

WALKIRIA FERREIRA SILVA

Comparação da viabilidade das células mononucleares totais da medula óssea de suínos em diferentes protocolos de congelamento

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Miglino

São Paulo

2007

RESUMO

SILVA, W.F. **Comparação da viabilidade das células mononucleares totais da medula óssea de suínos em diferentes protocolos de congelamento.** [Comparison of the viability of the mononuclear total cells of the bone marrow of pigs in different protocols of freezing]. 2007. 85f. Dissertação(Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A necessidade de tratamentos mais eficazes e menos invasivos para os pacientes, em adição à capacidade de diferenciação celular da medula óssea sugere que o transplante de células mononucleares totais poderia ser uma das melhores formas de tratamento para as diversas patologias existentes. Entretanto, vários fatores implicam sobre a viabilidade das células da medula óssea dos quais destacamos a ausência de padronização de protocolo de criopreservação que permita a manutenção da viabilidade celular, sendo altamente necessário o desenvolvimento de estudos nesta área. Deste modo, neste estudo, após a anestesia de um grupo de animais foi realizada punção da medula óssea, separação das células mononucleares e avaliação da viabilidade. Foram testados oito meios diferentes para criopreservação das células. O meio de congelamento A é composto por 20% dimetilsulfóxido (DMSO), 40% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e 40% de Plasma Autólogo, o meio de congelamento B contém 20% dimetilsulfóxido (DMSO), 40% Roswell Park Memorial Institute (RPMI) e 40% de Plasma Autólogo, o meio de congelamento C tem em sua composição 20% dimetilsulfóxido (DMSO), 40% soro fetal bovino (SFB) e 40% plasma autólogo, o meio de congelamento D é composto de 20% dimetilsulfóxido (DMSO) e 80% de plasma autólogo, o meio E constitui-se de 5% dimetilsulfóxido (DMSO), 47,5% de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e 47,5% de plasma autólogo, o meio F contém 5% dimetilsulfóxido (DMSO), 47,5% de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) e 47,5% de plasma autólogo, o meio G contém 5% dimetilsulfóxido (DMSO), 47,5% de soro fetal bovino (SFB) e 47,5% de plasma autólogo e o meio H constitui-se de 5% dimetilsulfóxido (DMSO) e 95% de plasma autólogo. Após as análises realizadas pela técnica de citometria de fluxo, o meio mais eficiente na criopreservação das células mononucleares de suínos foi o protocolo D por possuir maior concentração de plasma autólogo e crioprotetor.

Palavras-chave: Criopreservação. Células mononucleares. Suínos. DmsO. Viabilidade celular.

ABSTRACT

SILVA, W.F. **Comparison of the viability of the mononuclear total cells of the bone marrow of pigs in different protocols of freezing** [Comparação da viabilidade das células mononucleares totais da medula óssea de suínos em diferentes protocolos de congelamento]. 2007. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The necessity of the most efficient and less invasive treatments for the patients, in addition to the capacity of cellular differentiation of the bone marrow suggests that the transplant of mononuclear total cells might be one of the best forms of address for several existent pathologies. Meantime, several factors tease on whose the viability of the cells of the bone marrow we detach the absence of standardization of protocol of criopreservação what should allow the maintenance of the cellular viability, when the development of studies is highly necessary in this area. In this way, in this study, after the anaesthesia of a group of animals there was carried out punch of the bone marrow, separation of the mononuclear cells and evaluation of the viability. Eight different ways were tested for criopreservação of the cells. Eight different ways were tested for criopreservação of the cells. The way of freezing A is composed by 20 % dimetilsulfóxido (DMSO), 40 % Dulbecco's Modified Eagle's Médium (DMEM) and 40 % of Plasma Autólogo, the way of freezing B contains 20 % dimetilsulfóxido (DMSO), 40 % Memorial Roswell Park Institute (RPMI) and 40 % of Plasma Autólogo, the way of freezing C has in his composition 20 % dimetilsulfóxido (DMSO), I convert 40 % into whey fetal bovine (SFB) and 40 % it molds autólogo, the way of freezing D is the way E appoints of 5 % dimetilsulfóxido (DMSO), 47,5 % of Dulbecco's Modified Eagle's Médium (DMEM) and 47,5 % of plasma autólogo, the way F contains 5 % dimetilsulfóxido (DMSO), 47,5 % of Memorial Roswell Park Institute (RPMI) and 47,5 % of plasma autólogo, the way G contains 5 % dimetilsulfóxido (DMSO), 47,5 % of serum fetal bovine (SFB) and 47,5 % of plasma autólogo and the way H constitutes of 5 % dimetilsulfóxido (DMSO) and 95 % of plasma autólogo. composed of 20 % dimetilsulfóxido (DMSO) and 80 % of plasma autólogo, After the analyses carried out by the technique of citometria of flow, the most efficient way in the criopreservação of the mononuclear cells of pigs was the protocol D because of having bigger concentration of plasma autólogo and crioprotectant.

