

Criopreservação de células-progenitoras hematopoéticas

Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells

Gil Cunha De Santis¹, Karen de Lima Prata²

RESUMO

O transplante autólogo de células-progenitoras hematopoéticas (CPH) requer, na maioria das vezes, a sua criopreservação a fim de manter sua viabilidade até o momento da infusão, que pode se dar meses ou anos depois da coleta. A criopreservação adequada das CPHs é feita ao submeter a suspensão celular a velocidades lentas de congelamento (1 a 3°C/minuto), e com o emprego de substâncias chamadas crioprotetoras, sendo a mais usada o dimetilsulfóxido (Me_2SO_4), um agente coligativo que diminui o conteúdo de água livre tanto no espaço intra como no extracelular. Portanto, este composto diminui o tamanho e o número dos cristais de gelo. O descongelamento das CPHs é feito rapidamente. A suspensão celular pode então ser infundida sem posterior manipulação ou ser submetida a lavagem para remover o Me_2SO_4 , restos celulares e hemoglobina livre, potencialmente tóxicos tanto para o paciente quanto para as células.

Palavras-Chave: Células Progenitoras Hematopoéticas. Criopreservação. Transplante. Dimetil Sulfóxido.

Introdução

A expansão do papel do transplante de células-progenitoras hematopoéticas em doenças hematológicas, neoplásicas e genéticas, e a propagação dos serviços de transplante têm exigido melhoria na capacitação dos serviços quanto à manipulação e à criopreservação destas células. São várias as inovações tecnológicas que podem ser arroladas nos últimos anos, dentre elas o desenvolvimento de equipamentos como o BioArchive, que permite armazenamento prolongado de unidades de CPH (principalmente de sangue de cordão umbilical e placentário - SCUP) sem expô-las a variações de temperatura potencialmente deletérias

para a sua viabilidade, como é frequente com o emprego de tanques convencionais. Também importante foi a ampliação do conhecimento sobre o comportamento das CPHs submetidas ao congelamento, desde sua descrição inicial em 1955.¹

As fontes clássicas de CPH são a medula óssea (MO), o sangue de cordão umbilical e placentário e o sangue periférico (SP) após a mobilização das células-progenitoras hematopoéticas. Aparentemente, as CPHs oriundas destas fontes apresentam o mesmo comportamento à criopreservação. Todavia, seu cultivo *ex vivo* tem se tornado cada vez mais frequente, o que pode influir nesse comportamento, de modo a requerer protocolos específicos para a crio-

1. Médico Hematologista e Hemoterapeuta do Centro Regional de Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CRH-HCFMRP-USP), Hemocentro de Ribeirão Preto. Mestrado e Doutorado em Ciências Médicas na área de Hematologia pela USP.
2. Médica Hematologista e Hemoterapeuta do CRH-HCFMRP-USP, Hemocentro de Ribeirão Preto. Mestre em Ciências Médicas na área de Hematologia pela USP.

Correspondência:
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto. Rua Tenente Catão Roxo, 2501. Bairro Monte Alegre.
14051-140 - Ribeirão Preto, SP - Brasil

Artigo recebido em 06/10/2008
Aprovado para publicação em 29/01/2009

preservação de cada um dos diferentes produtos de CPH.²

Em geral, a criopreservação de CPH é considerada obrigatória para transplantes autólogos e para os bancos de sangue de cordão umbilical e placentário (BSCUP), enquanto os transplantes alogênicos geralmente são realizados com a infusão a fresco das CPHs, sem a sua criopreservação. Alguns serviços fazem transplantes autólogos com CPH não-criopreservadas (ver abaixo).

Princípios da criopreservação de células

O resfriamento de células a temperaturas pouco superiores a 0°C reduz o seu metabolismo, mas não o abole, de modo que as células continuam a sofrer um processo de deterioração progressiva, apenas em menor velocidade. Além disso, as várias vias metabólicas sofrem heterogeneamente as consequências das baixas temperaturas, o que, de seu lado, é fator adicional para a perda da viabilidade das células expostas a baixas temperaturas por muito tempo. Os efeitos mais conhecidos do resfriamento são a diminuição da atividade da bomba de sódio, a mudança de fase dos lipídios da membrana (que pode interferir com a função de enzimas) e a precipitação de substâncias (que pode resultar em alteração da composição das soluções e do seu pH). Adicionalmente, quando o resfriamento se dá rapidamente, pode ocorrer lesão e morte celular por mecanismos ainda mal estabelecidos, um fenômeno denominado “choque térmico”. Por isso, para conservar células e tecidos por período prolongado, se faz necessário congelá-los a temperaturas que interrompam as vias metabólicas celulares. Contudo, o processo de congelamento por si já implica riscos para a manutenção da viabilidade celular.

Os mecanismos precisos das lesões celulares pelo congelamento ainda são matéria de debate. Especulou-se inicialmente que estes mecanismos poderiam estar relacionados com o conteúdo celular de sais ou as características de composição da membrana celular.³ Todos os tipos celulares apresentam limites

específicos quanto à sua estabilidade quando suspensas em meio anisotônico. A exposição das células a meio hipertônico que exceder os limites de sua tolerância pode provocar alterações da membrana celular, particularmente no que diz respeito à permeabilidade, à integridade e à função. Cada tipo celular também apresenta um limite distinto de resistência à exposição a meio hipotônico. Além das características do meio, também é importante a temperatura da suspensão celular, que pode retardar ou acelerar a movimentação de água e eletrólitos entre a célula e o meio que a envolve.

A manutenção da viabilidade da célula submetida ao processo de criopreservação depende basicamente de sua capacidade de resistir a dois tipos de lesão: a desidratação e o dano mecânico decorrente da formação de cristais de gelo no seu interior⁴ (Figura 1). Em geral, estes dois tipos de lesão estão corre-

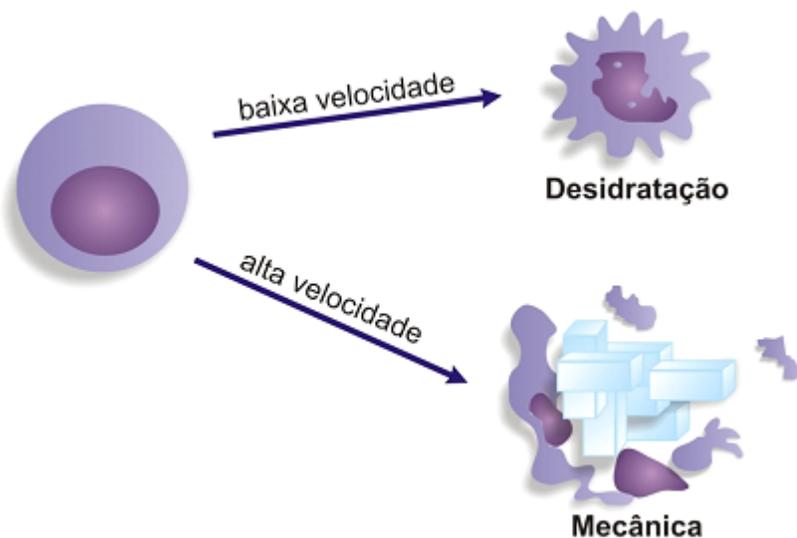


Figura 1: Tipos de lesão que podem ocorrer durante a criopreservação celular.

lacionados à velocidade com que a suspensão celular é congelada: o primeiro, em baixas velocidades, enquanto o segundo, em altas velocidades.

