

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA

**RECONSTITUCIÓN DE PRODUCTOS HEMATOPOYÉTICOS
CRIOPRESERVADOS:
CONTROL DE CALIDAD, ESTABILIDAD OSMÓTICA
Y LAVADO DE DMSO.**

TRABAJO DE TESIS PRESENTADO POR **LUCIANO RODRÍGUEZ GÓMEZ** PARA
OPTAR AL GRADO DE DOCTOR.

Dedicada a mi Madre.
Sin ti nunca.
Por ti siempre.

**En memoria de mi Padre, la mejor de las
personas que nunca conocí.**



Dr. Miquel RUTLLANT BAÑERAS,

Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona y director del trabajo de Tesis Doctoral titulado:

**“RECONSTITUCIÓN DE PRODUCTOS HEMATOPOYÉTICOS CRIOPRESERVADOS:
CONTROL DE CALIDAD, ESTABILIDAD OSMÓTICA Y LAVADO DE DMSO.”**

CERTIFICA,

Que el Trabajo realizado por **Luciano Rodríguez Gómez** reúne los requisitos científicos, metodológicos y formales suficientes para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Barcelona, a veintiséis de Mayo de 2005.

Dr. Miquel Rutllant Bañeras.





Dr. Sergi QUEROL GINER,

Director del Banco de Sangre de Cordón Umbilical de Barcelona y codirector del trabajo de Tesis Doctoral titulado: **“RECONSTITUCIÓN DE PRODUCTOS HEMATOPOYÉTICOS CRIOPRESERVADOS: CONTROL DE CALIDAD, ESTABILIDAD OSMÓTICA Y LAVADO DE DMSO.”**

CERTIFICA,

Que el Trabajo realizado por **Luciano Rodríguez Gómez** reúne los requisitos científicos, metodológicos y formales suficientes para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Barcelona, a veinticinco de Mayo de 2005.

Dr. Sergi Querol Giner.

Dr. Joan GARCÍA LÓPEZ,

Jefe de Servicio de Banco de Tejidos y Terapia Celular del CTBT y codirector del trabajo de Tesis Doctoral titulado: **“RECONSTITUCIÓN DE PRODUCTOS HEMATOPOYÉTICOS CRIOPRESERVADOS: CONTROL DE CALIDAD, ESTABILIDAD OSMÓTICA Y LAVADO DE DMSO.”**

CERTIFICA,

Que el Trabajo realizado por **Luciano Rodríguez Gómez** reúne los requisitos científicos, metodológicos y formales suficientes para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Barcelona, a veinticinco de Mayo de 2005.

Dr. Joan García López.



Agradecimientos.

Al Dr. Joan García por haber creído en mí, por sus impagables consejos, su mano izquierda, por no haberme dado nunca la espalda y por todas las clases gratis, incluidas las de lidia.

Al Dr. Sergi Querol sin quien hubiese sido imposible la realización de este trabajo. Por haber creado el Banco de Sangre de Cordón Umbilical, por su apoyo, su guía, sus palabras amables, su genialidad compartida altruistamente y su destreza didáctica.

Al Dr. Miquel Lluís Rutllant por aceptar ser mi director de tesis, por creer en este trabajo, su amabilidad y su capacidad resolutive.

Al Dr. Gregorio Martín Henao por estar cuando hace falta, por el ejemplo de su rigurosidad profesional, por sus clases "rápidas" pero intensas, su mirada crítica, sus consejos y por su particular y entrañable buen fondo sin formas.

A mis compañeras de laboratorio, Begoña Amill y Carmen Azqueta por haber sido maestras y amigas, por su generosa ayuda, por responder a todas mis preguntas y sobretodo por su paciencia y comprensión para conmigo.

A Carlos Torrico por el regalo de su saber hacer, su amistad sincera, su ejemplo y por haber hecho tan divertido trabajar en la unidad de terapia celular.

A Jose Antonio Sánchez por tratarme siempre bien, por ser el más humano de los revolucionarios y por su siempre ácido sentido del humor.

A Marc Rodríguez por haber sido un estímulo en esta dura recta final, por su amistad, su seriedad y sus ganas de hacer las cosas bien.

A Nuria Rotellà por sus palabras siempre amables, su eficacia profesional y el buen rollito que siempre le rodea.

A la Dra. Adela Miralles por haberme dado la primera oportunidad.

A la Dra. Pura Muñoz por enseñarme lo que no quiero ser.

Al CTBT por respaldar económicamente mi labor.

A la gente del IRO que me ayudaron, Dr. Jerónimo Blanco, Dr. Félez, Alberto, Pere, Dr. Félix Rueda, Dra. Roser López, Maribel, Fredy y todos los demás de cuyo nombre no puedo acordarme.

A mi hermana Tere por ser el espejo donde me miro y por no fallar nunca.

A Santa por hacerme la vida fácil, por calmar mi alma, por aguantar mis locuras transitorias y por el regalo de ese cariño que solo las personas que aman de verdad saben dar.

ABREVIATURAS

ACP: Agente Crioprotector.

ATP: Adenosín Trifosfato. (*Adenosin TriPhosphate*).

CFU: Unidad Formadora de Colonias. (*Colony Forming Unit*).

CMF: Citometría de Flujo.

CN: Células Nucleadas.

CNT: Células Nucleadas Totales

CPH: Célula Progenitora Hematopoyética.

CPH-A: Células progenitoras hematopoyéticas obtenidas mediante aféresis.

CSH: Células "Stem" Hematopoyética.

Dextr-Alb: Solución Dextrano-Albúmina.

DMSO: Dimetil Sulfoxido.

EICH: Enfermedad del Injerto Contra el Huésped.

FSC: Luz dispersada en la dirección de la luz incidente en un citómetro. Proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión. (*Forward SCatter*).

