teste de exclusão de corante, como o azul de Tripan. Este último mais barato e de rápida aplicação, mas sendo a sua principal desvantagem a impossibilidade de diferenciar as células mononucleares, o que impede a definição exata do número de células viáveis. A avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo oferece a possibilidade de avaliar especificamente a célula de interesse. As desvantagens deste método são decorrentes de seus custos mais elevados e da necessidade de dispor de pessoal altamente treinado(7).

4. METODOLOGIA

A metodologia empregada foi uma revisão sistemática da literatura considerando-se os métodos existentes em relação à criopreservação das células tronco. O manual técnico operacional inclui as descrições do recebimento, processamento, congelamento e do controle de qualidade das células tronco hematopoiéticas (CTH).

Para tanto, foi realizado um levantamento bibliográfico nos últimos dez anos. Para a revisão da literatura foram utilizadas as bases de dados como: Scielo, Lilacs, Pub Med, BVS-Bireme e com as palavras chaves Hematopoietic stem cells; autologous hematopoietic stem cell transplantation; cryopreservation.

Foram incluídos os seguintes itens na elaboração do manual técnico operacional, conforme RDC nº 214 de 07 de Fevereiro de 2018(13)

1. Descrição das instalações físicas, recursos humanos, equipamentos e instrumentos, materiais, reagentes e produtos para diagnóstico de uso in vitro, bem como metodologias, necessários às atividades desenvolvidas.

- Artigo 85: A infraestrutura física do Centro de Processamento Celular deve ser constituída por ambientes dispostos de forma a comportar a circulação de profissionais, materiais, reagentes, produtos para diagnóstico in vitro, material biológico e resíduos, permitindo a sua limpeza e manutenção, de modo a evitar cruzamento de fluxos que possa resultar em majoração de risco de ocorrência de não conformidades.

- Artigo 87: A infraestrutura física do Centro de Processamento Celular deve ser constituída, no mínimo, por ambientes para a realização das atividades:

- ✓ I administrativas;
- ✓ II de recepção de material biológico;
- ✓ V de controle de qualidade

2. Descrição do procedimento de processamento das CTH de MO e para o uso em TCTH, incluindo coleta, processamento, acondicionamento, criopreservação, armazenamento, os testes de triagem laboratorial do doador/paciente e demais testes de controle de qualidade e segurança, descarte, liberação para uso e transporte.

3. Identificação da equipe administrativa, técnico-científica, representante legal e responsável técnico do serviço. Todos treinados e qualificados para funções que irão exercer.

- Art. 81: O Responsável Técnico deve ser profissional de nível superior da área da saúde, que possua experiência prática de pelo menos 2 (dois) anos em Centro de Processamento Celular. Parágrafo único. O Centro de Processamento Celular deve designar um Responsável Técnico substituto que atenda às mesmas exigências previstas para o titular.

- Para Centros de Transplante e Processamento Celular o responsável técnico e responsável técnico substituto ficará a cargo de um Médico.

4. Definição e validação das condições de temperatura dos materiais biológicos e amostras biológicas durante o transporte e também as caixas a serem utilizadas de forma a preservar a integridade e a estabilidade do material transportado.

- Conforme a RDC 214 de 07/02/2018 (13) as unidades de MO, SP coletadas devem ser transportadas até o Centro de Processamento Celular com mecanismo de registro da temperatura interna do recipiente de transporte no momento do seu envio, o registro da temperatura de saída deve ser avaliado e arquivado junto com o registro da temperatura de chegada em temperatura entre 2°C (dois graus Celsius) e 24°C (vinte e quatro graus Celsius) positivos, em embalagem com componente isotérmico.

- O prazo entre o término da coleta e o início do processamento ou da infusão a fresco da unidade de células progenitoras hematopoéticas (CPH), para

transplante convencional, não deve exceder 48 (quarenta e oito) horas, o tempo de transporte dessas unidades deve respeitar tal limite de tempo.

- Amostras fora do padrão de temperatura e tempo de transporte, fazer formulários de não conformidade, comunicar o médico do paciente sobre os riscos, e este, deve confirmar se segue ou não o processamento.

Isenção do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa:

Por ser uma revisão de literatura não foi necessário submissão ao comitê de ética em pesquisa da FCM da Unicamp. A pesquisa desenvolvida não utilizou experimento com seres humanos, animais e/ou patrimônio gênico e conhecimento tradicional associado.

5. RESULTADOS

Este manual técnico operacional foi elaborado para a criopreservação de CTH do SP ou MO utilizando a metodologia de criopreservação com sistema automatizado de congelamento, freezer mecânico -80°C, nitrogênio líquido e ou vapor e crioprotetores DMSO e HES.

O conjunto de ações adotadas no manual teve como objetivo garantir a manutenção da qualidade das células tronco hematopoiéticas para o uso terapêutico. Para tanto, o manual contemplou os seguintes aspectos:

- Equipe: Treinada, qualificada e capacitada para desempenho de suas atribuições.
- Auditorias internas periódicas para verificar conformidade com as normas aplicáveis, com identificação, registro, investigação e a execução de ações corretivas e preventivas.
- Sistema: informatizado que garanta a rastreabilidade de todo processo desde o recebimento, processamento, armazenamento, utilização e descarte.
- Backup automático em nuvem e na sede de informática que não seja no próprio laboratório, servidor com *nobreak*.
- Sistema de proteção das informações confidenciais, protegido com senhas e segurança para *hacker*.
- Equipamentos: Manutenção preventiva e corretiva dos equipamentos trimestrais ou conforme orientação do fabricante. Realização de todos os controles necessários relativos aos processos críticos

- Sistema emergencial de energia elétrica: gerador com tempo de entrada automática em segundos.