A formação de cristais de gelo requer pelo menos um evento inicial de nucleação, que depois aumenta progressivamente de tamanho por incorporação de moléculas de água livre e se expande por toda a solução ou suspensão celular na dependência da velocidade e intensidade da queda de temperatura e da composição do soluto. O congelamento rápido resulta na formação de muitos pontos de nucleação, que surgem quase que

simultaneamente, o que confere a cada cristal um tamanho relativamente menor do que aquele que surge com velocidades mais baixas de congelamento.

Quando se trata de suspensão celular, em geral a nucleação de gelo ocorre primeiramente no espaço extracelular, principalmente em baixas velocidades de congelamento. Os pontos iniciais de formação dos cristais de gelo recrutam moléculas de água e, de certa forma, “expulsam” o soluto para as porções ainda líquidas da solução, que, por sua vez, têm o seu ponto de congelamento progressivamente reduzido à medida que a concentração de soluto aumenta. A solução mais concentrada (e com maior viscosidade) se localiza mais próxima das células, que, expostas ao meio hipertônico, sofrem processo de desidratação. Em determinado momento, a concentração de solutos torna-se tão alta que ocorre o fenômeno da vitrificação, quando então cessa todo movimento de água e, conseqüentemente cessa o aumento do tamanho dos cristais de gelo. Nos congelamentos realizados em alta velocidade pode ocorrer a formação de cristais de gelo concomitantemente nos espaços intracelular e extracelular. Dependendo do tamanho dos cristais, pode ocorrer lesão mecânica das organelas subcelulares e da membrana celular. Idealmente, o processo de congelamento deve evitar que ocorra a formação de cristais de gelo no interior das células e induzir o processo de vitrificação.

As maneiras de evitar esses dois tipos de lesão celular são basicamente duas: aplicar velocidade de congelamento ideal para o tipo de célula em questão, e empregar agentes crioprotetores que minimizem a formação de cristais de gelo e diminuam a intensidade da desidratação celular (Tabela 1).

Tabela 1

Fatores a considerar durante processo de criopreservação de CPH

Volume do produto (necessidade de redução de volume)
Tipo de solução crioprotetora
Concentração de células nucleadas
Velocidade de congelamento
Previsão de uso clínico (tipo de armazenagem)

Agentes crioprotetores

A primeira vez em que um agente crioprotetor foi usado tem mais de meio século, quando se empre-

gou o glicerol para a preservação de espermatozoides de aves.⁵ O glicerol se mostrou eficaz também para a criopreservação de hemácias, plaquetas e vários tipos de células nucleadas. Esta molécula diminui a desnaturação das proteínas expostas a baixas temperaturas e é atóxica para as células, mesmo em altas concentrações. Contudo, a sua penetração nas células ocorre lentamente, o que constitui uma limitação em seu emprego para a criopreservação de diversos tipos celulares.

Dez anos depois do relato das propriedades crioprotetoras do glicerol, Lovelock e Bishop demonstraram que a substância dimetilsulfóxido era eficaz na criopreservação de esperma bovino.⁶ O Me_2SO é um composto higroscópico polar, incolor e inodoro, usado pela indústria como solvente. Esta é uma substância de baixo peso molecular, composta por um grupo sulfóxido, que é hidrofílico, e dois grupos metila, que são hidrofóbicos. O Me_2SO é metabolizado em dimetil-sulfona e dimetil-sulfeto, eliminados por via renal e exalado pelos pulmões, respectivamente. Sua meia-vida é de aproximadamente 20 horas. A dimetil-sulfona tem meia-vida de 72 horas e o dimetil-sulfeto é expirado durante aproximadamente 24 horas, o que confere odor característico ao hálito do paciente.

O Me_2SO é o crioprotetor mais usado para a criopreservação das CPHs, em geral nas concentrações entre 5 e 10%. A função deste agente parece ser essencialmente coligativa, ou seja, de “captura” das moléculas de água livre, o que leva a redução da quantidade de gelo formada, diminuição da temperatura do ponto de congelamento e aumento do ponto de vitrificação. Esta substância penetra em tecidos e células numa velocidade maior que a do glicerol à temperatura ambiente, o que constitui vantagem apreciável. No entanto, nesta temperatura, o Me_2SO é mais tóxico que o glicerol, inclusive para as CPHs, o que motivou a maioria dos serviços a estabelecer protocolos que prevêm sua adição lenta à suspensão celular e início do congelamento tão logo tenha terminada a adição. Douay e colaboradores mostraram perda significativa de precursores de granulócitos e macrófagos após incubação da suspensão celular com Me_2SO .⁷ Entretanto, estudos posteriores não confirmaram este achado.^{8,9} No Centro Regional de Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CRH-HCFMRP-USP), foram analisadas unidades de sangue de cordão umbilical expostas ao Me_2SO e mantidas por tempos progressivos a 4°C e a 37°C.¹⁰ Foi observada pro-

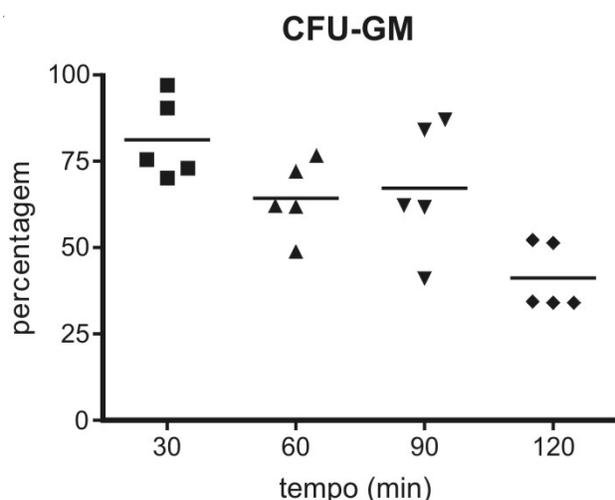


Figura 2: Quantificação de unidades formadoras de colônias granulócito-monócito (CFU-GM) de sangue de cordão umbilical e placentário expostas ao Me₂SO e incubadas por tempos progressivos, a 37°C.

gressiva perda da capacidade de formação de colônias de GM-CSF, principalmente à temperatura de 37°C (Figura 2). Por isso, recomendamos iniciar congelamento logo após a adição da solução crioprotetora.