G-CSF: Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas. (*Granulocytic Colony Stimulating Factor*).

GM-CSF: Factor Estimulador de Colonias Granulo-monocíticas. (*Granulo Monocytic Colony Stimulating Factor*).

HES: Almidón hidroxietilado. (*HydroxyEtyl Starch*).

HLA: Antígeno leucocitario humano. (*Human Leucocyte Antigen*).

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución. (*High Performance Liquid Chromatography*).

ICT: Irradiación Corporal Total.

mL: Mililitro.

MO: Médula Ósea.

mOsm: Mili Osmoles.

PBA: Solución de PBS con Albúmina.

PBS: Suero Salino Tamponado con Fosfatos. (*Phosphate Buffered Saline*).

PM: Peso Molecular.

QC: Control de Calidad. (*Quality Control*).

SCU: Sangre de Cordón Umbilical.

SP: Sangre Periférica.

SSC: Luz dispersada en ángulo recto respecto a la luz incidente en un citómetro. Proporcional a la complejidad de la estructura interna de la partícula que produce la dispersión. (*SideSCatter*).

TB: Azul Tripano. (*Trypan Blue*).

TMO: Trasplante de Médula Ósea.

TPH: Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos.

µL: Microlitro

7AAD: 7-Aminoactinomicina-D. (*7 Amino Actinomycin-D*).

Antecedentes y justificación.

La logística de un TPH incluye en la mayoría de casos (TPH autólogo y de SCU), una etapa de criopreservación a temperaturas de -196°C . Las técnicas de congelación más extendidas utilizan DMSO como crioprotector para optimizar la viabilidad y funcionalidad de las células reduciendo la proporción de agua congelada y la deshidratación intracelular durante el proceso de congelación.

La presencia del crioprotector hace que las suspensiones celulares descongeladas sean hipertónicas y como las células responden importando y exportando agua frente a un cambio de osmolaridad, el retorno a condiciones isotónicas puede resultar en la superación de los límites mecánicos de las membranas plasmáticas por una entrada masiva de agua al citoplasma (choque osmótico). Este fenómeno es de especial importancia durante la reconstitución y manipulación de células descongeladas debido a que la membrana celular es un conjunto de lípidos y proteínas organizados que por debajo de los 20°C pierde fluidez, limitando su resistencia y por tanto su capacidad de respuesta osmótica.

En 1978 Goldman⁹⁵ publicó las primeras evidencias del fenómeno de choque osmótico sobre la reducción de capacidad clonogénica en MO descongelada. Sin embargo, este trabajo no ha tenido una gran repercusión en los protocolos de criopreservación seguramente porque el número de CPH en MO y en CPH-A está por encima del umbral mínimo definido para uso clínico. Esta situación cambia en el momento que la SCU se define como fuente de células progenitoras debido a su limitada proporción en estos productos. Así, en 1995 Rubinstein¹³⁹ reabre el debate de la relevancia del choque osmótico en productos hematopoyéticos descongelados e introduce la estabilidad osmótica previa a la infusión para reducir el efecto del cambio brusco de osmolaridad durante el retorno a condiciones isotónicas.

Para la práctica diaria de un laboratorio de procesamiento celular, y por extensión para el equipo clínico de trasplante, el choque osmótico afecta a los controles de calidad del descongelado si estos incluyen manipulaciones que impliquen cambios bruscos de osmolaridad. En este sentido, un caso muy llamativo es el de la CMF, no en vano, casi ningún laboratorio realiza este tipo de análisis en muestras descongeladas debido seguramente a la falta de correlación con los datos precongelación.

Más alarmante es el hecho de que la infusión directa de los inóculos descongelados pueda ser también una fuente de choque osmótico que comprometa la viabilidad celular resultando, en el caso de TPH con dosis límite de CPH y/o CNT, determinante para el éxito de la recuperación hematopoyética.

En este ámbito se ha desarrollado el trabajo experimental de esta Tesis Doctoral que proporciona evidencias, cuantifica el efecto del choque osmótico en los controles de calidad de productos hematopoyéticos descongelados, propone un método de CMF para su análisis y valida dos sistemas automáticos aptos para la clínica que rinden productos estabilizados osmóticamente, listos para trasplante y sin pérdida celular ni de viabilidad significativas.

INTRODUCCIÓN

I- PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

I.1- Hematopoyesis.	1.
I.2- El Trasplante Hematopoyético.	
I.2.1- Historia del TPH.	4.
I.2.2- Tipos de TPH	
I.2.2.A) Según el tipo de donante.	6.
I.2.2.B) Según la procedencia de las CPH.	7.
I.2.3- Etapas del TPH.	8.
I.2.4- Fuentes de CPH.	
I.2.4.A) Médula ósea.	9.
I.2.4.B) Sangre Periférica Movilizada.	9.
I.2.4.C) Sangre de Cordón Umbilical.	10.

II- CRIOBIOLOGÍA Y PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

II.1- La membrana plasmática.

II.1.1- Estructura de la membrana.	12.
II.1.2- Composición de la membrana.	13.
II.1.3- Empaquetamiento de los lípidos de membrana.	15.

II.2- Respuesta celular a las bajas temperaturas.

II.2.1- Conceptos generales.	16.
II.2.2- Difusión y Ósmosis.	18.
II.2.3- Osmolaridad, Osmolalidad.	19.

II.3- Criopreservación celular.

II.3.1- Conceptos generales.	
II.3.1.A) Congelación.	22.
II.3.1.B) Descongelación.	24.
II.3.2- Concentración celular durante la congelación de CPH	26.
II.3.3- Lesiones crioaducidas.	