- *Nobreak* em computadores e equipamentos.

- Validação e qualificação antes de liberá-los para uso na rotina.

- Instrumentos, materiais e reagentes: qualificação e verificação antes de serem colocados em uso, seguir orientações do fabricante.

- Manter registros da origem, validade e número do lote de todos os materiais, reagentes e produtos para diagnóstico de uso in vitro utilizados, a fim de garantir a rastreabilidade.

- Rastreabilidade de todo processo de manutenção de equipamentos e controle de qualidade de reagentes e insumos, com registros:

- Queixas técnicas dos equipamentos, instrumentos, materiais, reagentes e produtos.

- Eventos adversos associados à coleta, processamento, criopreservação, testes de triagem laboratorial do doador/paciente, armazenamento, controle de qualidade, registros, transporte e liberação das unidades de CTH.

- Reações adversas associadas à coleta de unidades de CTH e a sua utilização em transplante, devem ser notificados NOTIVISA.

- Registros das ações implementadas.

- POPs aprovados e vigentes. Escritos em linguagem clara e inequívoca;

- Controle de qualidade interno do laboratório e controle de qualidade externo: dos controles de qualidade realizados, inclusive dos controles em processo, devem abranger:

- I lista de parâmetros e processos a serem analisados;

- II forma de controle e frequência dos testes;

- III especificações de amostragem, quando couber;

- IV limites e critérios de aceitabilidade para os resultados das análises;

- V avaliação e registro dos resultados das análises

- Prevenção e correção de não conformidades: atas de reuniões, treinamentos, interação setorial com medidas adotadas.

- Resultados do controle de qualidade

A SEGUIR MANUAL TÉCNICO OPERACIONAL

5.1 Objetivo

Promover o processamento adequado para posterior congelamento das CTH visando obter maior número possível de células e garantindo sua viabilidade.

5.2 Aplicação

CTH provenientes de sangue periférico e medula óssea para uso autólogo e alogênico.

5.3 Responsabilidades

Médico, Biomédico, Biólogo e Farmacêutico

Técnicos de Laboratório

Estagiários

5.4 Amostras

a) Sangue periférico de pacientes mobilizados, para contagem de CD34+ por citometria de fluxo

- Colhidos em tubo com EDTA de 2 ou 4 mL, mantidos em temperatura ambiente.

b) Bolsas de CTH do SP e CTH da MO: proveniente de sangue periférico coletado em equipamento de aférese e medula óssea coletado em centro cirúrgico por punção de cristas ilíacas posteriores. Para TCTH autólogas e alogênicas.

- Mantidas em geladeira de 2-6°C até o momento da criopreservação

Ao recebimento as amostras serão cadastradas em sistema informatizado e vinculado ao processamento com registros da origem, validade e número do lote de todos os materiais, reagentes e produtos para diagnóstico de uso in vitro, a fim de garantir a rastreabilidade.

- Serão respeitadas as recomendações de uso do fabricante, condições de preservação, armazenamento e os prazos de validade. Não será permitida a sua revalidação depois de expirada a validade.

- Os materiais e reagentes deverão ser estéreis, apirogênicos e descartáveis. Regularizados junto à ANVISA.

5.5 Equipamentos

- ✓ Capela de fluxo laminar com UV

- ✓ Analisador Hematológico

- ✓ Microscópio
- ✓ Agitador orbital
- ✓ Conector Estéril
- ✓ Seladora
- ✓ Centrifuga refrigerada
- ✓ Congelador programável
- ✓ Citometro de Fluxo
- ✓ Refrigerador 4°C
- ✓ Ultra Freezer -80°C
- ✓ Freezer criogênico -150°C
- ✓ Tanques nitrogênio -196°C
- ✓ Microcomputador e impressora

• Sala de criopreservação e/ou armazenamento em nitrogênio líquido: necessário sistema de exaustão mecânica para diluição dos resíduos de nitrogênio e sensor do nível de oxigênio ambiental com alarmes sonoro e visual, interno e externo.

5.5.1 Instrumentos

- ✓ Equipamentos de proteção individual (EPI)
- ✓ Racks
- ✓ Pipetas automáticas
- ✓ Canister
- ✓ Seringa descartável de 5, 10, 20 e 60 mL
- ✓ Plug adaptador macho para bolsa de sangue
- ✓ Bolsa para criopreservação
- ✓ Envelope Protetor (overwrap)
- ✓ Bolsa pra transferência
- ✓ Gelox
- ✓ Pinças
- ✓ Extrator de bolsas

5.5.2 Reagentes

- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO)
- ✓ Voluven 6% ou HES

- ✓ Solução de fluidos isotônica (hidroxietilamido + cloreto de sódio)
- ✓ Frasco para Hemocultura
- ✓ Álcool 70%

5.6. Procedimento

5.6.1. Coleta das amostras de CTH SP e MO

A coleta das amostras laboratoriais e ou das bolsas contendo as CTH deverá ser executada de forma a evitar riscos de contaminação microbiana e troca de amostras.

Não deverão ser aceitas se a identificação estiver incompleta e sem o formulário de solicitação preenchido e assinado pelo médico. Deverá ser devolvida para devidas providências.

O exame só será realizado mediante a solicitação médica.

Deverão ser adotadas ações preventivas e corretivas para não acontecer transporte de amostras sem as devidas documentações e identificações. As não conformidades e medidas adotadas deverão ser documentadas.

5.6.2. Recebimento das amostras

Durante o recebimento das amostras de CTH SP ou MO o profissional deverá conferir o preenchimento do formulário (Apêndice 1), assinar o recebimento na solicitação, data e horário.