Como as células são relativamente sensíveis ao chamado estresse osmótico, a adição e a remoção das soluções hipertônicas que contêm os agentes crioprotetores deve ser feita cuidadosamente, de modo a não ultrapassar sua tolerância osmótica. A exposição súbita das células a meios hipertônicos e, posteriormente, isotônicos pode levá-las à ruptura e à perda da viabilidade.

Além do glicerol e do Me₂SO, há outros agentes crioprotetores, como: propileno glicol, acetato de trimetilamina, trehalose, hidroxetilamido (HEA) e outros (Tabela 2). Particularmente importante dentre eles é o HEA, usado também como expansor da volemia e como agente sedimentante de eritrócitos, empregado para a separação de leucócitos, principalmente para a coleta de granulócitos.¹¹ O HEA 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. Os mecanismos crioprotetores do HEA não são plenamente conhecidos, mas en-

volveria 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. É possível que a utilização do HEA permita aplicar à suspensão celular velocidade de congelamento menos estrita. Em razão dessas propriedades, este agente tem sido usado principalmente quando do congelamento a temperatura não-programada, como aquela feita em congelador mecânico a 80°C negativos. Problema potencial do emprego de polímeros como o HEA e a polivinil-pirrolidona são os possíveis danos à membrana celular, como demonstrado com hemácias.¹²

Um protocolo alternativo ao uso de Me₂SO a 10% foi descrito por Stiff e colaboradores, que conseguiram bons resultados com a associação de Me₂SO a 5% com HEA a 6%.¹³ Entretanto, outros autores concluíram que associar o HEA ao Me₂SO a 5% não era imprescindível para uma boa recuperação de

Tabela 2

Relação de alguns agentes crioprotetores

<i>Composto</i>	<i>Representantes</i>	<i>Peso molecular</i>
Sulfóxidos	Dimetil-sulfóxido	78,13
Alcoóis hidratados	Metanol	32,04
	Etanol	46,07
Dióis	Etileno glicol	62,07
	Propileno glicol	76,09
Trióis	Glicerol	92,09
Poliálcoois	Manitol	182,17
	Sorbitol	
Monossacarídeos	Glicose	180,16
	Xilose	150,13
Dissacarídeos	Sacarose	342,30
	Lactose	360,31
	Trealose	378,33
Polissacarídeos	Dextrana	1-200 x 10 ⁴
	Hidroxietilamido	
Heterocíclicos	Polivinil-pirrolidona	3-36 x 10 ⁴
Proteínas/peptídeos	Albumina (soro)	66 x 10 ³

CPH.^{14, 15} Também foi demonstrado que a recuperação da hematopoese em pacientes com mieloma múltiplo e linfoma submetidos a transplante autólogo com células congeladas com Me₂SO a 5 ou 10%, sem o HEA, era idêntico, o que favoreceria a escolha da menor dose deste crioprotetor.¹⁶ Concentrações inferiores de Me₂SO, como 3,5%, associadas a outros crioprotetores (HEA) talvez possam ser utilizadas com resultados aceitáveis.¹⁷

Velocidade de congelamento

Foram desenvolvidos vários protocolos para o congelamento de produtos de CPH, que requerem o emprego de equipamentos que permitem o congelamento a temperatura programada ou congeladores mecânicos a 80°C negativos. Depois de preparada, a bolsa com a suspensão celular é colocada entre duas placas metálicas a fim de que a velocidade de congelamento seja igualmente distribuída em todo o seu volume. O conjunto bolsa/placas metálicas é então introduzido preferencialmente em equipamento para congelamento a velocidade programada. Alternativamente, como mencionado acima, ele pode ser colocado em congelador mecânico a 80°C negativos e posteriormente transferido a tanque de nitrogênio líquido (L₂N), ou então armazenado no próprio congelador a 80°C negativos, até o momento do uso. A velocidade ideal de congelamento das CPHs é de 1 a 3°C por minuto, velocidade atingida em unidades de CPH com volumes de 100-150mL quando se usa congelador mecânico a 80°C negativos.

Quando a suspensão celular é exposta a temperaturas progressivamente mais baixas (velocidade de 1-3°C por minuto), notam-se as várias fases do congelamento, que podem ser expressas na forma de uma curva de temperatura da amostra (Figura 3). A primeira fase corresponde ao início do processo de congelamento, enquanto as células ainda se encontram em suspensão. Esta fase dura até que a suspensão atinja temperatura inferior ao ponto de congelamento (em geral, inferior a 10°C negativos). Inicia-se então a segunda fase, denominada de transição, na qual ocorre aumento súbito da temperatura da amostra até que se atinja o ponto de congelamento, quando então ela se mantém por alguns minutos. Esta é uma fase considerada crítica para a viabilidade das células e parece estar diretamente correlacionada com a morte celular.¹⁸ É neste momento que ocorre a liberação do calor de fusão, durante a transformação de fase líquida em sólida. No diagrama ilustrativo do processo de congelamento, esta fase aparece com um platô. A partir de então, inicia-se a terceira fase do processo, quando a amostra já se encontra em estado sólido. Também nesta fase, parece ser importante que a velocidade de congelamento seja relativamente lenta. Velocidades de congelamento inferiores a 5°C/minuto permitem uma maior recuperação de colônias CFU-GM quando comparada com velocidade superior a 10°C.¹⁹

Concentração celular

Os produtos de CPH em geral não são submetidos a purificação antes de seu congelamento, de modo