Key words: Criopreservation. Mononuclear cells. Pigs. DmsO. Cellular viability.

1 INTRODUÇÃO

A terapia celular é tida como uma terapia muito promissora no que diz respeito ao tratamento de diversas doenças, fundamentada principalmente na provável regeneração dos tecidos lesados promovida pelas células transplantadas. A sua importância e aplicabilidade terapêutica torna-se ainda mais evidenciável tendo-se em vista a incapacidade de proliferação de muitos tipos celulares para a reposição do tecido injuriado (HIDEMASA et al., 2003). Uma das fontes de células com provável capacidade de regeneração tecidual, no caso as células-tronco, é a medula óssea. Verificam-se dois tipos distintos de fonte celular componentes da medula óssea, sendo, 1) as células hematopoiéticas multipotentes – capazes de originar células sanguíneas (plaquetas, eritrócitos, monócitos, granulócitos e linfócitos) e 2) as células multipotentes não hematopoiéticas – capazes de originar células mesenquimais ou estromais (PROCKOP, 1997; KRAUSE, 2002). Relata-se ainda que ambas as fontes celulares sejam passíveis de obtenção sem a instituição de terapia imunossupressiva (SUSSMAN, 2001).

A quantificação do crescimento celular, incluindo proliferação e viabilidade, tem se mostrado uma ferramenta essencial em muitos laboratórios que estudam as células mononucleares totais. Muitos ensaios de viabilidade são baseados em um ou dois parâmetros, tais como atividade metabólica e integridade da membrana celular. Usualmente a atividade metabólica é mensurada em populações celulares por meio de incubação com tetrazolium. Seguindo-se o ensaio a exclusão por morte celular após-marcação com azul Tripán, diferenciando-se então as células viáveis das não viáveis (CELL, 2003).

Ainda assim, muito a que ser pesquisado quanto à possível viabilidade celular para utilização em transplantes, ou em bioengenharia de tecidos, uma vez que, é ampla a variedade de fontes celulares e, não obstante, mais amplo ainda pode ser a aplicação de técnicas de criopreservação e o período de estocagem destas células.

8 CONCLUSÕES

Baseando-se nos métodos aplicados e nos resultados obtidos podemos concluir que:

1. Para a quantificação da viabilidade das células mononucleares totais de medula óssea de suínos, o melhor método é a citometria de fluxo com o auxílio de um marcador fluorescente para o núcleo das células que irá diferenciar as vivas das células mortas com maior confiabilidade.
2. Os meios comumente usados na criopreservação (DMEM, RPMI e SFB), devem ser suplementados para fornecer nutrientes em maior quantidade e concentração.
3. O plasma autólogo pode ser usado em concentrações altas como meio de nutrição para as células sem associação com um meio heterólogo.
4. O DMSO em concentração de 5% para células mononucleares de suínos associado aos meios de cultivo não forneceu crioproteção suficiente para evitar morte celular.
5. A melhor concentração do crioprotetor DMSO para células mononucleares de suínos foi de 20%.
6. Quando colocadas em cultivo pós-congelamento, mesmo por um período curto, as células mononucleares de suínos necessitam de meios mais suplementados para se expandirem.