Deverá constar na solicitação médica encaminhada ao laboratório:

- Nome completo do paciente/doador;
- Data de nascimento, nome da mãe (para segurança do paciente/doador);
- Peso e altura;
- Volume coletado;
- Volume e tipo de anticoagulante utilizado;
- Sorologia e tipagem sanguínea (paciente/doador);
- Contagem pré-coleta de células mononucleares e/ou CD34+ da amostra periférica.
- Assinatura e número do conselho do médico

- A amostra será cadastrada no sistema, que irá gerar etiquetas com código de barras referente ao número do processamento e dados do paciente.

✓ Utilizá-las para identificar os tubos, bolsas, formulário de solicitação, formulário de processamento, culturas, canister. Todos os documentos referentes ao processamento deverão possuir a mesma identificação para assegurar a rastreabilidade.

- A bolsa será encaminhada à capela de fluxo laminar que deverá já estar limpa e esterilizada.

✓ Ligar o fluxo laminar, limpar com álcool 70% e ligar o UV por 30 minutos antes da manipulação da amostra.

- Homogeneizar bem e, pela bolsa integrada para coleta de amostra, retirar o volume de 2 mL :

✓ 1 mL para hemograma

✓ 1 mL para citometria de fluxo

- Caso a bolsa coletada não possua este dispositivo, conectar um acoplador à bolsa para retirada das amostras.

Encaminhar amostras aos respectivos laboratórios.

5.6.3. Dados necessários para cadastro

Para cadastro do doador/paciente é necessário informações pessoais que devem estar preenchidas no Formulário (Apêndice 1).

- Nome Completo;
- Endereço, nº, complemento;
- Bairro;
- CEP;
- Município de Residência;
- Data de nascimento;
- Raça;
- Nacionalidade;
- Doença ou CID;
- Nº de telefone de contato.

5.6.4 Inspeção da amostra

Será realizada inspeção visual da amostra no recebimento:

- Devidamente identificada;
- Presença de coágulos;

- Danos à bolsa de coleta;
- Controle de temperatura durante transporte.
- Estas informações deverão ser anotadas no formulário de processamento.
- Em casos de amostras não coaguladas e se coágulo pequeno que não atrapalhe a concentração das células, realizar o exame. Em casos de completamente coagulada, o médico será avisado para providenciar nova coleta.

5.7.Preparo para processamento

- 1.Coletas em bolsas não padronizadas, transferir o volume para uma bolsa de transferência de 600 mL em capela de fluxo laminar.
2. Balancear a centrífuga utilizando bolsas de transferência com água. Pesar as caçapas antes de colocar na centrífuga.
3. Centrifugar por 20 minutos a 3000 RPM, em temperatura 5°C.
- 4.A bolsa será retirada da centrífuga e encaminhada para o fluxo laminar, colocada no extrator de plasma.
5. Uma nova bolsa de transferência será adaptada para a retirada do plasma, interromper a extração antes da extração do buffy-coat. A bolsa será selada.
- 6.Retirar 6 mL da bolsa de plasma para hemocultura. O material será enviado ao laboratório de microbiologia com as etiquetas de identificação.
- 7.Com auxílio de uma seringa de 60 mL, o volume do produto será verificado e transferido para as bolsas de congelamento. O volume final não poderá exceder 100 mL por bolsa.
8. As bolsas serão identificadas com etiquetas de código de barras
9. O buffy-coat será colocado no agitador orbital para preparo da solução criopreservante.
 - Deverá ser ligado o congelador programado, aguardar em torno de 20min para atingir temperatura 20-40°C negativos para recebimento das bolsas.
10. Preparo da solução criopreservante:
 - Será utilizado 7% de DMSO, Voluven ou HES e plasma autólogo.
 - Será realizada uma contagem celular (citometria de fluxo).Com o volume da bolsa será calculado o DMSO, Voluven ou HES e plasma a serem adicionados em mL:

➤ Contagem total de leucócitos do CTH fresco x volume da bolsa coleta/250000= Volume Final (VF)

➤ $VF \times 7/100 = \text{DMSO mL}$

➤ Volume CTH pós processamento +DMSO mL - VF= volume de Voluven ou HES + Plasma mL

11.A solução crioprotetora será colocada na geladeira por no mínimo 10 minutos antes de adicionar ao buffy-coat.

12.A bolsa do buffy-coat será colocada entre dois gelox para então a administração da solução criopreservante previamente preparada item 10 e 11.

- Todos os resultados: hemograma, $CD34^+$ viabilidade e quantidade e controle de qualidade, deverão ser anotados no formulário de processamento juntamente com os dados do congelamento.

13. Após adição do criopreservante, retirar 5 mL da amostra:

✓ 2 mL para hemocultura,

✓ 2 mL para *ependorf* que será congelado para controle de qualidade

✓ 1 mL para o hemograma pós processamento.

14. O volume final da amostra a ser criopreservada será aproximadamente o dobro do volume do “buffy-coat”, devido adição de criopreservantes.

5.8. Controle de Qualidade do processamento

- Contagem total de células nucleadas

✓ $\text{CN} = \frac{\text{n}^\circ \text{leucócitos/mL} \times 1.000 \times \text{volume bolsa(mL)}}{\text{peso do paciente (kg)}} = ? \times 10^8 / \text{kg}$

- Quantificação de células CD34 positivas,

✓ Para quantificar as células CD34 na bolsa e pelo peso do receptor:

$\frac{\text{Células CD34/mL} \times 1.000 \times \text{volume da bolsa coleta(mL)}}{\text{peso do receptor (kg)}} = \text{células CD34} \times 10^6 / \text{kg}$

- Testes de viabilidade por citometria de fluxo das células CD34 positivas antes e depois do congelamento.

- Análise microbiológica para fungos e bactérias aeróbias e anaeróbias.