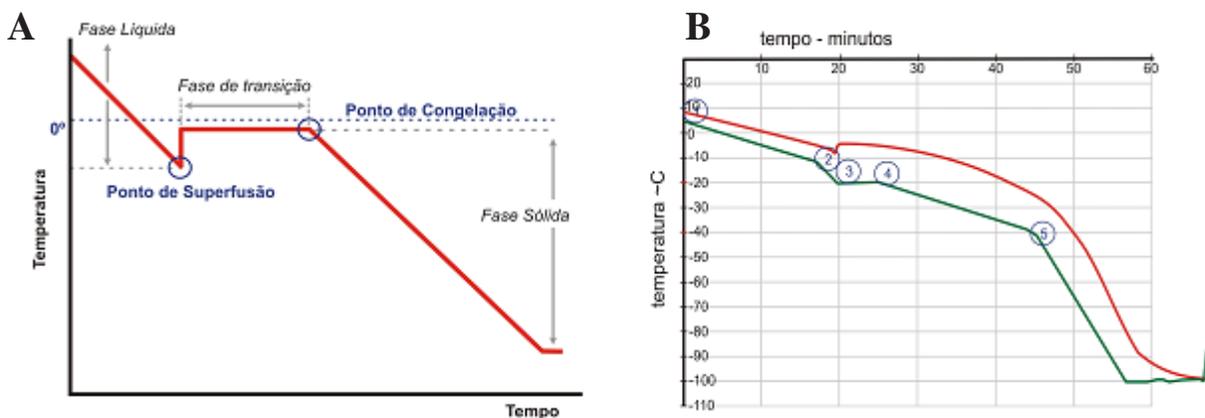


Figura 3: Curvas de temperatura durante a criopreservação da suspensão celular. A) Diagrama que exemplifica as diversas fases do processo. B) Exemplo prático de uma curva de congelamento obtida em nosso serviço.

que as CPHs se encontram misturadas com outras células obtidas por ocasião de sua coleta, e que podem exercer influência sobre o processo de criopreservação. No entanto, unidades de SCUP e MO têm costumeiramente o seu volume reduzido antes de sua criopreservação, principalmente à custa da remoção de hemácias e plasma, o que provoca aumento significativo da concentração das células nucleadas. Em contrapartida, o SP geralmente não é submetido a redução de volume e a sua concentração de células nucleadas é superior àquela observada nos dois produtos mencionados anteriormente. É interessante para os serviços de criopreservação e para os pacientes que as unidades de CPH tenham volume reduzido a fim de economizar espaço nos tanques de armazenagem e de diminuir o volume de Me_2SO infundido. Contudo, elevadas concentrações de células nucleadas poderiam comprometer a viabilidade das CPHs presentes na unidade. Rowley e colaboradores observaram que produtos de CPH poderiam ser congelados com concentração celular tão elevadas quanto $3,7 \times 10^8/\text{mL}$ sem comprometimento de sua viabilidade, verificada após o descongelamento.²⁰ Entretanto, é possível que concentrações celulares mais elevadas possam comprometer a recuperação das CPHs após o descongelamento. Ainda não está definido o limite superior de concentração celular que seja aceitável.

Armazenagem

A armazenagem das CPHs visa manter a sua viabilidade até o momento de sua administração, que pode se dar meses ou mesmo anos após a coleta. A temperatura de armazenagem deve, portanto, proporcionar bloqueio completo de todas as vias enzimáticas das células, o que equivale dizer que deve ser tão baixa quanto possível e certamente não superior a 80°C negativos. A medula óssea mantida a 196°C negativos apresenta melhor recuperação quando comparada a sua armazenagem a 79°C negativos.²¹ Por isso, a maioria dos serviços tem armazenado unidades de CPH em tanques de nitrogênio líquido, tanto na fase líquida quanto na fase de vapor, o que permite adequada recuperação das células mesmo uma década depois da sua criopreservação.^{22, 23}

É importante salientar que unidades armazenadas em congeladores mecânicos ou na fase de vapor do LN_2 podem ser expostas a temperaturas mais elevadas quando da abertura de sua tampa, que, se for frequente, pode ocasionar dano às células. Por esta

razão, sistemas fechados como aquele proporcionado pelo emprego do equipamento BioArchive, com seu processo semi-automatizado de manuseio, podem trazer vantagens significativas quanto à manutenção da viabilidade das CPHs. Contudo, sistema como este requer disponibilidade financeira muitas vezes acima das possibilidades da maioria dos serviços.

Descongelamento e infusão

O descongelamento de um produto de CPH é feito rapidamente, em geral em banho-maria durante alguns poucos minutos, até o desaparecimento visual dos cristais de gelo. A bolsa com as células deve ser envolta em protetor plástico e imersa em água aquecida a $37\text{-}40^\circ\text{C}$. Para evitar maior risco de contaminação por microrganismos eventualmente presentes na água do banho-maria, pode-se tratá-la com antisséptico iodado, ou então proceder ao descongelamento a seco, que oferece recuperação semelhante ao método mencionado acima.²⁴

A infusão de CPHs criopreservadas tem sido associada a reações adversas, em sua maioria leves e de curta duração. Entretanto, reações mais graves foram relatadas. Essas reações são atribuídas à infusão de Me_2SO , de restos celulares e ao conteúdo de células não-mononucleares presente no produto.²⁵ As reações podem ser do tipo cardiovascular e não-cardiovascular. A maioria dos pacientes apresenta náusea, calafrios, sensação desagradável em orofaringe e, mais raramente, hipotensão, dispnéia e arritmias cardíacas^{26; 27}. O Me_2SO pode induzir a liberação de



Figura 4: Exemplo de uma unidade de células hematopoéticas de sangue periférico criopreservada e acondicionada em estojo metálico.

histamina, o que explicaria a hipotensão e as reações anafiláticas que já foram associadas à sua infusão. Há pelo menos dois relatos de casos de parada cardíaca atribuídas à infusão de produtos de CPH criopreservadas^{28;29}. Também foram relatados hiperosmolaridade, elevação das aminotransferases, hemólise e complicações neurológicas^{30,31}.

A dose letal de Me₂SO para 50% dos indivíduos (DL₅₀) é de 2,5 g/Kg para cães e de 11g/Kg para macacos.³² A DL₅₀ para humanos não é conhecida, mas recomenda-se que não ultrapasse 1 g/Kg/dia. Eventualmente, pode-se fracionar as infusões em mais de um dia caso a dose de Me₂SO seja considerada elevada.³³ As reações adversas associadas à infusão de sangue de cordão umbilical parecem ser menos frequentes, pois em geral o seu volume é reduzido, de modo que a quantidade de Me₂SO e de hemoglobina livre seriam insuficientes para causar reações graves, mesmo levando-se em consideração o baixo peso do receptor, na maioria das vezes, crianças.

Uma alternativa para a profilaxia das reações adversas pode ser a lavagem da suspensão celular, que visa remover a maior parte do Me₂SO, da hemoglobina livre e dos restos celulares. Este procedimento pode ser feito pelo emprego de técnicas semi-automatizadas ou automatizadas com o auxílio de lavadoras de células^{34; 35; 36}. No CRH-HCFMRP-USP, realizamos a lavagem (semi-automatizada) na minoria das vezes, pois se trata de procedimento trabalhoso e relativamente demorado (2-4 horas). O uso de lavadoras automáticas de células proporciona uma diminuição significativa do tempo de processamento e do manuseio do produto, entretanto, resulta em maior dispêndio de recursos financeiros, pois, além do equipamento, requer o uso de *kits* descartáveis. De fato, temos observado no CRH-HCFMRP-USP uma redução significativa da incidência das reações adversas imediatas, como por exemplo, náusea/vômitos, eventuais naqueles que recebem unidades de CPH lavadas e frequentes naqueles que recebem produtos não-lavados. Também observamos redução da incidência de complicações graves. No CRH-HCFMRP-USP, dois pacientes desenvolveram insuficiência renal aguda e um outro, encefalopatia transitória após a infusão de bolsas não-lavadas, enquanto nenhuma dessas complicações foi observada no grupo de pacientes que recebeu CPHs lavadas. Não foi observada diferença entre a dose de células CD34+/Kg infundidas ou dia da enxertia de neutrófilos entre os dois grupos (Tabela 3).