II.3.3.A) Formación de hielo.	28.
II.3.3.A.1) Hielo extracelular.	29.
II.3.3.A.2) Hielo intracelular.	30.
II.3.3.B) Estrés osmótico.	31.
II.3.4- Crioprotectores.	33.
II.3.4.A) DMSO.	35.
II.3.4.B) Toxicidad del DMSO.	
II.3.4.B.1) Toxicidad química.	36.
II.3.4.B.1) Toxicidad asociada a la infusión	36.
II.3.5- Respuesta osmótica de las CPH.	
II.3.5.A) Parámetros biofísicos.	38.
II.3.5.B) Respuesta volumétrica celular.	
II.3.5.B.1) Adición del crioprotector.	40.
II.3.5.B.1) Extracción del crioprotector	41.
II.3.5.C) Retorno a condiciones fisiológicas.	42.
II.3.5.D) Lavado celular post descongelación.	43.
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	44.
MATERIAL Y MÉTODOS.	
I- SOLUCIONES.	45.
II- CITOMETRÍA DE FLUJO.	48.
III- CONTADOR AUTOMÁTICO.	51.
IV- DETERMINACIÓN DE DMSO POR HPLC.	53.
V- SISTEMAS AUTOMÁTICOS DE LAVADO DE DMSO EN DESCONGELADOS.	
V.1- Cytomate.	56.
V.2- Sepax S-100.	60.

RESULTADOS

I- EVIDENCIA DE LA PÉRDIDA CELULAR TRAS DESCONGELACIÓN Y DILUCIÓN ISOTÓNICA. EFECTO EN LOS PROTOCOLOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO SOBRE CÉLULAS DESCONGELADAS.

I.1- Recuperación celular tras dilución directa del descongelado en PBS.	63.
I.2- Efecto de la dilución en PBS sobre el recuento y viabilidad celular.	64.
I.3- Pérdida celular en el control de calidad por citometría de flujo.	65.

Manuscrito nº 1: Luciano Rodríguez, Joan García, Sergi Querol. "Predictive utility of the attached segment in the quality control of a cord blood graft". *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. **11:247-251.2005.**

II- PREVENCIÓN DEL CHOQUE OSMÓTICO SOBRE CÉLULAS DESCONGELADAS.

II.1- Prevención del choque osmótico postdescongelación mediante la adición de proteína y macromoléculas a los medios de dilución.

II.1.1- Recuperación de CNT en SCU descongelada.	71.
II.1.2- Viabilidad de CNT en SCU descongelada.	72.
II.1.3- Solución Dextrano-Albúmina.	73.
II.1.4- Recuperación de CNT en CPH-A descongelada.	75.
II.1.5- Recuento y viabilidad de células CD34+ en SCU descongelada.	76.
II.1.6- Recuento y viabilidad de células CD3+ en SCU descongelada.	78.
II.1.7- Recuperación de colonias clonogénicas en SCU descongelada.	80.

II.2- Prevención del choque osmótico postdescongelación mediante la aplicación de una etapa de equilibrio osmótico previa a la dilución isotónica..... 83.

II.2.1- La etapa de equilibrio confiere estabilidad frente a un cambio brusco de osmolaridad.	
II.2.1.1- Recuento de células CD34+ en CPH-A descongeladas.	84.
II.2.1.2- Viabilidad de células CD34+ en CPH-A descongeladas.	87.
II.2.2- Introducción de la etapa de equilibrio en la determinación citométrica de células descongeladas.	
II.2.2.1- Recuento de células CD3+ en SCU descongelada.	90.
II.2.2.2- Recuento de células CD3+ en CPH-A descongeladas.	92.
II.2.2.3- Viabilidad de células CD3+ en SCU descongelada.	95.

III- APLICACIÓN CLÍNICA DE LA PREVENCIÓN DEL CHOQUE OSMÓTICO SOBRE PRODUCTOS HEMATOPOYÉTICOS DESCONGELADOS MEDIANTE ESTABILIZACIÓN OSMÓTICA.

III.1- Aplicación a una técnica de citometría de flujo para la determinación de la calidad de un producto hematopoyético descongelado. 98.

III.1.1- Validación de la técnica citométrica.

 III.1.1.1- Reproducibilidad de la técnica. 99.

 III.1.1.2- Coeficiente de variación de la técnica. 101.

III.1.2- Influencia del tiempo de equilibrio en la técnica citométrica. 103.

III.1.3- Recuperación celular mediante la técnica citométrica propuesta. 106.

III.2- Aplicación a las técnicas de preparación de productos hematopoyéticos descongelados para uso clínico. 108.

III.2.1- Estabilización osmótica de SCU descongelada mediante la automatización del lavado de DMSO post descongelación. 109.

Manuscrito nº 2. Luciano Rodríguez, Carmen Azqueta, Stefano Azzalin, Joan García, Sergi Querol. "Washing of cord blood grafts after thawing: high cell recovery using an automated and closed system". Vox Sanguinis (2004) .87. 165-172.

III.2.2- Estabilización osmótica de CPH-A descongelada mediante la automatización del lavado de DMSO post descongelación. 118.

Manuscrito nº 3. Luciano Rodríguez, Beatriz Velasco, Joan García, Gregorio Ángel Martín-Henao. "Evaluation of an automated cell processing device to reduce the dimethyl sulfoxide from hemopoietic grafts after thawing. Transfusion 2005.

RESUMEN DE RESULTADOS. 135.

DISCUSIÓN. 139.

CONCLUSIONES. 151.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. 153.

INTRODUCCIÓN.