- Controle diário do nível de nitrogênio dos tanques e temperatura dos refrigeradores

5.9. Congelamento e Armazenamento:

1. Antes de administrar a solução criopreservante na bolsa:

- Deverão estar identificadas a bolsa criogênica e o canister (protetor metálico).

- Deverão ser utilizadas etiquetas apropriadas para baixas temperaturas.

➤ Todos os arquivos e documentos referentes a este processamento/paciente deverão possuir o mesmo número de identificação e etiquetas.

2. Escrever manualmente no protetor metálico, com caneta apropriada para baixas temperaturas: nome completo, número de bolsa (gerada pelo sistema), data de coleta, volume e quantidade de bolsas (pela produção: 1,2,3...).

3. A solução crioprotetora será transferida lentamente para a bolsa de congelamento com o CTH SP ou MO, sob constante homogeneização manual.

4. O ar será retirado, a bolsa homogeneizada e selada abaixo do sítio de injeção. O segmento restante deverá ser selado rente a bolsa:

- ✓ Deverá ser congelado junto com a bolsa, no canister, devidamente identificado com etiqueta, a mesma utilizada na bolsa;

- ✓ Este segmento será utilizado para controle de qualidade (viabilidade celular) quando a bolsa for solicitada para transplante.

5. A bolsa será colocada em um envelope plástico para proteção e selada com auxílio de seladora de sacos plásticos, este procedimento será realizado antes de colocar a bolsa no canister.

Se congelamento nitrogênio (150°C negativos):

6. As bolsas deverão ser levadas para o congelador programável, colocar o canister contendo a bolsa dentro da congeladora, colocar o sensor, selecionar o programa previamente instalado.

Congeladas a uma taxa de 1–2°C/min. até um ponto de temperatura de aproximadamente –40 ° C. Então, o processo de congelamento até um alvo de -120°C é realizado em um ritmo mais rápido, cerca de 3–5°C/min.

Após o término o gráfico de congelamento será analisado e os dados serão arquivados no sistema e na pasta do respectivo doador/paciente.

7. O canister será removido da congeladora e armazenado no container de nitrogênio, separado, aguardando a liberação pelo controle de qualidade e sorologias para depois ser transferido para outro tanque onde ficará até o uso.

Se congelamento refrigeradores mecânicos (80°C negativos):

8. O canister contendo a bolsa será colocado em freezer -80°C, até o congelamento. Mantido separada até a liberação do controle de qualidade.

Após liberação da qualidade, a bolsa será retirada do canister, envolvida em *overwrap* estéril e mantida em refrigeração constante de -80°C.

9. Enquanto se aguarda a liberação dos resultados laboratoriais, a bolsa ficará em container de nitrogênio ou em freezer -80°C, reservados, aguardando liberação da qualidade. Deverão ser anotados no processamento o número de raque onde está armazenada.

10. Duas alíquotas representativas de cada unidade de CTH, serão criopreservadas e armazenadas em segmento contínuo à bolsa de criopreservação, conjuntamente e sob as mesmas condições da unidade de CTH correspondente, disponíveis para os testes que antecedem o uso da mesma.

5.10. Recomendações

- O resultado final será enviado ao médico do paciente em formulário próprio após liberação dos resultados do controle de qualidade e processamento.

- O médico solicitante deve ser informado caso o número de CD34⁺ da coleta de SP seja diferente do alvo estabelecido pelo serviço.

- Para congelamento a bolsa não deve exceder a concentração de 2×10^6 /kg de células CD34 positivas, concentração celular acima deverão ser diluídas. Os volumes acima de 100 mL deverão ser fracionados para congelamento.

- Em caso de algum tipo de problema mecânico no tanque de nitrogênio ou freezer 80°C negativos, o material será transferido, o mais rápido possível, em caixa com gelo seco, para outro tanque de nitrogênio ou freezer.

5.11. Registros da qualidade e rastreabilidade

- Solicitação devidamente preenchida e assinada;

- Planilhas de recebimento:

- ✓ Cadastramento e rastreabilidade de exames.

- ✓ Rastreabilidade de procedimentos.

- ✓ Rastreabilidade de coleta de medula óssea ou por aférese.
- Planilha de controle:
- ✓ Comprovante de entrega de células progenitoras hematopoiéticas.
- Laudo com todos os resultados da coleta: entregue em papel timbrado e assinado pelo profissional responsável pelo processamento
- Documentação das coletas:
- ✓ Pastas individuais com todas as coletas e resultados: contagem de CD34⁺, gráfico de congelamento controlado, laudo de microbiologia, laudo sorológico. Nesta pasta deverá ser utilizada a mesma etiqueta cadastral.
- ✓ Toda documentação referente ao processamento deve ser arquivado por 20 anos.

5.12.Sorologia

- As alíquotas para a realização de testes laboratoriais deverão ser acondicionadas em caixas térmicas para transporte, identificadas com etiquetas (código de barras) e armazenadas em temperaturas 2 a 8°C controladas. Deverá ser acompanhada pelas respectivas solicitações. Deve acompanhar solicitação de quais exames devem ser realizados na amostra.
- As unidades de CTH com testes microbiológicos positivos ou com resultado reagente em pelo menos um dos marcadores para infecções transmissíveis pelo sangue deverão ser armazenadas em congelador ou tanque específico, separado das demais unidades com testes negativos.
- Conforme o art. 113 da RDC nº214 de 07/02/2018 (13), as sorologias deverão ser realizadas em amostras autólogas 30 dias antes da coleta, e serão válidas por todo o período de armazenamento. Deverão ser realizadas as seguintes sorologias:
 - 1) para HCV: a) detecção de anticorpo anti-HCV ou detecção combinada de anticorpo + antígeno do HCV; e b) detecção de ácido nucleico (NAT) do HCV.
 - 2) para HBV: a) detecção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBV) (HBsAg); b) detecção de anticorpo contra o capsídeo do HBV anti- HBc com pesquisa de IgG ou IgG + IgM; e c) detecção de ácido nucleico (NAT) do HBV.
 - 3) para HIV: a) detecção de anticorpos anti-HIV ou detecção combinada de anticorpos contra o HIV + antígeno p24; e b) detecção de ácido nucleico (NAT) do HIV.

