

A liofilização como método de preservação dos tecidos para implantação cirúrgica: estudo crítico

(1) Salomão Schwartzman

(2) Américo Marques

UNITERMOS: Liofilização, liofilização de tecidos, tecidos preservados, implantação de tecidos.

KEY WORDS: Freeze drying, Tissue preserved.

RESUMO: Os requisitos básicos de um transplante armazenado útil, são definidos e explicados nas suas capacidades biodinâmicas. São descritos os princípios amplos da congelação, congelação-secagem, congelação-protégida com glicerol, tal como se aplicam ao armazenamento de tecidos apresentados.

Introdução

Os materiais liofilizados apresentam-se sob a forma de corpos sólidos, de aspecto poroso e seco. A liofilização é um processo que desidrata produtos líquidos, soluções, suspensões e tecidos com alta concentração protéica, podendo por vezes manter a viabilidade celular. Consiste fundamentalmente de um congelamento, cuja temperatura passa pelo ponto eutético o mais rapidamente possível, provocando a formação de microcristais de gelo intra e extra-celulares sem alterar as características biofísicas e bioquímicas do produto.

Sob a influência de um vácuo na ordem de 10 a 20 micra, a água congelada sublima-se e passa diretamente do estado sólido para o gasoso sem passar pelo estado intermediário, o líquido.

A técnica de liofilização permite conservar bactérias e vírus, com alto teor de vitalidade, assim como fixa os tecidos de origem humana ou animal, preservando sua estrutura celular inalterada.

Deve-se esclarecer entretanto, que existe uma umidade residual de vital importância na preservação destes produtos, sendo a variação máxima desta, compreendida entre 1% e 2%.

Os recipientes de vidro armazenadores do produto são hermeticamente fechados com a atmosfera de nitrogênio ou à vácuo, sendo mantidos à temperatura ambiente em lugar fresco e protegidos dos raios solares. Sua estocagem nestas condições tem validade de um ano após a liofilização e de dois anos se mantidos em geladeira.

Os tecidos orgânicos para uso cirúrgico

A substituição de um setor anatômico com solução de continuidade tal como: osso, pele, fâscia, dura-máter, cartilagem, músculo, tendão, vasos ou parede de bexiga por tecido armazenado constitui um grande progresso da Cirurgia Reconstrutiva. O conceito de estocagem de tecidos não é nenhuma novidade: "Seria muito prático se o cirurgião pudesse

Trabalho realizado na Liotécnica Química S.A. em conjunto com o Centro de Pesquisas Haroldo Levy do Instituto Central da Fundação Antonio Prudente.

1. Colaborador Científico em Liofilização do Laboratório de Cirurgia Experimental do Centro de Pesquisas Haroldo Levy do Instituto Central da Fundação Antonio Prudente.
2. Titular do Centro de Pesquisas Haroldo Levy do Instituto Central da Fundação Antonio Prudente.

armazenar pedaços de pele, periósteo, osso, cartilagem, vasos sanguíneos, peritônio, omento e gordura para serem usados posteriormente (Carrel, 1912). Atualmente, o desenvolvimento deste conceito alcançou tais proporções que seus princípios constituem um novo campo da cirurgia.

Basicamente, o requisito cirúrgico, para que o tecido armazenado tenha utilidade, é de que uma vez transplantado, o tecido deve funcionar da maneira prevista. Isto vai depender do cumprimento de certas funções biodinâmicas do implante, as quais são:

- Aceitação do implante pelo hospedeiro;
- Alteração dinâmica tanto no implante quanto no hospedeiro;
- Competência mecânica do implante em aceitar as exigências físicas;
- Provisão de um molde para reparação pelo tecido do hospedeiro "Ingrowing" (= que cresce dentro de, ou para dentro) com substituição completa ou parcial na forma anatômica do implante.

Congelação

A congelação dos tecidos deve alcançar, na sua forma ideal, uma imobilidade molecular relativa sem qualquer alteração na atividade biológica dos tecidos. Ao dar-se a descongelação, os tecidos devem recuperar suas atividades metabólicas temporariamente reduzidas, assim como suas funções relacionadas. Infelizmente, de todos os métodos de congelação comumente usados para o armazenamento de tecidos, nenhum alcança este ideal. O fracasso é atribuído a dois fatos principais, a saber:

- Não se pode aplicar a velocidade de congelação usada pelos biólogos para a sobrevivência de células isoladas ou de pequenos grupos celulares na liofilização de massas incomparavelmente maiores de tecido exigido para os procedimentos cirúrgicos.
- Durante uma congelação lenta, o tecido muda em soluções salinas hipertônicas, ou "tissue bines", o que é mortal para as células e potencialmente destrutiva para a matriz.