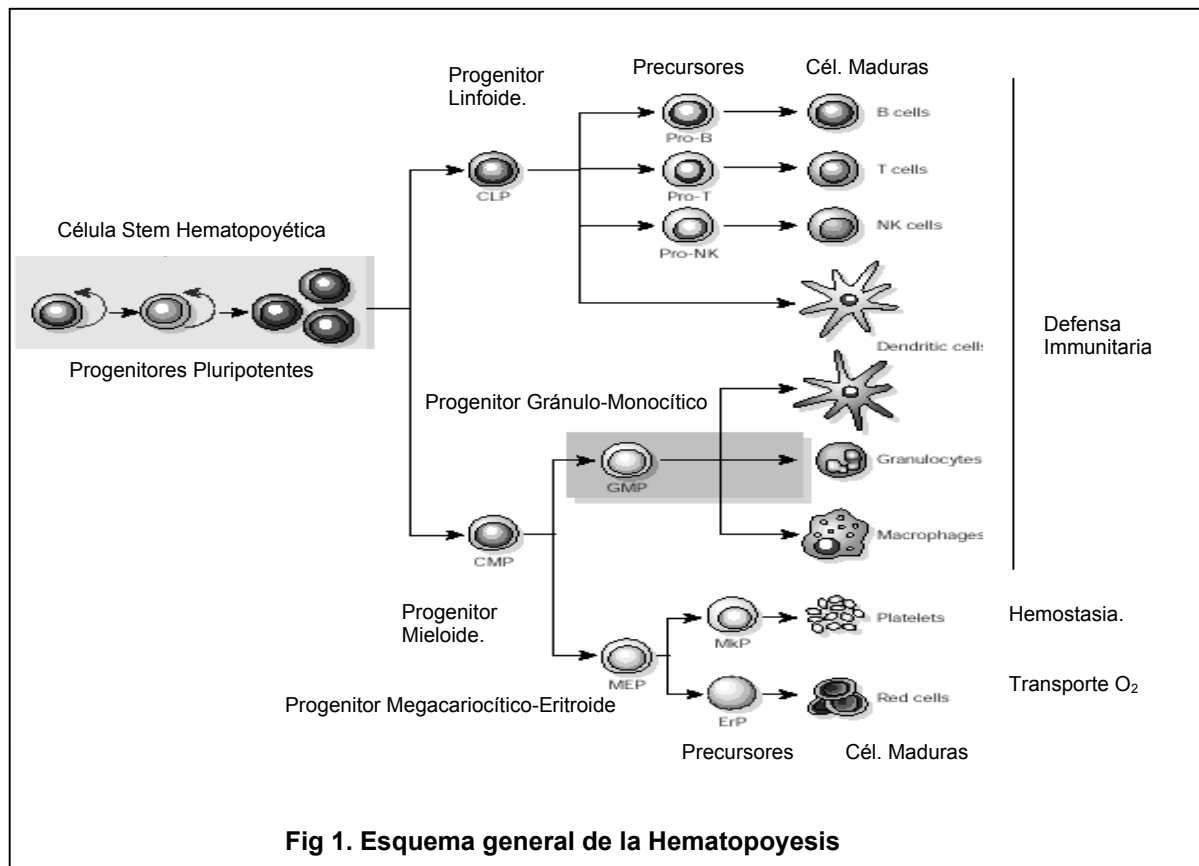
I

PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

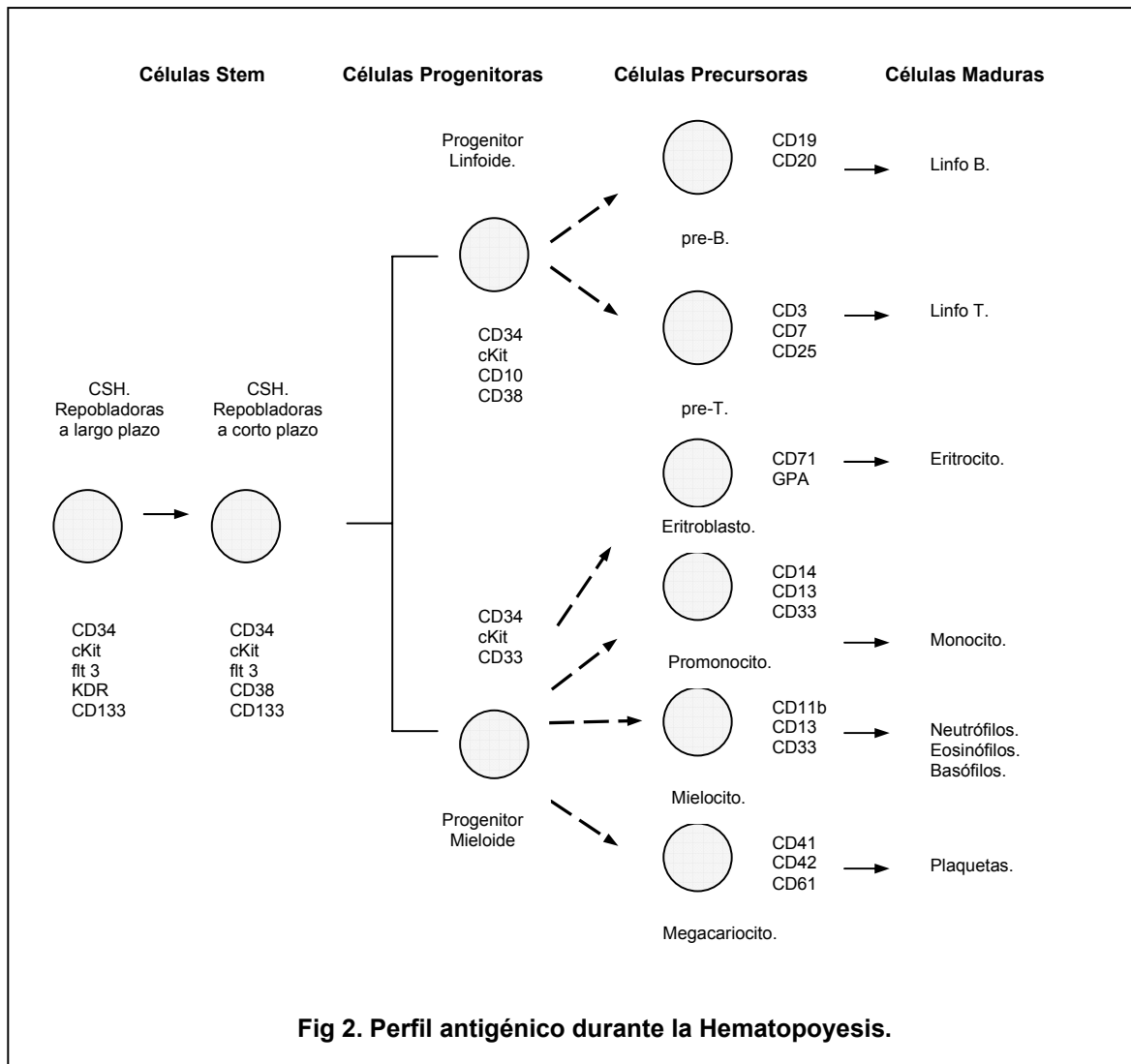
I.1- HEMATOPOYESIS.