- 4) HTLV I e II: 1 (um) teste para detecção de anticorpo anti-HTLV I/II.
- 5) doença de Chagas: 1 (um) teste para detecção do anticorpo anti-Tcruzi.
- 6) sífilis: 1 (um) teste para detecção do anticorpo antitreponêmico ou não-treponêmico.

Parágrafo único. Testes adicionais devem ser executados, conforme necessário, para avaliar a possibilidade de transmissão de outras doenças infecciosas e não infecciosas, como doenças hereditárias.

5.13. Liberação e distribuição para uso

- Serão fornecidos ao médico assistente do paciente os valores das contagens celulares e da viabilidade celular, os resultados sorológicos e microbiológicos e intercorrências no processo e armazenamento.

- A solicitação para utilização em transplante deverá ocorrer mediante documento de requisição com nome legível, assinatura e CRM de um dos médicos da equipe responsável pelo paciente.

- ✓ Deverá ser solicitado com 07 dias de antecedência ao transplante, para localização da bolsa e controle de qualidade pré infusão

5.14. Transporte

1. Na coleta: O acondicionamento e o transporte do local de coleta até o laboratório ocorrerá em caixa rígida, com termômetro para controle de temperatura com a máxima e mínima, mantido a temperatura de transporte de 2°C a 24°C. Deverá ser acompanhado de documento de solicitação assinada pelo médico do paciente com as seguintes orientações:

- I - identificação das instituições remetente e destinatária, contendo nome, endereço e telefone;

- II - data e hora do acondicionamento;

- III - identificação do responsável pelo transporte;

- IV - no caso de doação autóloga, informação, "Apenas para uso autólogo";

- V - advertência: "MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO PARA TRANSPLANTE. NÃO SUBMETER À IRRADIAÇÃO (RAIO X)"; e

- VI - sinalização específica para a embalagem que contenha gelo seco, nitrogênio líquido, líquido criogênico, gás não inflamável ou outro material de conservação e preservação que ofereça riscos durante o processo de transporte, de

acordo com as normas nacionais e internacionais para transporte de produtos perigosos.

2. O transporte para o serviço de destino deverá ser acompanhado com o documento que contenha as seguintes informações:

I - Nome, endereço e telefone de contato do serviço remetente;

II - Nome, endereço e telefone de contato do serviço de destino do material biológico;

III - relação das unidades enviadas, (devidamente identificadas);

IV - Condições de conservação;

V - Data e hora do acondicionamento;

VI - Data e hora da saída;

VII - identificação do responsável pelo transporte;

VIII - código de identificação do paciente receptor, quando pertinente.

3. O material criopreservado em temperatura igual ou inferior a -135°C deverá ser acondicionado em contêiner, preferencialmente para transporte a seco (dry-shipper), que possibilite a manutenção desta temperatura durante todo o transporte.

4.-Deverá ser acondicionado em um saco plástico e envolvido em uma manta absorvente

- O volume de nitrogênio líquido deve ser suficiente para manter a temperatura de até -65°C (negativos) por um período mínimo de 24 horas além do horário esperado para a chegada do material ao serviço que realizará a infusão.

5. Controle de temperatura interna do recipiente: será monitorado durante todo o período de transporte, de modo contínuo. Usar dispositivo que possibilite a verificação de variações de temperatura fora do limite estabelecido.

6. O registro da temperatura de saída deverá acompanhar até o destino final, onde será arquivado, juntamente com o registro da temperatura de chegada.

7. Autorização concedida pela autoridade sanitária federal deverá acompanhar a CTH por todo o período do transporte interestadual (25).

Formulário de peticionamento de autorização para transporte interestadual de unidades de medula óssea, sangue periférico e sangue de cordão umbilical e placentário.

- Serviço requerente: Nome Fantasia, Razão Social E Endereço

- Responsável técnico do serviço e documentos comprobatórios;
- Estados e ou Distrito Federal dos quais receberão o material biológico:

(Relatório)

- Média estimada de volume mensal de material a ser transportado;
- Tipo de modal de transporte utilizado;
- Em casos de terceirização: dados da empresa transportadora e contrato.

8. Para a renovação da autorização para transporte interestadual de unidades de medula óssea, sangue periférico e sangue de cordão umbilical e placentário, além da documentação listada acima, o serviço deverá enviar, também, relatório de dados do transporte, do ano anterior, contendo o quantitativo de unidades transportadas, mensalmente, por tipo e por Estado e ou Distrito Federal

- O formulário específico de peticionamento de que trata o inciso, bem como os fluxos, mecanismos de envio da documentação e os prazos da análise documental, observarão os protocolos específicos definidos pela ANVISA, cujo acesso encontra-se disponível no sítio eletrônico <http://www.anvisa.gov.br> (25).

9. Temperaturas para transporte de unidades criopreservadas a -150 °C negativos ou inferior:

- Acondicionamento em temperatura igual ou inferior a -135 °C;
- Transporte em contêiner apropriado para transporte a seco (dry-shipper);
- Mantido em embalagem protetora específica;
- Volume de nitrogênio deverá ser suficiente para a manutenção da temperatura por um prazo mínimo de 48 horas além do horário estimado para sua chegada ao estabelecimento de destino.