Eis alguns dos problemas mais importantes que estão sendo pesquisados:

- O significado da cristalização do gelo em estado sólido;
- A importância de cristais de gelo extra e intracelulares em relação à viabilidade das células;
- O significado das concentrações dos eletrólitos do tecido e a danificação das células;
- O valor da congelação "protegida", usando glicérol, lactose e outras substâncias similares;
- O efeito da congelação nos complexos lipoprotéicos dentro das células;
- A existência e o significado do choque térmico para as células;
- As mudanças nos sistemas enzimáticos celulares com a congelação.

Apesar destes itens a serem esclarecidos, o uso da congelação profunda para armazenar tecidos para uso cirúrgico, permanece um método relativamente simples e prático.

Congelação-secagem

O princípio de congelação-secagem emprega o conceito de retirar o gelo dos tecidos por sublimação num vácuo. Isto é calculado para reter as capacidades biodinâmicas do tecido e ainda permitir o armazenamento em prateleiras à temperatura ambiente. Do ponto de vista clínico não é necessário, nem é particularmente desejável, manter a viabilidade celular no homo ou hetero transplante.

O método foi desenvolvido por Flosdarf e Hyatt e aplicado pela primeira vez clinicamente por Kreuz, Hyatt, Turner e Bassett.

Os tecidos a serem congelados-secos são geralmente obtidos sob condições assépticas. A unidade de congelação-secagem usada no nosso banco é uma grande câmara, de desenho padrão. Os dois pratos condensadores ocos são refrigerados usando freon, mantendo uma temperatura de superfície constante de -45°C. O prato oco superior pode ser refrigerado ou aquecido, usando tricloroetileno como fluido circulante. Isto permite ajustamento na temperatura deste prato de secagem para obter uma secagem mais suficiente.

Para iniciar o ciclo de congelação-secagem, o interior da câmara é esterilizado com um agente químico. Uma mistura de gelo seco e álcool é colocada numa geladeira externa para que a temperatura do prato de secagem se aproxime da temperatura do prato condensador a -45°C. Com as precauções assépticas, os tecidos a serem depositados são removidos da unidade de congelação profunda, desembrulhados e colocados na prateleira de secagem da unidade.

Fecha-se a unidade, e a fase de vácuo começa. Após mais ou menos 30 minutos, o vácuo é constante de 5 a 10 micra. A temperatura da prateleira superior pode elevar-se gradativamente até 0°C dentro de 24 horas, e elevar-se a +30°C progressivamente até o 9.º dia a fim de utilizar o calor latente para obter uma secagem mais eficiente. No 14.º dia o ciclo para o osso pode ser considerado terminado. Este período de tempo é sem dúvida em excesso daquele exigido para a secagem, mas mantém a relação de tempo, com vista à variabilidade da carga e a umidade residual errática do osso, daí o sucesso clínico obtido com este sistema.

Os resíduos são removidos da unidade com um vácuo secundário de aproximadamente 3000 micra. O término aceitável do ciclo de congelação-secagem é determinado, de uma forma arbitrária à quantidade de umidade residual no tecido. Esta determinação é baseada na observação de Flosdorf, indicando a umidade residual dos soros congelados-secos no índice das qualidades de conservação. Ao aumentar a dura-

ção do ciclo congelação-secagem não se conseguiu abaixar o conteúdo final de umidade de maneira significativa, porém, osso armazenado durante 5 anos com um nível de 2 a 4% de umidade residual foi usado com bom resultado clínico.

As vantagens da congelação-secagem:

- O método usa o que, teoricamente, seria a princípio menos destrutivo, podendo ser aplicado ao tecido e ainda consegue alcançar um armazenamento de longa duração;
- O produto final seco pode ser armazenado à temperatura ambiente;
- O material não sofre nenhuma perda no tocante à sua forma;
- O transporte dos tecidos é realizado com muita facilidade.

As desvantagens da congelação-secagem:

- Custo inicial do equipamento muito elevado;
- A demora usada no processo dos tecidos antes do armazenamento.