La hematopoyesis es el proceso por el que las células madre pluripotentes proliferan y se diferencian, de forma ordenada y controlada, para generar células progenitoras, precursoras y maduras (Fig 1). Las células hematopoyéticas, independientemente de su linaje, linfoide o mieloide, derivan de un único progenitor pluripotente común (célula “stem”, troncal o madre, hematopoyética; CSH) que es capaz de autorenovarse así como de diferenciarse progresivamente ¹.

La transición desde el compartimento “stem” hasta el de célula progenitora (compromiso de linaje) se asocia a una disminución de las capacidades de autorenovación y proliferación, que se pierden cuando la célula progenitora se compromete a un linaje concreto (pérdida de capacidad de autorenovación) o inicia su maduración (pérdida de capacidad de proliferación) hacia un tipo celular hematopoyético concreto como el de granulocito, monocito, célula B, T, etc. El compartimento de células progenitoras está formado por células con una capacidad de diferenciación más limitada, en su mayoría hacia un linaje (unipotencial) y, menos frecuentemente, hacia dos (bipotencial) o más (multipotencial).



Durante el proceso de diferenciación desde el compartimento de células “stem” hasta el de células progenitoras y desde este hasta al de células precursoras y maduras, las células van modificando su perfil antigénico, perdiendo algunos antígenos específicos del comportamiento pluripotencial y ganando otros asociados a linajes celulares específicos (Fig 2). Así, las células progenitoras hematopoyéticas más inmaduras expresan el antígeno CD34 que pierden al adquirir otros que marcan su compromiso a un linaje determinado ^{2,3}.



En la vida adulta y en situación basal la hematopoyesis está restringida a la médula ósea, en los senos venosos de la endocortical, donde las CSH y las CPH interactúan con los diferentes componentes del microambiente medular. Dicho ambiente está formado por un grupo heterogéneo de células estromales (fibroblastos, adipocitos, células reticulares), macrófagos, componentes de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, laminina, proteoglicanos) y factores de crecimiento y citoquinas hematopoyéticas. ⁴⁻⁶.

Así, la hematopoyesis puede considerarse un proceso regulado por señales donde intervienen las CPH y el microambiente medular. Estas interacciones incluyen: interacciones generadas por las CPH y la matriz extracelular e interacciones de las CPH y las células estromales, ambas mediadas por moléculas de adhesión, así como interacciones reguladas por los factores de crecimiento hematopoyético y citoquinas que se unen a los receptores expresados en las CPH. La acción concertada de las citoquinas y las moléculas de adhesión determinan la supervivencia, proliferación, compromiso a linaje y diferenciación de las CSH y de las CPH ^{7,8} (Fig 3).

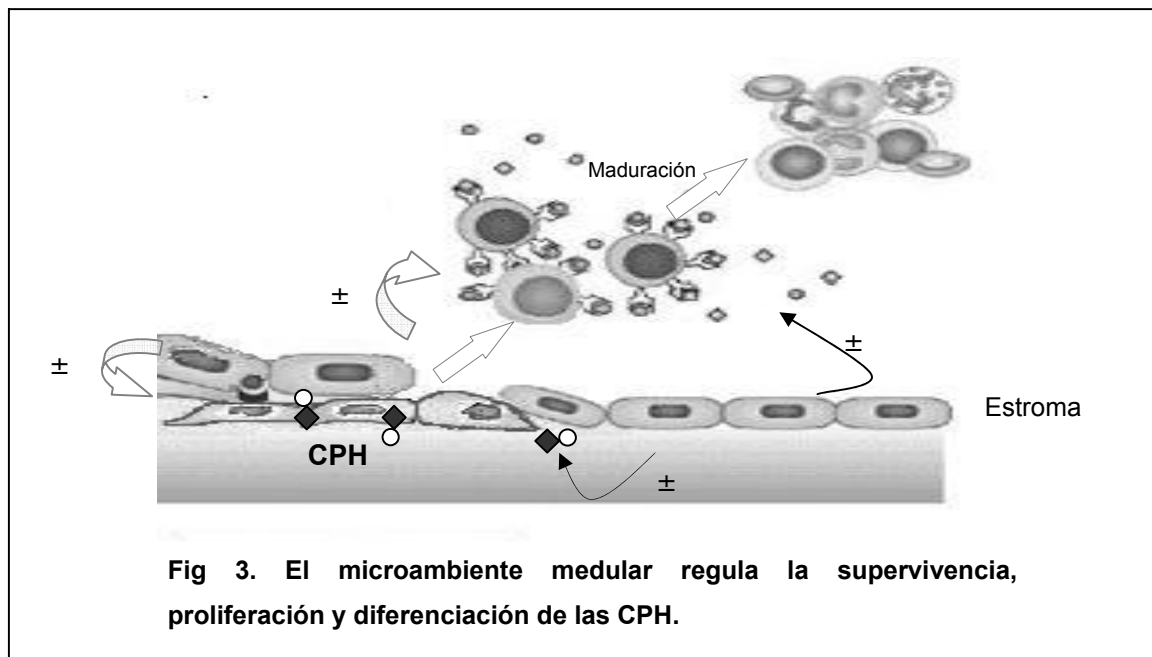


Fig 3. El microambiente medular regula la supervivencia, proliferación y diferenciación de las CPH.