10. No recebimento o serviço de destino deverá verificar, registrar e enviar as seguintes informações ao serviço remetente:

I - se a temperatura permaneceu dentro dos limites especificados, durante o transporte; e

II - o peso do contêiner, caso o acondicionamento tenha sido em nitrogênio líquido.

11. Registrar no cadastro das bolsas todas informações referente ao transporte

12. Todos os registros e arquivos deverão ser mantidos durante o período de armazenamento da unidade de CTH e por período mínimo de 20 anos após o descarte ou a utilização terapêutica.

5.15 Descarte

As Alíquotas deverão ser mantidas durante todo o período de armazenamento da unidade de CTH e, no mínimo, por doze meses após a sua utilização terapêutica, ou até o descarte da unidade.

Deverá ser definido em comitê o tempo para descarte, podendo ser implantado:

- ✓ Termo de consentimento junto com solicitação de processamento, já assinada em caso de não utilização autorização de descarte

- ✓ Busca ativa: contato com equipe médica solicitando autorização

O descarte deverá respeitar o PGRSS - Plano de Gerenciamento de resíduos de serviços de saúde, de acordo com as normas sanitárias e ambientais vigentes (13).

5.16 Biossegurança:

- Empresa contratada para PPRA e PCMSO: normas e condutas de segurança biológica, química, física, ocupacional e ambiental.

- Treinamentos e instruções de uso para os equipamentos de proteção individual (EPI) e de proteção coletiva (EPC);

- Em caso de acidentes seguir protocolos de atendimento e comunicar Recursos humanos

- Treinamento de manuseio e transporte de material e amostra biológica.

- A sala de criopreservação e de armazenamento deve contar com:

- Visualização externa do seu interior.

- Sistema de exaustão mecânica, para diluição dos traços residuais de nitrogênio, que promova a exaustão forçada de todo o ar da sala de criopreservação e armazenamento, com descarga para o ambiente externo do prédio.

- O ar de reposição deve ser proveniente dos ambientes vizinhos ou suprido por insuflação de ar exterior, com filtragem mínima com filtro classe G1.

- Sensor do nível de oxigênio ambiental com alarmes sonoro e visual, interno e externo.

- As grelhas de captação do sistema de exaustão mecânica devem ser instaladas próximas ao piso.

Alarmes sonoro e visual, interno e externo à sala de criopreservação e armazenamento, alertem possíveis falhas no suprimento de nitrogênio. Termômetro para monitoramento de temperatura ambiental, que indique valores máximo e mínimo.

6.DISCUSSÃO

O TCTH é um tratamento efetivo para as doenças hematológicas, não hematológicas e doenças metabólicas. Consiste na infusão de CTH, autólogas ou alogênicas, para restaurar a função da medula óssea após a realização do condicionamento, que consiste numa quimioterapia de alta dosagem. Nos transplantes autólogos, o tempo da coleta e da infusão não coincidem, geralmente é necessário o congelamento do enxerto, sendo necessário um laboratório de criopreservação que utilize técnicas adequadas para o processamento e armazenamento das CTH. O objetivo principal é a manutenção da viabilidade do produto coletado, já que estes são viáveis até setenta e duas horas em temperatura ambiente. Um desafio para a qualidade do armazenamento é o tempo entre a coleta e o início da criopreservação, motivo pelo qual é importante um laboratório processador na instituição onde ocorre a coleta de CTH e o TCTH.

O laboratório de criopreservação tem importante papel na qualidade e viabilidade das CTH, pois é o responsável pelas várias etapas da criopreservação, como protocolos de processamento, congelamento em temperaturas inferiores 80° , 150° C ou nitrogênio, cultura microbiológica, contagem celular e uso de crioprotetores, a fim de protegê-las dos danos causados pela desidratação ou geração de cristais de gelo.

Em busca de melhores soluções para as diretrizes de um laboratório, a literatura analisada apresenta sugestões de protocolos a serem utilizados para a criopreservação de CTH, como por exemplo, o uso de DMSO a 10% sob uma taxa de congelamento programado equivalente a $1-2^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, decrescendo até a temperatura de estocagem em nitrogênio. Esta técnica demanda um custo maior para a manutenção de um laboratório de criopreservação, tornando-se inviável para muitos hospitais que realizam um número de TCTH. Tal situação gerou novos

estudos com técnicas alternativas de congelamento, e com eficácia equivalente, como a utilização de congeladores mecânicos a -80°C e redução na concentração do DMSO para 7% e 5%.

Uma outra alternativa atrativa de congeladores é o freezer criogênico - 150°C que utiliza uma menor quantidade de nitrogênio em seu sistema. Este freezer tem a capacidade de manter a temperatura de armazenamento uniforme, diminui a contaminação das bolsas, restringe o fornecimento de líquidos, a evaporação de líquidos e com baixos custos operacionais.

Devido à grande discussão em relação à toxicidade do DMSO, estudos sugerem sua redução e complementação com outros crioprotetores, como o hidroxietilamido (HES), um coadjuvante extracelular, a fim de facilitar a eluição e reduzir os efeitos colaterais durante a infusão. É também uma técnica com melhor custo-benefício em relação aos investimentos a médio/longo prazo, já que serão utilizadas doses menores de DMSO.

A implantação de um laboratório de criopreservação requer um alto investimento inicial, além da necessidade de manutenção de insumos e reagentes a longo prazo, como por exemplo, o nitrogênio e o DMSO, que são, em parte, responsáveis pelo custo elevado de manutenção do laboratório. A redução da porcentagem de DMSO para 7%, adicionando outro protetor, o HES, e o congelamento em refrigeradores a -150°C , que utiliza menos nitrogênio, pode ser uma alternativa mais barata para a implantação de um laboratório de criopreservação. Outra vantagem seria a manutenção da qualidade, da viabilidade e o menor risco de contaminação do produto final oferecido ao TCTH. Já que, a diminuição do custo nunca pode comprometer a segurança do processo geral de criopreservação.