Congelação protegida

Foi descrito o glicerol e compostos, relacionados com a propriedade pouco comum de proteger as células contra os efeitos habituais da congelação. Mollison e Sloviter fizeram uma transfusão de sangue humano armazenado há várias horas a -79°C , seguindo a proteção das células com 15% de glicerol. Eles determinaram que havia aproximadamente 50% de hemólises, por este método, mas que as outras células sobreviviam normalmente. Com maiores cuidados técnicos, Chaplin e Mollison foram capazes de diminuir a hemólise até aproximadamente 2%, usando glicerol numa concentração de 30%. O mecanismo da proteção pelo glicerol não está totalmente compreendido, mas suas aplicações refere-se seguramente aos itens:

- Depressão da parte de congelação e mudanças da pressão osmótica envolvendo soluções de glicerol e eletrólitos das células;
- A propriedade higroscópica do glicerol e a prevenção da total desidratação das células;
- A possível proteção parcial que o glicerol tem na prevenção da desnaturação lipoprotéica.

A congelação protegida para o armazenamento de longa duração não é de uso diário a não ser no programa de preservação do sangue. Considerando o nível da experiência no campo da congelação protegida, pode-se antecipar que este aspecto de armazenamento oferecerá maiores possibilidades no futuro.

Em experiência clínica, os transplantes liofilizados que são os mais comumente armazenados para uso cirúrgico são os homólogos. As funções biodinâmicas são mais completamente excitadas quando usadas como transplantes isotópicos, isto é, tecido no lugar anatômico normalmente ocupado pelo mesmo tipo de tecido.

Deve ser salientado que o transplante autólogo permanece clinicamente superior ao homólogo armazenado. Este desempenha seu papel em cirurgia, somente quando o autólogo não é disponível.

A viabilidade das células vertebradas após a congelação de descongelação

Trabalhos recentes demonstraram que certas células de mamíferos podem sobreviver à congelação-secagem e à reconstituição. Por isso, não é totalmente impróprio durante o processo da liofilização, considerar os efeitos da congelação como das etapas da liofilização sobre a viabilidade das células vertebradas.

Durante a primeira metade deste século, o número de relatório de células tendo sobrevivido ao frio externo aumentou continuamente. Isto foi particularmente verdade desde que o uso de agentes protetivos foi mostrado para evitar a maioria dos danos às células pela congelação (Polge, Smith e Parkes). Contudo, todos os agentes protetores até agora usados são não-voláteis e por isso não podem ser aplicados na liofilização. O problema do grau de dano feito às células vertebradas pela congelação e descongelação ainda é pertinente. Deve-se, então, considerar apenas a sobrevivência das células vertebradas congeladas, sem o uso de agentes protetores.

Embora nos últimos 20 anos vários pesquisadores relataram que as células sobrevivem à congelação sem protetores, um número quase igual foi relatado como tendo falhado para recuperar as células vivas. Aqueles que conseguiram, frequentemente discordaram sobre a proporção de células que podem sobreviver. Esta discrepância nos resultados pode atribuir-se provavelmente a uma ou outra das três variáveis, sendo elas:

1. A diferença no tipo de células usada;
2. A diferença no método usado para demonstrar a viabilidade;
3. A diferença no processo de congelação.

Vamos examina-las brevemente:

Tipos de células e sobrevivência

Foram demonstradas muitas vezes que células tumorais são mais resistentes ao dano pela congelação do que a maioria das células normais. Entre as últimas mencionadas também certos tipos de células, ou "strains" são mais susceptíveis que outras. Assim os melanócitos na pele do rato (Taylor, 1949) são destruídos a uma temperatura que não afeta os outros componentes da pele, e as células em fuso embrionário podem suportar temperaturas mais baixas que o músculo ou as células epiteliais (Pomerat e Lewis, 1953).

No decorrer de experiências recentes a serem mencionadas abaixo, foi achado que as células humanas "strains" usadas eram 5 vezes mais resistentes à danificação pela congelação que os tecidos embrionários de pintainhos, recentemente dissociados. O trata-

mento a que as células são submetidas antes da congelação pode alterar sua resistência à danificação pela congelação. Por exemplo, a sobrevivência de vários tipos de células foi observada ter aumentado de 100% até 200% se elas fossem expostas a 0,5% de tripsina, durante 2 minutos logo antes da congelação. Este efeito da tripsina desaparece de 6 a 8 horas. Estes fatos demonstram o cuidado necessário ao se tentar comparar diferentes estudos ou fazer generalizações a partir de qualquer um.