I.2- EL TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICO.

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) es un procedimiento terapéutico de introducción relativamente reciente en la práctica clínica y, por este motivo, sigue en plena evolución⁹. El TPH tiene dos posibles objetivos; 1) la sustitución de la hematopoyesis del paciente por ser total o parcialmente defectuosa, insuficiente o neoplásica y 2) permitir la recuperación hematopoyética de un paciente que ha recibido un tratamiento antineoplásico en dosis elevadas que originan mielosupresión prolongada o definitiva. Adicionalmente, en el TPH a partir de progenitores de un paciente sano, la celularidad inmunocompetente derivada del injerto es capaz de producir una reacción contra la neoplasia, habitualmente leucemia. Es decir, que es capaz de contribuir al efecto antitumoral principalmente en situación de enfermedad mínima residual^{9,10}.

Tras las primeras experiencias realizadas por E. Donnall Thomas en la década de los 50 - 60 (por lo que recibió el premio Nobel de Medicina en 1990), el TMO comenzó su expansión en los años 70 para experimentar un espectacular desarrollo en la década de los 80 y 90. En el año 2003 se realizaron 30000 TPH en el mundo¹¹ de los cuales 1935 se realizaron en España¹². En la actualidad el TPH se ha expandido a un amplio grupo de modalidades terapéuticas al ampliar las fuentes de obtención de las células progenitoras hematopoyéticas. Así, si en los inicios las CPH se obtenían siempre de MO, actualmente se pueden emplear como material a trasplantar la SP movilizada o la SCU^{9,13-15}. Por tanto, el término TPH o el de trasplante hematopoyético es más correcto que el clásico de TMO.

I.2.1 Historia del TPH

Los experimentos en ratones en los que se basó el TMO humano se efectuaron hace más de 40 años, aunque en el siglo pasado (1891) Brown ya había administrado MO a sus pacientes por vía oral como tratamiento para trastornos hematológicos¹⁶.

En 1939, Rasjek y Osgood administraron a sus pacientes MO (intramedular y endovenosa) para tratar leucemias y aplasia medular. En este mismo año se realizó el primer intento de recuperación hematopoyética administrando transfusiones en un paciente con anemia aplásica utilizando una pequeña cantidad de MO de su hermano pero sin ningún tratamiento condicionante previo¹⁷.

En 1949 Jacobson demostró que los ratones irradiados letalmente podían recuperar su hematopoyesis si se protegía el bazo de las radiaciones, lo que demostraba el papel de este órgano como parte del sistema hematopoyético¹⁸. Posteriormente, cuando se identificó la aplasia medular en la población japonesa expuesta a los efectos radiactivos de las explosiones de las bombas atómicas como una causa importante de muerte, se aceleraron las investigaciones en animales relacionadas con la cantidad de irradiación corporal necesaria para provocar aplasia medular, y se establecieron las bases

para una aplicación clínica más racional del TMO. Poco tiempo después, en 1951, Lorenz describió que la infusión de células de la MO de un ratón a otro, podía rescatar la aplasia producida por irradiación letal^{19,20}. Sin embargo, los intentos iniciales de aplicar esta metodología a pacientes hematológicos graves fueron un fracaso porque se desconocía la importancia de la similitud de los antígenos de histocompatibilidad así como la necesidad de tratamiento inmunosupresor intenso.

En 1954, Miescher y Fauconnet describieron que los anticuerpos inducidos por transfusiones y embarazos reaccionaban con los antígenos presentes en los leucocitos humanos²¹. Más tarde, en 1958, Dausset y Van Rood utilizaron estos anticuerpos para describir los grupos de antígenos de leucocitos humanos (HLA)^{22,23}.

En los años 50 se realizaron casi 200 trasplantes alogénicos de MO en humanos sin éxito a largo plazo pero se obtuvieron resultados prometedores con el trasplante de gemelos idénticos que se utilizaron como base para el desarrollo del TPH^{24,25}.

En 1959 se utilizaron dosis letales de irradiación corporal total (ICT) y la MO de un gemelo idéntico para tratar a dos pacientes con leucemia linfocítica aguda avanzada y aunque se observó recuperación hematopoyética en algunas semanas, los pacientes murieron de enfermedad progresiva^{26,27}.

En 1969, Santos y Owens comunicaron que la ciclofosfamida (CFM) era un potente inmunosupresor en modelos murinos²⁸. La CFM era conocida por su efecto antileucémico y fue administrada (60 mg/kg) por el grupo de Seattle durante 2 días antes de administrar la ICT obteniendo así los primeros receptores con supervivencia a largo plazo.

El primer intento de trasplante alogénico de MO en humanos se llevó a cabo en 1957 por E. Donnall Thomas²⁹ y a finales de los 60 ya existía un soporte adecuado de plaquetas, una mejoría en el tratamiento antibiótico y un desarrollo mayor de agentes antineoplásicos.

Los primeros trasplantes alogénicos exitosos se realizaron en 1968 y 1969 con 2 pacientes con inmunodeficiencias congénitas y uno con enfermedad de Wiskott Aldrich que sobrevivieron al TPH^{30,31}.