As evidências mostram que congelador programado, freezer -80°C e freezer criogênico -150°C , não apresentam diferença significativa em relação à manutenção da qualidade.

Para o início de um laboratório, o uso do congelamento -80°C é um método atrativo, mais simples e que consegue garantir a preservação celular, a viabilidade da célula, sem comprometer a cinética de pega e com um custo acessível ao laboratório.

Outro ponto questionável é a infusão à fresco do produto. Método sugerido por alguns grupos, com eficácia semelhante aos congelados. Entretanto, existe a limitação de não ser universal para todas as doenças, sendo restrito na maioria das vezes aos linfomas e mielomas. Um grande atrativo é a redução significativa dos custos, já que não utiliza os crioprotetores e congeladores. Não proporia esta técnica para um laboratório e serviço de TCTH em instalação, por ser ainda um procedimento em desenvolvimento.

7.CONCLUSÃO

Para maior segurança no tratamento do paciente o laboratório de criopreservação deve estabelecer critérios:

- Manter um sistema da qualidade que garanta as atividades relacionadas à assistência ao paciente/doador, como coleta, processamento, armazenamento, testagem, distribuição, administração e monitoramentos pós-administração de terapias celulares estejam em conformidade com os requisitos especificados em Legislações e protocolos.
- Fornecer treinamentos para todos os funcionários que realizem atividades que afetam a qualidade do produto, através de programas de educação continuada.
- Definir as especificações dos equipamentos antes da aquisição, qualificar todos quanto ao uso pretendido e identificá-los. Qualificação da instalação, operacional de desempenho e calibrações.
- Registrar e rastrear todos os processos: obtenção, processamento, armazenamento, distribuição ou administração do produto, condições e tempo de armazenamento, destino do produto incluindo descarte.
- Garantir avaliação e qualificação de fornecedores de materiais, produtos ou serviços.
- Validar processos através do controle de qualidade que é importante quando abrange todos os processos.
- Definir métodos de testagem e os valores e/ou limites aceitáveis para características críticas definidas para cada produto, como recuperação, viabilidade celular, esterilidade, etc.

8.REFERÊNCIAS

1. Fischer GB, Alegre P. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul Faculdade De Medicina Programa De Pós-Graduação Em Medicina: Ciências Médicas Tese De Doutorado Efeito Da Concentração E Combinação De Crioprotetores Na Viabilidade Medida Por Citometria De Fluxo Das Células Tronco Hematopoiéticas Congeladas Em Freezer Mecânico. 2014 [citado 17 de maio de 2017]; Available at: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/99168/000930588.pdf?sequence=1>
2. Silva A da, Rodrigues C, Silva M da. Avanços tecnológicos na criopreservação de células-tronco e tecidos, aplicados à terapia celular. Rev da Biol [Internet]. 2017 [citado 8 de setembro de 2017]; Available at: http://www.ib.usp.br/revista/system/files/SILVA_17_1.pdf
3. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JAW. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. Cryobiology [Internet]. outubro de 2015 [citado 8 de setembro de 2017];71(2):181–97. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224015002047>
4. Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, et al. Cryopreservation and its clinical applications. Integr Med Res [Internet]. março de 2017 [citado 16 de maio de 2017];6(1):12–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28462139>
5. Lauterboeck L, Wolkers WF, Glasmacher B. Cryobiological parameters of multipotent stromal cells obtained from different sources. Cryobiology [Internet]. fevereiro de 2017 [citado 9 de setembro de 2017];74:93–102. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224016304485>
6. Schwandt S, Liedtke S, Kogler G. The influence of temperature treatment before cryopreservation on the viability and potency of cryopreserved and thawed CD34 + and CD45 + cord blood cells. Cytotherapy [Internet]. agosto de 2017 [citado 8 de setembro de 2017];19(8):962–77. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S146532491730587X>
7. Santis GC, Prata KL. Criopreservação de células-progenitoras hematopoéticas. Med (Ribeirao Preto Online) [Internet]. 30 de março de 2009 [citado 9 de setembro de 2017];42(1):36. Available at:

<http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/203>

8. Simões BP, Pieroni F, Barros GMN, Cançado RD, Salvino MA, Angulo I, et al. Revista brasileira de hematologia e hemoterapia. [Internet]. Vol. 32, Rev. bras. hematol. hemoter. Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia; 2010 [citado 10 de setembro de 2017]. 46–53 p. Available at: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=554161&indexSearch=ID>

9. Azevedo W, Ribeiro MCC. Fontes De Células-Tronco Hematopoéticas Para Transplantes. Med (Ribeirao Preto Online) [Internet]. 30 de dezembro de 2000 [citado 10 de setembro de 2017];33(4):381. Available at: <http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/7714>

10. Vigorito AC, Souza CA de. Transplante de células-tronco hematopoéticas e a regeneração da hematopoese. Rev Bras Hematol Hemoter [Internet]. agosto de 2009 [citado 27 de abril de 2018];31(4):280–4. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000400017&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt

11. Sartor M, Antonenas V, Garvin F, Webb M, Bradstock KF. Recovery of viable CD34+ cells from cryopreserved hemopoietic progenitor cell products. Bone Marrow Transplant [Internet]. 6 de agosto de 2005 [citado 9 de setembro de 2017];36(3):199–204. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15937512>

12. Yang H, Acker J, Cabuhat M, Letcher B, Larratt L, McGann L. Association of post-thaw viable CD34 p cells and CFU-GM with time to hematopoietic engraftment. 2005 [citado 9 de setembro de 2017]; Available at: <https://www.nature.com/bmt/journal/v35/n9/pdf/1704926a.pdf>