Método para demonstrar a viabilidade

Enquanto outros métodos foram usados para avaliar a viabilidade de um tecido congelado e descongelado, a maioria dos estudos basearam-se em um dos processos abaixo, pela observação do destino do tecido após:

- transplantação no animal hospedeiro;
- incubação "in vitro".

Quando o teste é baseado no crescimento de um tecido congelado injetado ou transplantado no animal, apresentaram-se dificuldades. Pode ser difícil determinar se as células vivas observadas no local são as transplantadas congeladas, ou se são as células do hospedeiro que invadiram a área. A evolução é baseada no crescimento das células sobreviventes e precisa haver um certo tempo para sua proliferação. Já que isso acontece a um índice indeterminado, torna-se progressivamente mais difícil fazer uma estimativa do número originário de células sobreviventes. Em experiências de Taylor aplicando fragmentos de pele de ratos que foram removidos 20 horas após o processo de transplantação, apresentaram apenas uma fração de 1% de células sobreviventes, enquanto aquelas deixadas no hospedeiro durante duas semanas se assemelhavam completamente ao tecido da pele viva com glândulas ativas e pelos que cresciam. Isto atribuiu-se simplesmente à multiplicação das poucas células sobreviventes que então repopulavam a matriz não-celular persistente. Parece, por isso, que embora os transplantes possam servir para demonstrar se algumas células sobreviveram, eles não indicaram de forma adequada o grau de danificação feita pela congelação.

Quando a incubação do tecido congelado "in vitro" foi feita para julgar a viabilidade, geralmente nenhuma célula sobrevivente foi vista, ou no melhor dos casos, de forma tão pouca que os pesquisadores não lhes davam importância. Porém, este método permite detectar um número mínimo de células vivas, por isso foi usado em muitas experiências.

Há tempo foi notado que o modo de retirar calor influi muito sobre a danificação das células, porque a velocidade do esfriamento determina em grande parte, o número, tamanho e índice de formação de cristais de gelo e sua localização no tecido. Evidência, contudo, foi apresentada em favor tanto da congelação lenta como da congelação rápida. Por isso, varia-se o índice e a duração do processo de congela-

ção sobre a sobrevivência celular (Taylor, 1960). Para estas experiências, suspensões de células dissociadas com tripsina, foram usadas. As células observadas não receberam o mesmo tratamento, e quando colocadas em câmaras especiais, podem ser continuamente observadas sob o microscópio para a análise da viabilidade e a contagem certa. Os resultados destes testes demonstraram que um esfriamento rápido era muito prejudicial cada vez que a temperatura da amostra era abaixada repentinamente a -20°C . Porém, se a queda de temperatura fosse tão rápida, mas interrompida e detida na faixa entre -5°C e -20°C durante um período de 1 a 5 minutos antes de uma segunda queda rápida de temperatura, então a percentagem de sobrevivência era intensamente melhorada. Este sistema de congelação é similar aquele demonstrado por Lauyet e Keane para dar uma sobrevivência semelhante à congelação lenta usada por Polge e cols. Este sistema difere em reter o resfriamento a uma temperatura mais alta. Em nossos testes a temperatura mais alta na qual a retenção era adequada foi um pouco acima da zona eutética descrita por Rey para soluções salinas complexas. Quando os efeitos de várias temperaturas de retenção foram comparadas, foi achado que mantendo a temperatura a -20°C , ou mais abaixo, não melhorava a sobrevivência além daquela que foi obtida após um rápido resfriamento de uma só fase ("one-step-cooling"), mas que a percentagem de sobrevivência fora aumentada à medida que a temperatura de retenção era elevada de -20°C até -5°C . A duração de tempo ótima para retenção a estes níveis variava com a temperatura, o tamanho e a forma geométrica das amostras.

Estas experiências parecem indicar que, na congelação rápida de fase única, não é o índice da queda de temperatura a causa da danificação das células, mas a falta de tempo suficiente para que a cristalização seja terminada dentro de uma zona considerada segura. Parece que a cristalização danifica menos quando acontece perto do ponto de congelação, onde os centros de nucleação são relativamente poucos e seguramente limitados aos espaços extra-celulares, e quando há bastante tempo para a cristalização de toda a água disponível antes que o segundo passo de resfriamento leve a temperatura abaixo de -20°C .

Nesta conexão algumas observações feitas durante a congelação das células sob alta pressão hidrostática são pertinentes. Se uma pressão de 2.000 atmosferas é aplicada às células, sua temperatura pode ser reduzida a -20°C sem que haja congelação. Se a pressão é repentinamente alta, a congelação acontecerá a grande velocidade através da amostra. A congelação neste caso, como no resfriamento de duas fases ("two-step-cooling"), acontece acima de -20°C , mas, em contraste com o resfriamento de duas fases, ela acontece quase instantaneamente.