Por causa das reações adversas acima mencionadas, a maioria dos serviços preconiza a administração profilática de medicamentos, dentre os quais anti-histamínicos e corticosteróides, antieméticos e antipiréticos. Além disso, e para diminuir a toxicidade potencial da hemoglobina livre, é recomendada hidratação vigorosa no dia da infusão das células. Eventualmente, em casos especiais, quando houver alta probabilidade de ocorrência de sobrecarga volêmica (infusão de medula óssea), pode ser necessário o uso de diuréticos.

Um possível problema durante a infusão das células é a formação de grumos, que podem obstruir o filtro e provocar a retenção e perda de parte das CPHs. Este fenômeno tem sido explicado como decorrente da ruptura dos granulócitos durante o processo de congelamento e descongelamento com a liberação de DNA. Para evitar ou minimizar este risco, recomenda-se a adição de solução de citrato de sódio à suspensão celular e a sua infusão relativamente rápida tão logo tenha ocorrido o descongelamento. A abstenção do uso de filtro (em geral de 170 µm) poderia evitar a retenção de parte das células, entretanto, é razoável supor que os grumos infundidos seriam direcionados à circulação pulmonar e poderiam provocar quadro de insuficiência respiratória ou contribuir para o seu agravamento.

Tabela 3

Reações adversas à infusão de CPHs lavadas e não-lavadas, dose de células CD34+/Kg infundidas e dia da enxertia de neutrófilos, observados no CRH-HCFMRP-USP.

	Não-lavadas (91)	Lavadas (19)	p
Rubor facial	56	1	0,0022
Náusea/ vômito	49	2	0,0222
Cólica	21	1	ns
Diarreia	6	0	ns
Dispneia	5	1	ns
Cefaléia	10	0	ns
I.R.A.	2	0	ns
Encefalopatia	1	0	ns
CD34 x 10 ⁶ /kg	4,63	3,63	ns
N500	10	11	ns

A infusão de CPH deve ser feita através de cateter implantado em veia central por duas razões básicas: garantir que as células de fato foram infundidas no sistema circulatório (em veia periférica nem sempre é possível ter certeza de que isso tenha ocorrido) e evitar a dor e a flebite quando a infusão é feita em veia periférica, pois a suspensão celular com Me_2SO a 10% tem alta osmolaridade. As inconveniências de usar cateter central são: infecção e trombose no lúmen do cateter, que podem ocorrer em até 50% dos casos³⁷ e acidentes decorrentes de sua implantação. Uma alternativa seria o uso de cateter central introduzido por veia periférica, o que poderia reduzir as complicações relacionadas à sua implantação, como a hemorragia.³⁸

Contaminação dos produtos de CPH

A contaminação da medula óssea, do sangue de cordão umbilical ou do sangue periférico por microrganismos pode ocorrer durante a coleta, a manipulação, a armazenagem, o descongelamento ou a infusão do produto. Em geral, o SP oferece menor risco que a MO e o SCUP, até por ser em geral menos sujeito a manipulação.

Os agentes infecciosos mais frequentemente isolados das culturas são da flora cutânea normal, como *Staphylococcus* coagulase-negativos e *Propionibacterium acnes*.³⁹ Microrganismos potencialmente patogênicos, como o *Staphylococcus aureus*, e outros menos frequentes (ex. actinomiceto) também podem ser encontrados.⁴⁰

Na maioria das vezes, o produto pode ser infundido sem cuidados especiais, na dependência do tipo de microrganismo contaminante, das condições do paciente e da falta de opções alternativas de tratamento para a doença de base. Caso o risco de sepse seja considerado elevado, pode ser útil a administração profilática de antibióticos aos quais o microrganismo seja sensível. Kelly e colaboradores observaram apenas 1,0% (15) de contaminação em 1.502 produtos de CPH (MO e SP), dos quais 11 eram cocos Gram-positivos, 2 bacilos Gram-positivos e 2 bacilos Gram-negativos. Treze pacientes foram transplantados com produtos contaminados, mas em apenas um caso atribuiu-se a bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* à inoculação pelo produto de CPH.⁴¹ Outros autores encontraram resultados semelhantes: 37 de 3.078 (1,2%) produtos de CPH contaminados por bactéria (86,5% com *Staphylococcus* coagulase-negativos) foram infundidos, mas nenhum dos recep-

tores desenvolveu infecção que pudesse ser atribuída ao inóculo.⁴² Por fim, artigo recente revelou contaminação de 1,6% (119) de produtos de CPH, mas apenas um dos receptores apresentou hemocultura positiva para o mesmo microrganismo isolado no inóculo. A sobrevida dos receptores que receberam produtos contaminados não foi diferente daquela observada nos pacientes em geral.⁴³

Criopreservação de CPH em transplante alogênico

No caso de transplante alogênico, os serviços de transplante usam mais frequentemente CPHs não-criopreservadas que, na maioria das vezes, são infundidas no mesmo dia da coleta. Esta conduta se deve à crença de que células não submetidas às potenciais lesões decorrentes do processo de congelamento e descongelamento, ofereceria melhor e mais rápida. O uso de CPHs criopreservadas permite maior flexibilidade de programação da coleta e de sua infusão. A infusão de CPHs congeladas tem sido mais frequente em dois tipos de situação: quando se considera o doador não confiável, e se teme uma eventual recusa à doação após início do condicionamento do receptor, ou por razões logísticas, relacionadas tanto ao doador quanto ao receptor, como a disponibilidade de comparecimento do doador, o local de moradia, os meios de transporte disponíveis e dentre outros.