7. Dos protocolos testados, os mais eficientes na criopreservação foram o D seguido pelo H, já os protocolos menos eficientes foram: C, A, B, F, E, G em ordem decrescente.

REFERÊNCIAS

AIRD, W.; LABOPIN, M.; GORIN, N. C. Long-term cryopreservation of human stem cells. **Bone Marrow Transplantation**, v. 9, p.487-490, 1992.

AMOS, T.; GORDON, M. Sources of human hematopoietic stem cells for transplantation. **Cell Transplantation**, v. 4, p. 547-569, 1995.

AREMAN, E.; SACHER, R.; DEEG, H. Processing and storage of human bone marrow: A survey of current practices in North America. **Bone Marrow Transplantation**, v. 6, p.203-209, 1990.

AREMAN, E. M.; SACHER, R. A.; DEEG, H. J. Cryopreservation and storage of human bone marrow: A survey of current practices. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 9, p. 333-523, 1990.

BARNES, D. W. H.; LOUTIT, J. F. The radiation recovery factor: preservation by the polge-smith-parkes technique. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 15, p. 90, 1955.

BATESON, E. A. J.; BUSZA, A. L.; PEGG, D. E.; TAYLOR, M. J. Permeation of rabbit common carotid arteries with dimethyl-sulfoxide. **Cryobiology**, v. 31, p. 393-397 (1994).

BIDAULT, N. P.; HAMMER, B. E.; HUBEL, A. Rapid MR image of cryoprotectant permeation in an engineered dermal replacement. **Cryobiology**, v. 40, p. 13-26, 2000.

BITTENCOURT, H.; ROCHA, V. A célula-Tronco Hematopoiética e seu uso clínico. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D.T. **Células-tronco a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p. 122.

BRUDER, S. P.; JAISWAL, E.; HAYNESWORTH, E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 64, p.278-294, 1997.

CELL proliferation and viability measurement. **Biochemica**, nº 3, 2003.
Disponível em: <www.roche-applied-science.com/apoptosis>. Acesso em: 20 set. 2005.

CROW, S. E.; WALSHAW, S. O. **Manual de procedimentos clínicos em cães, gatos e coelhos**. São Paulo: Artmed, 2000. p. 279.

DAVIS, J. M.; ROWLEY, S. D.; BRAINE, H. G.; PIANTADOSI, S.; SANTOS, G. W. Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. **Blood**, v. 75, p. 781-786, 1990.

DE VRIES, E. G.; VELLENGA, E.; KLUIN-NELEMANS, J. C. The happy destiny of frozen haematopoietic stem cell: from immature stem cells to mature applications. **European journal of cancer care**, v. 40, p. 1987-1992, 2004.

DONNENBERG, A. D.; KOCH, E. K.; GRIFFIN, D. L.; STANCZAK, H. M.; KISS, J. E.; CARLOS, T. M.; BUCHBARKER, D. M.; YEAGER, A. M. Viability of cryopreserved BM progenitor cells stored for more than a decade. **Cytotherapy**, v. 4, n. 2, p. 157-163, 2002.

ELLIOT, C.; MCCARTHY, D. A Survey of methods of processing and storage of bone marrow and blood stem cells in the EBMT. **Bone Marrow Transplantation**, v. 14, p. 419-423, 1994.

ELMOAZZEN, H. Y.; ELLIOT, J. A. W.; MCGANN, L. E. Cryoprotectant equilibration in tissues. **Cryobiology**, v. 51, p. 85-91, 2005.