13. Brasil. Ministério da Saúde-MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA [Internet]. [citado 19 de julho de 2019]. Available at: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3078078/\(1\)RDC_214_2018_.pdf/8acbc5cb-bca6-4725-b9de-da584e3c024a](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3078078/(1)RDC_214_2018_.pdf/8acbc5cb-bca6-4725-b9de-da584e3c024a)

14. Parkins M, Bahlis N, Brown C, Savoie L, Chaudhry A, Russell J, et al. Overnight storage of autologous stem cell apheresis products before cryopreservation does not adversely impact early or long-term engraftment following transplantation. Bone Marrow Transplant [Internet]. 2006 [citado 9 de setembro de 2017];31(1):10–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16401111>

2017];38:609–14. Available at:

<https://www.nature.com/bmt/journal/v38/n9/pdf/1705501a.pdf>

15. Sousa WB. Criopreservação de células tronco e suas aplicações. Rev Bras Ciência, Tecnol e Inovação [Internet]. 2014 [citado 16 de maio de 2017];1(1):45–56. Available at:

<http://seer.uftm.edu.br/revistaeletronica/index.php/rbcti/article/view/737/871>

16. Detry G, Calvet L, Straetmans N, Cabrespine A, Ravoet C, Bay J, et al. Impact of uncontrolled freezing and long-term storage of peripheral blood stem cells at -80°C on haematopoietic recovery after autologous transplantation. Report from two centres. Bone Marrow Transplant [Internet]. 2014 [citado 9 de setembro de 2017];49(10):780–5. Available at:

<https://www.nature.com/bmt/journal/v49/n6/pdf/bmt201453a.pdf>

17. Martinetti D, Colarossi C, Buccheri S, Denti G, Memeo L, Vicari L. Effect of trehalose on cryopreservation of pure peripheral blood stem cells. Biomed Reports [Internet]. março de 2017 [citado 17 de maio de 2017];6(3):314–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28451392>

18. Foi E, Desmartin M, Benhamida S, Xavier F, Vanneaux V, Rea D, et al. Recovery, viability and clinical toxicity of thawed and washed haematopoietic progenitor cells: analysis of 952 autologous peripheral blood stem cell transplantations. Bone Marrow Transplant [Internet]. 2007 [citado 10 de setembro de 2017];40:831–5. Available at:

<https://www.nature.com/bmt/journal/v40/n9/pdf/1705830a.pdf>

19. Stiff PJ, Koester AR, Weidner MK, Dvorak K, Fisher RI. Autologous Bone Marrow Transplantation Using Unfractionated Cells Cryopreserved in Dimethylsulfoxide and Hydroxyethyl Starch Without Controlled-Rate Freezing [Internet]. Vol. 70, Blood. [citado 5 de agosto de 2019]. Available at: www.bloodjournal.org

20. Imaizumi K, Nishishita N, Muramatsu M, Yamamoto T, Takenaka C, Kawamata S, et al. A Simple and Highly Effective Method for Slow-Freezing Human Pluripotent Stem Cells Using Dimethyl Sulfoxide, Hydroxyethyl Starch and Ethylene Glycol. Aalto-Setälä K, organizador. PLoS One [Internet]. 12 de fevereiro de 2014 [citado 9 de setembro de 2017];9(2):e88696. Available at:

<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0088696>

21. Balci D, Can A. The Assessment of Cryopreservation Conditions for Human Umbilical Cord Stroma-Derived Mesenchymal Stem Cells towards a Potential Use for Stem Cell Banking. *Curr Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2013 [citado 28 de março de 2018];8:60–72. Available at: <https://pdfs.semanticscholar.org/4bc4/300fbb5e12fd481c1789e46154d06c727b59.pdf>
22. Windrum P, Morris TCM, Drake MB, Niederwieser D, Ruutu T. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 25 de outubro de 2005 [citado 13 de março de 2018];36(7):601–3. Available at: <http://www.nature.com/articles/1705100>
23. Shu Z, Heimfeld S, Gao D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 30 de abril de 2014 [citado 2 de abril de 2018];49(4):469–76. Available at: <http://www.nature.com/articles/bmt2013152>
24. Castelhana M V, Reis-Alves SC, Vigorito AC, Rocha FF, Pereira-Cunha FG, De Souza CA, et al. Quantifying loss of CD34+ cells collected by apheresis after processing for freezing and post-thaw. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 1 de abril de 2013 [citado 5 de maio de 2018];48(2):241–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23394728>
25. BRASIL. Ministério da Saúde-MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária-Anvisa O Secretário De Atenção À Saúde E O Diretor-Presidente Da Agência Nacional De Vigilância Sanitária Do Ministério Da Saúde [Internet]. [citado 22 de julho de 2019]. Available at: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/PRTC_370_2014_.pdf/28aca220-4904-42c1-a396-c5560d7df3cc

9. APÊNDICE 1

LABORATÓRIO DE CRIOPRESERVAÇÃO			
Formulário de envio			
Prontuário:		Data atendimento:	
Nome do paciente:			
Nome da mãe:			
Data de nascimento:		RG:	Sexo: Raça:
Endereço:	N°:	Bairro:	Cidade: CEP:
Convenio:	CNS:		Telefones:
Peso:	Altura:	Patologia/CID:	Material:
Nome do Doador:			
Prontuário:			
Data da coleta:		N° coleta:	
Volume coletado:			
Anticoagulante:		Volume anticoagulante:	
Sorologias:		Tipagem sanguinea:	
WBC Pré:		CD34+ Pré:	
		Assinatura e carimbo do médico:	
Obs:			
Data Horário recebimento:		Assinatura e carimbo:	

9.1.APÊNDICE 2

Fluxograma do processo de Criopreservação