Além destas considerações, devem-se levar em conta as possíveis diferenças biológicas entre os transplantes com CPH criopreservadas e “frescas”. Por exemplo, não se sabe ainda se há diferença quanto à composição celular entre produto criopreservado e não-criopreservado. Também não foram identificadas diferenças significativas quanto à qualidade da enxertia e à incidência e gravidade da doença do enxerto-contrá-hospedeiro (DECH). São poucos os trabalhos que comparam os resultados clínicos entre grupos de pacientes transplantados com CPHs criopreservadas e não-criopreservadas. Shinkoda e colaboradores descreveram o caso de dois irmãos, gêmeos univitelinos, que tiveram leucemia mielóide aguda com a diferença de 1 mês e ambos foram submetidos a transplante de CPHs provenientes de outro irmão HLA-idêntico, entretanto, um deles recebeu células frescas, e o outro, células criopreservadas. Não foi observada diferença quanto ao tempo de recuperação hematológica ou quanto à gravidade da DECH.⁴⁴ Como sugere o relato de casos mencionado acima, parece não haver diferença quanto à recuperação hematológica e à

sobrevida. Contudo, Eckardt e colaboradores mostraram que o grupo submetido a transplante com CPHs criopreservadas apresentou menor incidência de DECH.⁴⁵ Outros autores não confirmaram este achado. Stockschrader e colaboradores compararam os resultados obtidos com o transplante de medula óssea realizado em 80 pacientes subdivididos em dois grupos de igual tamanho amostral, sendo que um deles recebeu MO criopreservada e ou outro MO não-criopreservada. O agente crioprotetor foi o Me₂SO (concentração a 10%) e o congelamento foi feito a temperatura programada. O tempo de armazenagem teve a mediana de 17,5 dias (3-455). Os autores não observaram diferença quanto à recuperação hematólogica, à sobrevida no dia +100 ou quanto à incidência e gravidade da DECH.⁴⁶

Pacientes transplantados com medula óssea criopreservada apresentam maior incidência de reações adversas imediatas à infusão, como: náusea e vômitos, febre e calafrios, quando comparados com pacientes transplantados com medula óssea fresca. Estes sintomas foram em geral de curta duração e não relacionados a sequelas.⁴⁷ Outra complicação mais comum com o uso de medula óssea criopreservada é o maior risco de contaminação bacteriana, provavelmente pela maior manipulação do produto.⁴⁸ Entretanto, como afirmado anteriormente, acredita-se que, na maioria dos casos, a contaminação não tenha repercussão clínica.⁴⁹

Outro fator que deve ser levado em consideração no contexto do transplante alogênico é a compatibilidade ABO entre doador e receptor. É razoável supor que a incompatibilidade ABO maior possa acrescentar risco para o paciente, particularmente quanto ao comprometimento da função renal, mesmo levando-se em consideração o pequeno volume de hemácias no produto de CPH obtido por aférese. Evidentemente, quando se tratar de grandes volumes, como ocorre em transplante de células coletadas da MO, é conveniente reduzir volume de hemácias e, eventualmente, lavar a suspensão celular para remover o Me₂SO.

Criopreservação de células mesenquimais estromais multipotentes (CTM) e células-tronco embrionárias (CE)

As células mesenquimais estromais multipotentes⁵⁰ têm sido usadas clinicamente para reparar tecidos e órgãos ou como agente imunossupressor em

transplantados de CPH com DECH grave⁵¹. São poucos os estudos sobre a criopreservação desse tipo de célula, mas, aparentemente, seu comportamento não difere daquele das CPHs, de modo que as CTMs podem ser adequadamente congeladas com o emprego do Me₂SO, em geral a 10%, e manter sua capacidade de proliferação e diferenciação.⁵²

As CEs têm o potencial de proliferar indefinidamente em cultura e podem se diferenciar em qualquer tipo celular. Estas características tornam estas células particularmente atraentes para uso em medicina regenerativa, o que pode se tornar uma realidade nos próximos anos. Diferentemente das CTMs, as CEs são muito mais frágeis e sofrem danos durante o processo de congelamento e descongelamento quando empregados os protocolos em vigor para outros tipos de células nucleadas, o que torna sua recuperação inferior àquela observada com as CTMs e CPHs.⁵³ Além disso, as CEs também parecem sofrer certo grau de diferenciação induzido pelo processo de criopreservação. Acredita-se que a principal causa da morte das CEs seja a formação de cristais de gelo no citoplasma durante o processo de congelamento, o que poderia ser evitado pelo emprego do método da vitrificação.⁵⁴ Em conclusão, os protocolos de criopreservação desse tipo celular ainda não estão bem estabelecidos.

Transplante de CPHs não-criopreservadas

Como a maioria dos regimes de condicionamento requer vários dias para se completar (ex. 6 dias para o BEAM), a criopreservação das CPHs é considerada necessária para manter a sua viabilidade celular até o momento de sua infusão. Entretanto, as CPHs podem aparentemente ser armazenadas de maneira adequada, em suspensão, por até 9 dias à temperatura de 4°C,⁵⁵ principalmente se conservadas em meio de cultura.⁵⁶ Em geral, a maioria dos serviços inicia o processo de criopreservação das CPHs em até 48-72 horas de sua coleta. Contudo, alguns serviços optam por realizar transplante autólogo sem submeter as células ao processo de criopreservação, uma vez que as CPHs conservam a sua viabilidade à temperatura de geladeira por alguns dias. Esta opção tem como objetivo reduzir os custos do transplante e, desta forma, viabilizar a sua implementação. As vantagens do uso de CPHs não-criopreservadas encontram-se enumeradas na Tabela 4.

Tabela 4

Vantagens do uso de CPHs não-criopreservadas

Redução de custos
Logística simplificada
Menor manipulação do produto celular
Menor necessidade de treinamento de recursos humanos
Menor incidência e gravidade das reações à infusão
Maior facilidade de transporte e conservação
Ausência de exposição das células ao Me ₂ SO

O transplante de CPHs não-criopreservadas tem sido mais frequente em pacientes com mieloma múltiplo, pois, nesta doença, a droga mais usada para o condicionamento é o melfalan, cuja meia-vida é curta e se torna indetectável no plasma 6 horas após a sua administração. No entanto, pacientes com linfoma, leucemia aguda e tumores sólidos também já foram submetidos a transplantes bem-sucedidos com CPHs não-criopreservadas.⁵⁷

Identificação do produto

O erro de identificação do produto ou do receptor pode ter consequências catastróficas para este último, de maneira que a sua prevenção deve ser objeto de padronização e treinamento periódicos.

Para todo encaminhamento de CPH para transplante deve haver solicitação escrita, na qual devem constar informações que garantam a correta identificação do receptor e do doador (no caso de transplante alogênico), o tipo produto a transplantar (CPH-SP, CPH-MO, CPH-SCUP etc), a dose de células a infundir, o peso do receptor, a tipificação ABO e Rh do doador e do receptor e a eventual necessidade de lavagem da suspensão celular.