FATHY, G. M.; McFARLANE, D. R.; ANGELL, C. A.; MERYMAN, C. A. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v.21, n. 4, p. 407-426, 1984.

FERRARI, G.; CUSELLA-DE ANGELIS, G.; COLETTA, M. Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. **Science**. v. 279, p. 1528-30, 1998.

FLEMING, K. K.; HUBEL, A. Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 34, p. 309-315, 2006.

FONTES, A. M.; ORELLANA, M. D.; PRATA, K. L. Células-Tronco e seus Métodos de Estudo.p. 100-101. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

FULLER, B.J.; BUSZA, A.L.; PROCTOR, E. Studies on cryoprotectant equilibration in the intact rat-liver using nuclear magnetic resonance spectroscopy-a noninvasive method to assess distribution of dimethyl-sulfoxide in tissues. **Cryobiology**, v. 26, n. 2, p. 112-118, 1989.

FULLER, B. J.; BUSZA, A. L. Proton NMR-studies on the permeation of tissue fragments by dimethyl-sulfoxide – liver as a model for compact tissues. **Cryobiology**, v. 15, p. 131-134,1995.

FUKUDA, K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. **Journal of Artificial Organs**, v. 25, p. 187-193, 2001.

GALMES, A.; BESALDUCH, J.; BARGAY, J.; MATAMOROS, N.; MOREY, M.; NOVO, A.; SAMPOL, A. A simplified method for cryopreservation of hematopoietic stem cells with -08° degrees C mechanical freezer with dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant. **Leukemia & Lymphoma**, v. 17, n. 1-2, p. 181-184,1995.

GALMES, A.; BESALDUCH, J.; BARGAY, J. MATAMOROS, N.; DURAN, M. A.; MOREY, M. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl-sulfoxide at -80 degrees C without rate-controlled freezing. **Transfusion**, v. 36, p. 794-797, 1996.

GALMES, A.; BESALDUCH, J.; BARGAY, J.; MATAMOROS, N.; MOREY, M.; NOVO, A.; GUERRA, J. M. Long-term storage at -80 degrees C of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant. **Transfusion**, v. 39, p. 70-73,1999.

GALMES, A.; GUTIÉRREZ, A.; SAMPOL, A.; CANARO, M.; MOREY, M.; IGLESIAS, J.; MATAMOROS, N.; DURAN, M. A.; NOVO, A.; BEA, M. D.; GALÁN, P.; BALANSAT, J.; MARTINÉZ, J.; BARGAY, J.; BESALDUCH, J. Long-term hemtologic reconstitution and clinical evaluation of autologous peripheral blood stem cell transplantation after cryopreservation of cells with 5% and 10% dimethylsulfoxide at -80°C in a mechanical freezer. **The Hematology Journal**, v. 92, n. 7, p. 986-989, 2007.

GOODELL, M. A.; JACKSON, K. A.; MAJKA, S. M. Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 938, p. 208-220, 2001.

HAIDER, H.; ASHRAF, M. Bone marrow stem cell transplantation for cardiac repair. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, n. 67, p. 2557-2567, 2005.

HIDEMASA, O.; BRADFUTE, S. B.; GALLARDO, T. D.; NAKAMURA, T.; GAUSSIN, V.; MISHINA, Y.; POCIUS, J.; MICHAEL, L. H.; BEHRINGER, R. R.; GARRY, D. J.; ESTMAN, M. L.; SCHNEIDER, M. D. Cardiac progenitor cells

from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. **PNAS online**, v. 100, n. 21, p. 12313-12318, 2003.

HUBEL, A. Parameters of cell freezing: Implications for the cryopreservation of stem cells. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 11, n. 3, p. 224-233, 1997.

IKEHARA, S. Bone marrow transplantation: a new strategy for intractable diseases. **Drugs of today**, v. 38, p. 103-111, 2002.