Quando a danificação das células foi causada pela própria pressão, calculou-se que esta congelação

ultra-rápida a temperatura muito acima de -20°C era tão nociva quanto um resfriamento rápido de fase única, onde a maior parte da cristalização acontece a temperatura mais baixa. Isto ajuda a aceitar a idéia que a cristalização rápida, seguramente a partir dos numerosos centros de nucleação dentro do citoplasma, assim como nos espaços intercelulares, é um dos principais fatores que danificam as células vivas por resfriamento rápido.

Estas experiências acrescentaram maior evidência conclusiva que certas células de vertebrados podem aguentar a congelação até -190°C sem agentes químicos protetores, que elas sobreviveram e se multiplicaram após a descongelação. Medição mais exata da percentagem de sobrevivência fornece uma melhor indicação da diferença entre "cell strains" na sua susceptibilidade à danificação por congelação. Também ajudou na evolução dos efeitos de variar o processo da congelação numa busca dos fatores responsáveis pela danificação.

A secagem de células vivas

A pesquisa na secagem de células vivas está ainda num estágio muito elementar, embora houvesse um número grande de experiências numa base empírica com a secagem de vírus, bactérias e uns poucos protozoários. Somente dois tipos de células de mamíferos, ambas altamente especializadas, têm sido com sucesso secadas e reconstituídas. Não se consegue entender realmente os mecanismos pelos quais a danificação celular é feita ou evitada. Observações experimentais não foram até agora relacionadas a uma teoria do mecanismo, por isso esta discussão será apenas de natureza especulativa.

Primeiro examinamos muito brevemente as poucas observações experimentais sobre a secagem de células vivas. A secagem de proteínas purificadas teve muito sucesso e foi estabelecida que, para uma boa recuperação e uma vida de armazenamento máximo, o material deveria ser tão seco quanto possível. Com as bactérias, contudo, foi considerado que se a dessecação se aproxima do seco total, a recuperação sobre a reconstituição é, em geral, substancialmente reduzida. A melhor sobrevivência a partir da secagem parece ser atingida com aproximadamente 1% ou mais de água residual. Por outra parte parece também ser verdade com as bactérias que a presença de água residual resulta em características de um pobre armazenamento. Uma vez que, para propósitos práticos, os requisitos de umidade residual são incompatíveis para alta recuperação a partir da secagem e da sobrevivência durante longos períodos de armazenamento.

Não se pode secar células que tenham sido submetidas a um método que contém glicerina concentrada, e sim células congeladas com sucesso sem glicerina, podem ser totalmente secas. Entre as células de mamíferos, somente os eritrócitos e espermatozoides têm sido secados e reconstituídos com sucesso.

Em qualquer caso, olhemos rapidamente as circunstâncias que rodeiam a secagem dos eritrócitos e espermatozoides desde que existem circunstâncias aqui que podem ajudar a entender os fenômenos básicos envolvidos. Desde que foi estabelecido que os eritrócitos de mamíferos podiam ser rapidamente congelados e descongelados sem danificação, presume-se que qualquer danificação resultante de uma sequência completa de congelação, secagem e reconstituição se já devido aos fatos ocorrentes durante a secagem, ou a reconstituição. A fim de obter a secagem no tempo mais curto possível, o espécime deve ser apresentado à atmosfera de secagem com um raio superfície-volume, o maior possível. Isto se faz colocando o material num pedaço de gaze de náilon que pode ser pendurada numa câmara de vácuo. Os eritrócitos são secos ou a partir do sangue inteiro ou como células lavadas suspensas em solução salina isotônica. O espermatozoide de touro é diluído aproximadamente 1 para 20 num estander padrão de uma gema de ovo e citrato, ou de leite integral. A câmara de secagem consiste simplesmente de uma pequena câmara de vidro asentada numa válvula de vácuo. A válvula é por sua vez colocada diretamente sobre a abertura de uma bomba de vácuo.

A bomba rotativa tem uma capacidade de 130 pés cúbicos por minuto, não havendo necessidade de para um espécime pequeno introduzir um dessecante ou sifão frio. Ao invés disto, o vapor de água pode passar através da bomba.