Para ser transportado, o produto de CPH deve ser acondicionado em recipiente rígido e próprio para tal finalidade. Este recipiente deve ser externamente

identificado por meio de um rótulo (mas sem os nomes do doador ou do receptor), além de aviso evidente que profiba a sua irradiação.

Controle de qualidade

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

Pode-se ainda realizar testes para avaliar a viabilidade das células, tanto pelo emprego de método que requer uso de citômetro de fluxo quanto pelo teste de exclusão de corante como o azul de Tripán. Este último é um método barato e de rápida aplicação. As células viáveis são capazes de excluir o corante, enquanto as células não-viáveis aparecem coradas de azul. Sua principal desvantagem é a impossibilidade de diferenciar as células mononucleares entre si, o que impede a definição exata do número de CPHs viáveis. Em contrapartida, a avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo, oferece a possibilidade de quantificá-la especificamente na célula de interesse. As desvantagens do emprego deste método são decorrentes de seus custos mais elevados e da necessidade de dispor de pessoal intensivamente treinado.

ABSTRACT

Autologous transplantation of hematopoietic progenitor cells requires most of the times the cryopreservation of the hematopoietic progenitor cells (HPC) to maintain their viability until the infusion, which can occur months to years after their collection. Adequate cryopreservation of HPC is realized by submitting the cells to slow freezing velocity (1-3°C/minute) and by employing cryoprotectant agents like the dimethylsulphoxide (Me₂SO₄), the most used, a colligative agent that reduces the free water content into the cellules and in the extracellular medium. As a consequence, this compound reduces the size and number of ice. The thawing of HPC is done rapidly. The cell suspension can then be infused unmanipulated or washed to remove Me₂SO₄, cellular debris and free hemoglobin, potentially toxic both to patients and to cells.

keywords: Progenitor Cells, Hematopoietic. Cryopreservation. Transplantation. Dimethyl Sulfoxide.

Bibliografia

1. Barnes DW, Loutit JF. The radiation recovery factor: preservation by the Polge-Smith-Parkes technique. *J. natl. cancer inst.* 1955; 15: 901-5.
2. Hubel A, Norman J, Darr TB. Cryobiophysical characteristics of genetically modified hematopoietic progenitor cells. *Cryobiology.* 1999; 38: 140-53.
3. Meryman HT. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology.* 1971; 8: 489-500.
4. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. gen. physiol.* 1963; 47: 347-69.
5. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 1949; 164: 666.
6. Lovelock JE, Bishop MWH. Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulphoxide. *Nature.* 1959; 183: 1394-5.
7. Douay L, Gorin NC, David R, Stachowiak J, Salmon C, Najman A, et al. Study of granulocyte-macrophage progenitor (CFUc) preservation after slow freezing of bone marrow in the gas phase of liquid nitrogen. *Exp. hematol.* 1982; 10: 360-6.
8. Rowley SD, Anderson GL. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone marrow transplant.* 11: 389-93, 1993.
9. Branch DR, Calderwood S, Cecutti MA, Herst R, Solh H. Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity. *Transfusion.* 1994; 34: 887-90.
10. De Santis GC, Orellana MD, Palma PVB, Silva ARL, Lemos MM, Covas DT, et al. Avaliação de toxicidade do dimetilsulfóxido sobre as células precursoras hematopoéticas (CD34+). *Ser Monogr Esc Bras Hematol* 8: 151, Supl 2001.
11. De Santis GC. Transfusão de granulócitos. *Medicina (Ribeirão Preto)* 1999; 32: 470-7.
12. Allen ED, Weatherbee L, Permod PA. Post-thaw suspension of red cells cryopreserved with hydroxyethyl starch. *Cryobiology.* 1978; 15: 375-81.
13. 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. *Blood.* 70: 974-8, 1987.
14. Donaldson C, Armitage WJ, Denning-Kendall PA, Nicol AJ, Bradley BA, Hows JM. et al. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood. *Bone marrow transplant.* 1996; 18:725-31.
15. Galmés A, Besalduch J, Bargay J, Novo A, Morey M, Guerra JM, et al. Long-term storage at -80 degrees C of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant. *Transfusion.* 1999; 39:70-3.
16. Akkök CA, Liseth K, Nesthus I, Løkeland T, Tefre K, Bruserud O, et al. Autologous peripheral blood progenitor cells cryopreserved with 5 and 10 percent dimethyl sulfoxide alone give comparable hematopoietic reconstitution after transplantation. *Transfusion.* 2008; 48: 877-83.
17. Halle P, Tournilhac O, Knopinska-Posluszny W, Kanold J, Gembara P, Boiret N, et al. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80 degrees C, with only 3.5-percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations. *Transfusion.* 2001; 41:667-73.
18. Lewis JP, Passovoy M, Conti SA, McFate PA, Trobaugh FE Jr. The effect of cooling regimens on the transplantation potential of marrow. *Transfusion.* 1967; 7:17-32.
19. Gorin NC, Douay L, David R, Stachowiak J, Parlier Y, Oppenheimer M, et al. Delayed kinetics of recovery of haemopoiesis following autologous bone marrow transplantation. The role of excessively rapid marrow freezing rates after the release of fusion heat. *Eur. j. cancer clin. oncol.* 1983; 19:485-91.
20. Rowley SD, Bensinger WI, Gooley TA, Buckner CD. Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. *Blood* 83:2731-6, 1994.
21. O'Grady LF, Lewis JP. The long-term preservation of bone marrow. *Transfusion.* 1972; 12:312-316.
22. Aird W, Labopin M, Gorin NC, Antin JH. Long-term cryopreservation of human stem cells. *Bone marrow transplant.* 1992; 9: 487-90.
23. Attarian H, Feng Z, Buckner CD, MacLeod B, Rowley SD. Long-term cryopreservation of bone marrow for autologous transplantation. *Bone marrow transplant.* 1996; 17: 425-30.
24. Röllig C, Babatz J, Wagner I, Maiwald A, Schwarze V, Ehninger G, et al. Thawing of cryopreserved mobilized peripheral blood-comparison between waterbath and dry warming device. *Cytotherapy.* 4: 551-5, 2002.
25. Milone G, Mercurio S, Strano A, Leotta S, Pinto V, Battiato K, et al. Adverse events after infusions of cryopreserved hematopoietic stem cells depend on non-mononuclear cells in the infused suspension and patient age. *Cytotherapy.* 2007; 9:348-55.
26. Alessandrino P, Bernasconi P, Caldera D, Colombo A, Bonfichi M, Malcovati L, et al. Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases. *Bone marrow transplant.* 1999; 23: 533-7.