Los primeros trasplantes autólogos en humanos se realizaron en 1950 por Kurnick³² y por McGovern en 1959³³. Estos implantes parecían proteger contra la toxicidad medular pero su beneficio clínico era incierto debido a que no se erradicaba la enfermedad de base. Finalmente, el trasplante autólogo fue utilizado con éxito en pacientes con linfomas en los años 70 y su uso se amplió en todo el mundo en la década de los 80³⁴.

El trasplante de Sangre Periférica se inició en 1962, cuando Goodman y Hodgson demostraron la existencia de CPH en la sangre de los ratones ³⁵. Esta fuente de CPH se comenzó a utilizar en pacientes en los que no se podían obtener células progenitoras medulares por su enfermedad de base o por la irradiación previa, y su uso se amplió después de descubrir que los factores de crecimiento hematopoyéticos causaban una liberación transitoria de CPH en la SP. De esta forma, en 1981 se introdujo la SP como fuente de CPH ³⁶.

La demostración de la presencia de CPH en el sangre de cordón umbilical (SCU) sugirió el uso de estas células para la realización de los TPH y el primer trasplante exitoso se publicó en 1989 ³⁷. Sin embargo, el primer uso terapéutico de SCU se realizó en 1970 a un joven de 16 años que recibió ocho unidades de SCU de ocho donantes diferentes en el transcurso de 18 días, solo injertó una unidad (38 días postrasplante) y el paciente se mantuvo en remisión completa con el mantenimiento de la quimioterapia (Prednisona y 6-mercaptopurina) durante nueve meses ^{38,39}.

Debido a la poca probabilidad de encontrar un donante familiar compatible, se realizaron los primeros TPH no relacionados en los años 70 ⁴⁰. La heterogeneidad del sistema HLA hizo necesaria la realización de grandes paneles de donantes hasta la existencia hoy de un registro internacional de donantes no familiares basado en la existencia de bancos de sangre de cordón umbilical.

Una de las hipótesis para realizar los TPH en las leucemias es que la curación depende en gran medida del efecto injerto contra la leucemia, más que del régimen de acondicionamiento, y por lo tanto es posible lograr un control de la enfermedad a largo plazo con regímenes menos agresivos. Esto sentó las bases para la introducción en la década de los 90, del trasplante no mieloablativo o también llamado "mini-trasplante" ⁴¹⁻⁴³

A continuación se revisan de forma esquemática algunos conceptos relacionados con el TPH:

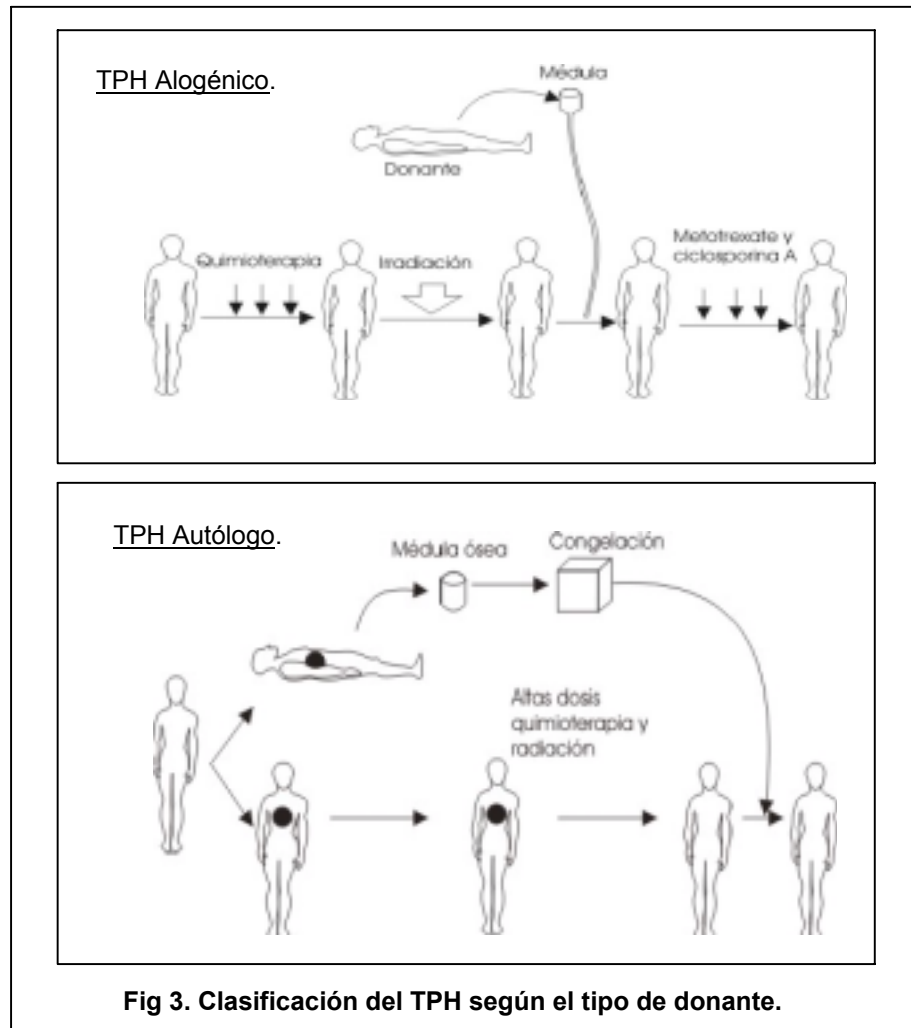
I.2.2 Tipos de TPH ^{9,44,45,46}

I.2.2.A) Según el tipo de donante ⁴⁷ (Fig 3) :

I) Autólogo (autogénico, autotrasplante): Si los progenitores son obtenidos del propio paciente con anterioridad al tratamiento antineoplásico en dosis altas.

II) Singénico o isogénico: a partir de un gemelo univitelino.