O espécime é introduzido quente e é congelado por evaporação durante os primeiros segundos de bombagem. Se se abrir muito a válvula, o espécime congela em aproximadamente meio segundo e é favorável abrir a válvula devagar para retardar a congelação em 5 ou 4 segundos. Seguindo a congelação, a temperatura cai rapidamente a -35°C onde a secagem ocorre. No fim de 3 ou 4 minutos a temperatura começa a subir de forma visível. Se removido do vácuo a este ponto, o espécime torna-se úmido ao esquentar, demonstrando que o gelo não foi ainda totalmente sublimado. Quando, após 6 ou 7 minutos, a temperatura alcançar 0°C , o espécime permanece seco ao ser removido do vácuo. É neste ponto que foi retirada a água que pode ser congelada, mas ainda a água de ligação permanece.

Células vermelhas secaram desta maneira até que só a água livre foi removida e pode ser reconstituída imediatamente em solução salina isotônica com 80 a 90% de sobrevivência de eritrócitos intatos. Se a secagem puder continuar, maior reconstituição com solução salina isotônica torna-se possível. Sob o microscópio, as células parecem aumentar de volume e estourar como se algum fenômeno osmótico estivesse acontecendo. Contudo, a reconstituição com soluções hipertônicas é igualmente inefetiva.

Numa base estritamente empírica foi achado que o dextran e polyvinyl pyrrolidone permitiam uma recuperação excelente, quando usamos na solução reconstituente a aproximadamente 20% de concentra-

ção. É importante observar que tanto o dextran como o PVP devem ser envelhecidos em solução durante um período de 6 a 8 semanas, antes de se tornarem eficazes na reconstituição. A reconstituição de 80% de células vermelhas intactas pode ser obtida após um período de secagem de 10 minutos quando o espécime quase se aproxima da temperatura ambiente. Contudo, mais secagem causa diminuição na recuperação e após exposição a um vácuo de 10 micra durante 30 minutos à temperatura ambiente, é impossível recuperar mais de uma ocasional célula vermelha intata mesmo com algumas concentrações de dextran ou PVP.

Até aqui, nossa experiência com células vermelhas é comparável àquela com bactérias. A melhor recuperação seguindo a secagem é achada quando uma quantidade apreciável de água residual permanece. Renovação dos restos finais da água resulta num fracasso de reconstituição. Contudo, existe uma observação adicional importante: após as células vermelhas bem secas ficarem à temperatura ambiente num dessecador durante vários dias, começa-se a achar que as células podem novamente ser recuperadas intatas com dextran ou PVP. Qualquer que seja o fenômeno a causar a falta de recuperação após uma secagem completa, não é inteiramente irreversível.

Considerando estas evidências experimentais agora pelo menos somos capazes de formular algumas perguntas importantes que devam ser respondidas a fim de construir uma hipótese razoável para o mecanismo da danificação ao secar. As perguntas mais importantes são aquelas sobre o problema de umidade residual: De onde vem? Qual é a última percentagem? E por que é tão importante para a viabilidade da célula?

Danificação durante a congelação

Mecânica

A danificação mecânica é definida com uma ruptura física ao deslocamento do tecido ou componentes celulares como resultado do crescimento dos cristais de gelo. Os vírus e muitas bactérias podem ser congeladas e descongeladas diminuindo-se o índice metabólico dos mesmos. Formas superiores da vida, tais como os protozoários, são mais variáveis na sua resposta à congelação e descongelação. Em geral, os tecidos dos mamíferos não resistem a congelação e descongelação na ausência de uma substância protetora tal como a glicerina. A teoria corrente da proteção pela glicerina é baseada sobre uma redução de quantidade de água congelada devido ao poder de ligação da glicerina. A redução resultante na concentração de solutos evita a desnaturação bioquímica das

proteínas da concentração alta de soluto. Contudo, existe ainda uma formação substancial de cristal de gelo e devemos concluir que a presença de cristais de gelo externos não é em si letal. Em tecidos que têm membranas celulares rígidas, tais como os tecidos das plantas, a danificação mecânica indubitavelmente é um fator vital, mas é aparente que para muitas células a danificação irreversível não resulta da presença de cristais de gelo extra-celulares. Congelamento muito rápido é tolerada somente pelos eritrócitos e, sob condições únicas, espermatozoides: duas formas muito especiais de células. É bem provável que a formação de cristais de gelo intra-celulares por congelamento rápido é mecanicamente destrutiva para a maioria, se não para todas as células.