27. Keung YK, Lau S, Elkayam U, Chen SC, Douer D. Cardiac arrhythmia after infusion of cryopreserved stem cells. *Bone marrow transplant.* 1994; 14:363-7.
28. Rapoport AP, Rowe JM, Packman CH, Ginsberg SJ. Cardiac arrest after autologous marrow infusion. *Bone marrow transplant.* 7: 401-3, 1991.
29. Zenhäusern R, Tobler A, Leoncini L, Hess OM, Ferrari P. Fatal cardiac arrhythmia after infusion of dimethyl sulfoxide-cryopreserved hematopoietic stem cells in a patient with severe primary cardiac amyloidosis and end-stage renal failure. *Ann. hematol.* 79: 523-526, 2000.
30. Samoszuk M, Reid ME, Toy PT. Intravenous dimethylsulfoxide therapy causes severe hemolysis mimicking a hemolytic transfusion reaction. *Transfusion.* 23: 405, 1983.
31. Hoyt R, Szer J, Grigg A. Neurological events associated with the infusion of cryopreserved bone marrow and/or peripheral blood progenitor cells. *Bone marrow transplant.* 2000; 25:1285-7.
32. David NA. The pharmacology of dimethyl sulfoxide. *Ann. rev.pharmacol.* 1972; 12: 353-74.
33. Martino M, Morabito F, Messina G, Irrera G, Pucci G, Iacopino P. Fractionated infusions of cryopreserved stem cells may prevent DMSO-induced major cardiac complications in graft recipients. *Haematologica* 1996; 81:59-61.
34. Beaujean F, Hartmann O, Kuentz M, Le Forestier C, Divine M, Duedari N. A simple, efficient washing procedure for cryopreserved human hematopoietic stem cells prior to reinfusion. *Bone marrow transplant.* 1991; 8:291-4.
35. Calmels B, Houzé P, Hengesse JC, Ducrot T, Malenfant C, Chabannon C. Preclinical evaluation of an automated closed fluid management device: Cytomate, for washing out DMSO from hematopoietic stem cell grafts after thawing. *Bone marrow transplant.* 2003; 31:823-8.
36. Rodríguez L, Velasco B, García J, Martín-Henao GA. Evaluation of an automated cell processing device to reduce the dimethyl sulfoxide from hematopoietic grafts after thawing. *Transfusion.* 45:1391-7, 2005.
37. Sauer-Heilborn A, Kadidlo D, McCullough J. Patient care during infusion of hematopoietic progenitor cells. *Transfusion.* 44: 907-16, 2004.
38. Harter C, Ostendorf T, Bach A, Egerer G, Goldschmidt H, Ho AD. Peripherally inserted central venous catheters for autologous blood progenitor cell transplantation in patients with haematological malignancies. *Support. care cancer.* 2003; 11:790-4.
39. Kamble R, Pant S, Selby GB, Kharfan-Dabaja MA, Sethi S, Kratochvil K, et. al. Microbial contamination of hematopoietic progenitor cell grafts-incidence, clinical outcome, and cost-effectiveness: an analysis of 735 grafts. *Transfusion.* 2005; 45:874-8.
40. Hirji Z, Saragosa R, Dedier H, Crump M, Franke N, Burrows L, et al. Contamination of bone marrow products with an actinomycete resembling *Microbacterium* species and reinfusion into autologous stem cell and bone marrow transplant recipients. *Clin. infect. dis.* 2003; 36:115-21.
41. Kelly M, Roy DC, Labbe AC, Laverdiere M. What is the clinical significance of infusing hematopoietic cell grafts contaminated with bacteria? *Bone marrow transplant.* 2006; 38:183-8.
42. Patah PA, Parmar S, McMannis J, Sadeghi T, Karandish S, Rondon G, et. al. Microbial contamination of hematopoietic progenitor cell products: clinical outcome. *Bone marrow transplant.* 2007; 40:365-8.
43. Padley DJ, Dietz AB, Gastineau DA. Sterility testing of hematopoietic progenitor cell products: a single-institution series of culture-positive rates and successful infusion of culture-positive products. *Transfusion.* 2007; 47:636-43.
44. Shinkoda Y, Ijichi O, Tanabe T, Ishikawa S, Kamitamari A, Nishikawa T, et al. Identical reconstitution after bone marrow transplantation in twins who received fresh and cryopreserved grafts harvested at the same time from their older brother. *Clin. transplant.* 18: 743-7, 2004.
45. Eckardt JR, Roodman GD, Boldt DH, Clark GM, Alvarez R, Page C, et al. Comparison of engraftment and acute GVHD in patients undergoing cryopreserved or fresh allogeneic BMT. *Bone marrow transplant.* 1993; 11: 125-31.
46. Stockschräder M, Hassan HT, Krog C, Krüger W, Lölliger C, Horstman M, et. al. Long-term follow-up of leukaemia patients after related cryopreserved allogeneic bone marrow transplantation. *Br. j. haematol.* 96: 382-6, 1997.
47. Stroncek DF, Fautsch SK, Lasky LC, Hurd DD, Ramsay NK, McCullough J. Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow. *Transfusion.* 31: 521-6, 1991.
48. Lazarus HM, Magalhaes-Silverman M, Fox RM, Creger RJ, Jacobs M. Contamination during in vitro processing of bone marrow for transplantation: clinical significance. *Bone marrow transplant.* 1991; 7: 241-6.
49. Schwella N, Rick O, Heuft HG, Miksits K, Zimmermann R, Zingsem J, et al. Bacterial contamination of autologous bone marrow: reinfusion of culture-positive grafts does not result in clinical sequelae during the posttransplantation course. *Vox sang.* 74: 88-94, 1998.
50. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005; 7:393-5.
51. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008; 371: 1579-86.
52. Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, Ohgushi H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif. organs.* 2004; 28: 33-9.
53. Heng BC, Ye CP, Liu H, Toh WS, Rufaihah AJ, Yang Z, et al. Loss of viability during freeze-thaw of intact and adherent human embryonic stem cells with conventional slow-cooling protocols is predominantly due to apoptosis rather than cellular necrosis. *J. biomed. sci.* 2006; 13: 433-45.
54. Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Hum. reprod.* 16: 2187-94, 2001.
55. Preti RA, Razi E, Ciavarella D, Fan Y, Kuhns RE, Cook P, et al. Clinical and laboratory comparison study of refrigerated and cryopreserved bone marrow for transplantation. *Bone marrow transplant.* 13:253-60, 1994.
56. Hubel A, Carlquist D, Clay M, McCullough J. Short-term liquid storage of umbilical cord blood. *Transfusion.* 2003; 43: 626-32.
57. Wannesson L, Panzarella T, Mikhael J, Keating A. Feasibility and safety of autotransplants with noncryopreserved marrow or peripheral blood stem cells: a systematic review. *Ann. oncol.* 18: 623-32, 2007.