ISELL, S.A. Development of a protocol for the quantitative evaluation of contrast in NMR images for cryoprotective solvents in intact tissues. **Cryobiology**, v.34, p. 165-175, 1997.

ISELL, S. A.; FYFE, C. A.; AMMONS, R. L .M.; PEARSON, B. Measurement of cryoprotective solvent penetration into intact organ tissues using high-field NMR micromaging. **Cryobiology**, v. 35, p. 165-172, 1997.

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

KAWANO, Y.; LEE, C. L.; WATANABE, T.; ABE, T.; SUZUYA, H.; OKAMOTO, Y.; MAKIMOTO, A.; NAKAGAWA, R.; WATANABE, H.; TAKAUE, Y. Cryopreservation of mobilized blood stem cells at a higher cell concentration without the use of a programad freezer. **Annals of Hematology**, v. 83, n. 1, p. 50-54, 2004.

KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow derived stem cell. **Human Gene Therapy**, v. 9, p. 754-758, 2002.

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.

LAKEY, J. R. T.; HELMS, L. M. H.; MOSER, G.; LIX, B. SLUPSKY, C. M.; REBEYKA, I. M.; SYKES, B. D.; McGANN, L. E. Dynamics of cryoprotectant permeation in porcine heart valve laflets. **Cell Transplantation**, v.12, p. 123-128, 2003.

LASKY, L. VANBUREN, N. WEISDORF, D. Successful allogeneic cryopreserved marrow transplantation. **Transfusion**, v. 29, p. 182-189, 1989.

LAW, P.; MERYMAN, H. Cryopreservation of human bone marrow grafts. In gee A. **Bone marrow processing and purging. A pratical guide.** 1 ed, Florida: CRCPress, 1991. p. 332-40.

LIU, P. I.; POON, K. C.; CROOK, L.; LIU, S. S.; EGUCHI, M. In vitro and in vivo assessment of the viability of cryopreserved postmortem murine bone marrow cells. **Annals of Clinical Laboratory Science**, v. 10, n. 2, p. 165-168, 1980.

MALOUF, N. N.; COLEMAN, W. B.; GRISHAM, J. W. Adult derived stem cells from the liver become myocytes in the heart in vivo. **The American Journal of Pathology**, v. 158, p. 1929-1935, 2001.

MASSUMOTO, C. M.; MENDRONI, A.; CARBONELL, A. L.; MOTA, M. A.; MIZUKAMI, S. Mobilização e coleta de células-tronco hematopoéticas de sangue periférico. **Revista de Hematologia e Hemoterapia**, v. 2, p. 224-227, 1996.

MASSUMOTO, C.; MIZUKAMI, S. Autologus bone marrow transplantation and postransplant immunotherapy. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 33, p. 405-414, 2000.

MUKAIDA, T.; WADA, S.; TAKAHASHI, K.; PEDRO, P. B.; AN, T. Z.; KASAI, M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. **Human Reproduction**, v. 13, n. 10, p. 2874-2879, 1998.

MULDREW, K.; SYKES, B.; SCHACHAR, N.; MCGANN, L. E. Permeation kinetics of dimethyl sulfoxide in articular cartilage. **Cryobiology**, v. 17, p. 331-340, 1996.

PARKER, L. M.; BINDER, N.; GEMAN, R.; RICHMAN, C. M.; WEINER, R. S.; YANKEE, R. A. Prolonged cryopreservation of human bone marrow. **Transplantation**, v. 31, n. 6, p. 454-457, 1981.

PETTENGELL, R.; WOLL, P. J.; CONNOR, D. A.; DEXTER, T. M.; TESTA, N. G. Viability of haemopoietic progenitors from whole blood, bone marrow and leukapheresis product: effects of storage media, temperature and time. **Bone Marrow Transplantation**, v. 14, n. 5, p. 703-709, 1994.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v. 279, p. 71-74, 1997.