Química

Quando a água é retirada da solução para formar gelo, uma alta concentração de solutos permanece. Já que qualquer reação química depende do tempo e da temperatura, o índice ao qual a danificação da concentração acontecerá depende do tempo disponível para a reação. Muitas células que são danificadas pela congelação podem sobreviver à baixa temperatura, se elas são congeladas na presença de um aditivo protetor tal como a glicerina. O mecanismo da proteção pela glicerina é relacionado com sua habilidade para evitar que a água se congele e assim reduzir a quantidade total de concentração a um nível tolerável. Assim apareceria que células susceptíveis, tais como as do tecido dos mamíferos não possam ser congeladas rapidamente sem sofrerem danificação mecânica da formação de cristais intra-celulares, mas, tampouco, podem ser congeladas lentamente sem sofrerem danificação química da concentração de solutos. É claro que devemos também levar em conta que as observações de danificação pela congelação não podem ser dissociadas do processo de descongelação e que a possibilidade da danificação na descongelação como acontecimento independente não foi satisfatoriamente evoluído.

Quando a congelação está no estágio inicial num processo de congelação-secagem, gostaríamos de ter alguma segurança que a congelação não irá produzir danificações irreversíveis. Atualmente, não é fácil ter certeza disso, já que com exceção dos vírus e bactérias, a maioria das células vivas são susceptíveis de congelar e descongelar-se, a menos que pré-tratadas com glicerina. Infelizmente, não podemos secar a partir do estado glicerinado, já que a glicerina não sublima durante a secagem e ficamos com uma solução de glicerina concentrada que é altamente tóxica.

Por enquanto, as únicas células mamíferas que podem sobreviver à congelação sem glicerina, são os eritrócitos e espermatozoides.

SUMMARY

The basic requirements of a useful stored transplant are explained and defined in their biodynamic capacities.

The wide principles of freezing, freeze-drying, freezing protected by glycerol, just as they are applied to the shown stored tissues are made clear as well.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANNEAR, D. I. — Preservation of leptospirae by drying. *J. Pathol. Bact.* 72: 322, 1956.
2. ——— Preservation of strigonomas ocephali in the dried state. *Nature*, 178: 413, 1956.
3. ——— The preservation of bacteria by drying in peptone plugs. *J. Hyg.* 54: 487, 1956.
4. BARONE, R.; STAGNARA, P.; VALENTIN, F.; MEURIER, C. L. & PAVAU, C. L. — Evolution clinique et radiologique de divers transplants osseux. *Bull. Soc. Sc. Vétér.* 57: 25, 1956.
5. ——— Structure histologique et réhabilitation des transplantation des transplants osseux. *Bull. Soc. Sc. Vétér.* 1: 39, 1956.
6. ——— Sur l'évolution des transplants osseux. *Res. Méd. Vétér.* 107: 353, 1956.
7. BILLINGHAM, R. E. — Preservation and transplantation of normal tissues. In: WOLSTENHOLME, G. E. & CAMERON, M. P. (titulo do livro). Boston, Bown and Co., 1954. p. 160.
8. BRUHAT, G. — Thermodynamique. Paris, Masson, 1950.
9. DUBAU, R.; MEUNIER, J. P.; DERARTY, R. & HENAFF, F. — Une nouvelle méthode de conservation des greffons osseux par lyophilisation. *Presse Méd.* 60: 66, 1952.
10. DUBOST-PERRET, T. & DEPLY, L. P. — Transplants osseux hétéroplastiques: technique de préparation. *Res. Orthop.*, 41: 431, 1955.
11. DURAND, E. — Magnetostatique, Paris, Masson, 1952.
12. FLOSDOF, W. & HYATT, G. W. — The preservation of bone graft by freeze-drying. *Surg.* 31: 5, 1952.
13. ——— Preservation of bone grafts by freeze drying. *Surg.* 31: 716, 1952.
14. GREAVES, R. I. N. — Preservation of living cells by freeze drying. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 85: 723, 1960.
15. GUILLEMINET, M. — Greffes osseuses, transplants homoet hétérogènes. *Soc. Fr. Orthop. XXV Réunion ann.*, 1950.
16. ——— M. Banque d'os de la clinique de chirurgie orthopédique de Lyon: résultats éloignés en chirurgie humaine, règles d'utilisation des greffes hétérogènes. *Res. Orthop.*, 41: 224, 1955.
17. ——— Transplants osseux hétérogènes. Communication au Congrès orthopédique de Rome. 1951.
18. ——— Transplantations osseuses: documents expérimentaux sur les hétérotransplants. *Mém. l'Acad. Chir.* 398: 144, 1952.
19. ——— Transplants osseux hétéroplastiques: résultats éloignés en chirurgie humaine. *Lyon chir.*, 3: 322, 1954.
20. ——— Transplantations osseuses: aspects cliniques et expérimentaux. *Suisse Méd.* 84: 35, 1954.
21. ——— Utilisation d'os hétérogènes, réfrigérés en chirurgie humaine. *Lyon Chir.*, 7: 1, 1952.
22. ——— Transplantation osseuse: Communication au congrès de chirurgie de Paris. 1952.
23. HENAFF, F. — Préparation et conservation par le froid des tissus ou organes utilisés en médecine. *Comptes rendus des travaux de la Commission VI. IX Congrès International du Froid.* Paris, 1955.
24. ——— Sur une technique de préparation des greffons de cornée lyophilisée. *Compte Rendu l'Acad. Sci.* 245: 582, 1957.
25. HREUZ, F. P.; HYATT, G. W.; TURNER, T. C. & BAASETT, C. A. L. — The preservation and clinical use of freeze-dried bone. *J. Bone Joint Surg. (am)*, 33-A: 863, 1951.
26. HYATT, G. W. & LANGLOH, J. T. — Arterial procurement and processing (sous presse dans le *Medical Technicians Bulletin*).
27. ILIFF, C. E.; WOOD, R. M. & HOLLANDER, D. M. — Successful transplantation of a frozen human cornea. *Am. J. Ophthalmol.* 41: 504, 1956.
28. JAKOB, M. — Heat transfer, Londres, Wiley, 1957.
29. JUDET, C. & ARVISET, D. — Banque d'os et hétérogreffes. *Presse Méd.* 57: 1006, 1949.
30. KING, J. M. — Keratoplasty: experimental studies with cornea preserved by dehydration. *Am. J. Ophthalmol.* 43: 353, 1957.
31. MERYMAN, H. T. — Drying of living mammalian cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 85: 729, 1960.
32. ——— Survival of spermatozoa following drying. *Nature*, 184: 470, 1959.
33. ——— Drying of living mammalian cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 85: 729, 1960.
34. ——— Rapid freezing and thawing of whole blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90: 587, 1955.
35. ——— Survival of spermatozoa following drying. *Nature*, 184: 470, 1959.
36. McPHERSON, S.; DRAHEIN, J.; EVANS, V. J. & EARLE, W. R. — The viability of fresh and frozen corneas. *Amer. J. Ophthalmol.* 41: 513, 1956.
37. REY, L. R. — Regards sur les applications biologiques des basses températures: banque des tissus et produits naturels lyophilisés. *Bull. Inst. Inter. Froid.* 37: 1115, 1957.
38. ——— Studies on the action of liquid nitrogen on cultures in vitro of fibroblasts. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 32: 460, 1957.
39. RIBAUD, G. — Mesure des températures, Paris, A. Colin, Ed., 1948.
40. RIETORD, L. — Traité de Lyophilisation, Paris, Hermann, Ed., 1960.
41. ROB, C. G. & EASTCOTT, H. H. G. — The preservation of arteries and other tissues for clinical use, dans. In: Ciba Foundation Symposium. The preservation and transplantation of normal tissues. London, J. et A. Churchill, p. 190-195.
42. ROCARD, Y. — Thermodynamique, Paris, Masson, 1952.
43. ——— Electricité, Paris, Masson, 1954.
44. RYCROFT, B. W. — The present state of corneal grafts. In: Ciba Foundations Symposium. The preservation and transplantation of normal tissues. London, J. et A. Churchill, Ed., 1954, p. 210.
45. SCHWARTZMAN, D. — Liofilização: meios e métodos — *Tecnol.* 8: 121, 1978.
46. SEWELL, W. H.; KOTH, D. R. & BEDELL, W. C. — The present status of our experiments with freeze-dried grafts. *Am. J. Surg.* 91: 358, 1956.
47. STAGNARA, P. & DUBOST-PERRET, T. — Greffes osseuses: transplants homogènes et hétérogènes. *Res. Orthop. Appar. Moteur.* 6: 404, 1950.
48. ——— Expérimentation sur les transplants osseux hétéroplastiques. *Res. Orthop. Chir. Appar. Moteur.* 41: 261, 1955.
49. WAGNER, A. — Traité de lyophilisation, Paris, Hermann, Ed., 1960.