RE, A.; VIAJAYARAGHAVAN, K.; BASADE, M. M.; HE, S.; GULATI, S.C. Long-term cryopreservation: successful trilineage engraftment after autologous bone

marrow transplantation with bone marrow cryopreserved for seven years. **Journal of Hematotherapy**, v. 7, n. 2, p. 185-188, 1998.

ROWLEY, S. D. **Techniques of bone marrow and stem cell cryopreservation and storage**. In American Association of Blood Banks. 1992. p. 105-127.

SCORSIN, M.; HAGEGE, A. A.; MAROTTE, F. Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium? **Circulation**, v. 96, p. 188-193, 1997.

SPURR, E. E.; WIGGINS, N. E.; MARSDEN, K. A.; LOWENTHAL, R. M.; RAGG, S. J. Cryopreserved human haematopoietic stem cells retain engraftment potential after extended (5-14 years) cryostorage. **Cryobiology**, v. 44, p. 210-217, 2002.

SPUTTEK, A.; SPUTTEK, R. Cryopreservation in transfusion medicine and hematology. In **Life in the frozen state**. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 483-504, 2004.

SPUTTEK, A. Cryopreservation of red blood cells, platelets, lymphocytes and stem cells. In **Clinical Applications of Cryobiology**. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 95-147, 1991.

STRAUER, B. E.; BREHM, M.; ZEUS, T. Myocardial regeneration after intracoronary transplantation of human autologous stem cells following acute myocardial infarction. **Dtsch Méd Wochenschr**, v. 126, n. 34-35, p. 932-938, 2001.

STRONCEK, D. F.; FAUSTSCH, S. K.; LASKY, L. C.; HURD, D. D.; RAMSAY, N. K.; McCULLOUGH, J. Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow. **Transfusion**, v. 31, p. 521-526, 1991.

SUSSMAN, M. Cardiovascular biology. Hearts and Bones. **Nature**, n. 410, p. 410:640-641, 2001.

TAYLOR, N. J.; BUSZA, A. L. A convenient, noninvasive method for measuring the kinetics of permeation of dimethyl-sulfoxide into isolated corneas using NMR-spectroscopy. **Cryobiology**, v. 13, p. 273-282, 1992.

TONER, M. Nucleation of ice crystals inside biological cells. In Steponkus, P. (Ed.). **Low-temperature biology**. London England: JAI Press, 1993. p. 1-51.

VALDEZ, C. A.; MAZNI, O. A.; TAKAHASHI, Y.; FUJIKAWA, S.; KANAGAWA, H. Successful cryopreservation of mouse blastocysts using a new vitrification solution. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, n. 2, p. 793-802, 1998.

WALCERZ, D. B.; TAYLOR, M. J.; BUSZA, A. L. Determination of the kinetics of permeation of dimethyl-sulfoxide in isolated corneas. **Cell Biophysics**, v. 26, p. 79-102, 1995.

WALTER, Z.; SZOSTEK, M.; WEGLARSKA, D.; RAGUSZEWSKA, D.; JABLONSKI, M.; LORENZ, F.; SKOTNICKI, A. B. Methodes for freezing, thawing and viability estimation of hemopoietic stem cells. **Przegl Lek**, v. 56, p. 35-39, 1999. (Suplemento, 1).

WEINER, R. S.; TOBIAS, J. S.; YANKEE, R. A. The processing of human bone marrow for cryopreservation and reinfusion. **Biomedicine**, v. 24, n. 4, p. 226-231, 1976.

ZAMBELLI, A.; POGGI, G.; DA PRADA, G.; PEDRAZZOLI, P.; CUOMO, A.; MIOTTI, D. Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion. **Anticancer Research**, v. 18, p. 4705-4708, 1998.

ZIGGER, M. A. J.; TREDGET, E. E.; SYKES, B. D.; MCGANN, L. E. Injury and protection in split-thickness skin after very rapid cooling and warming. **Cryobiology**, v.35, p. 53-69, 1997.