III) Alogénico: individuos de la misma especie, distintos a gemelo univitelino. 1) Emparentado: donante familiar, habitualmente HLA idéntico. 2) No emparentado: donante no familiar, no HLA idéntico.



I.2.2.B) Según la procedencia de las CPH:

- i) Trasplante de médula ósea: obtenido mediante aspirados medulares múltiples en crestas ilíacas posteriores, anteriores, esternón o meseta tibial.
- ii) Trasplante de progenitores obtenidos de SP: obtenidos mediante procedimientos de aféresis, después de la movilización de precursores hemopoyéticos hacia sangre periférica mediante diferentes técnicas.
- iii) Trasplante de progenitores obtenidos a partir de SCU: se recogen mediante punción de la vena umbilical inmediatamente después del parto.

I.2.3 Etapas del TPH ⁹:

i) Acondicionamiento: consiste en la administración de altas dosis de quimioterapia, radioterapia, o ambas, simultánea o secuencialmente, con el objetivo de: 1) Eliminar las células hemopoyéticas y tumorales del receptor. 2) Crear espacio medular para la posterior proliferación de los precursores trasplantados. 3) Inmunodeprimir al paciente para reducir al mínimo el riesgo de rechazo en el caso de alotrasplante (Fig 3).

ii) Obtención de los precursores hemopoyéticos: en el caso del autotrasplante deben obtenerse con anterioridad al acondicionamiento, conservándose congelados. En el caso de alotrasplantes, lo más habitual, es obtenerlos el mismo día del trasplante.

iii) Manipulación ex vivo del inóculo: tiene diferentes objetivos, eliminar las posibles células neoplásicas en el caso del autotrasplante, eliminar los linfocitos T para reducir el riesgo de EICH, aumentar el número de precursores mediante técnicas de expansión, en el caso de alotrasplante con incompatibilidad mayor ABO, eliminar los hematíes.

iv) Infusión de los precursores hemopoyéticos: administración mediante catéter central. El día que se infunden los progenitores se conoce con el nombre de día 0.

v) Fase aplásica: en esta fase es preciso adoptar las medidas necesarias para evitar, o al menos disminuir en lo posible, las complicaciones derivadas del tratamiento de acondicionamiento, fundamentalmente complicaciones de índole infeccioso o hemorrágico. Esto se consigue mediante el empleo de antibioterapia, antifúngicos, fármacos antivirales, administración de concentrados de plaquetas y de hematíes.

vi) Recuperación hematológica: suele iniciarse en el día +10 - +14, evidenciándose células hematopoyéticas en MO y comenzando el ascenso de las cifras de reticulocitos, leucocitos y plaquetas. Esta recuperación suele ser más precoz cuando se emplea como fuente de trasplante los progenitores obtenidos a partir de sangre periférica que cuando el producto empleado es médula ósea. En el momento que se inicia la recuperación hematológica es cuando pueden evidenciarse los primeros signos y síntomas de EICH.

vii) Reconstitución inmune: durante los primeros 6 meses postrasplante hay disminución de las células CD4+ y respuesta deficiente de los linfocitos T. Las IgE aumentan en las primeras 3-4 semanas postrasplante, siendo deficitarias en IgG e IgA durante al menos 6 - 18 meses.

I.2.4 Fuentes de Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH).

I.2.4.A) MÉDULA ÓSEA.

La mayoría de las CPH residen en la médula ósea y por tanto esta ha sido tradicionalmente la fuente de estas células para trasplante. En circunstancias normales un 1% - 3% de las células de la médula pueden ser CD34+ pero cuando la médula es aspirada, un rango del 25% al 75% del material aspirado es sangre periférica, haciendo que el recuento de células CD34+ sea significativamente dependiente de la calidad del producto recogido ⁴⁸.

En la práctica clínica la extracción de médula se realiza con el objetivo de recolectar un volumen determinado o una dosis de células nucleadas totales (CNT) más que buscando un número total de células CD34+, esto porque el tiempo necesario para analizar las células y el hecho de que la dosis de CD34+ es muy variable hace que este (nº de CD34+) no sea un parámetro práctico para definir la extracción. Generalmente se extraen unos 10 mL / kg de peso de recipiente con una dosis de $1 - 4 \times 10^8$ CNT / kg. Esta cantidad representa el 1% - 5% del volumen total de la médula y no resulta en una alteración de los recuentos de leucocitos o plaquetas en el donante ⁴⁸. Se estima que esta fuente de progenitores proporciona unos 3×10^6 CPH / kg paciente.

I.2.4.B) SANGRE PERIFÉRICA MOVILIZADA.

Las CPH también circulan por sangre periférica pero en cantidades muy pequeñas, 0.5 - 5 CD34+ / μ L., sin embargo estas células pueden mobilizarse después de la administración de quimioterapia. El grado de movilización parece correlacionar con el grado de mielosupresión y se utilizan agentes con poca toxicidad a largo plazo sobre las CPH como la ciclofosfamida o el etopóxido. De forma similar, factores de crecimiento hematopoyéticos como el G-CSF o el GM-CSF son muy efectivos movilizando (20-100 veces la concentración basal) las CPH a sangre periférica. Existen diversos factores que influyen sobre la movilización como la enfermedad de base del paciente, la presencia de tumor o fibrosis en la médula y el historial de radiación pélvica y de quimioterapia del paciente.

Las CPH sangre periférica se recolectan con el objetivo de obtener un recuento concreto de células mononucleares o de una dosis de CD34+ /kg. El número preciso de estos varía según el centro y con el tipo de trasplante pero una media sería de $2 - 8 \times 10^6$ CD34+ / kg de receptor aunque algunos estudios sugieren que dosis mayores de 5×10^6 CD34+ / kg injertan con más rapidez. Además, si se contempla algún tipo de manipulación posterior (selección positiva, purgado celular) la dosis a recolectar deberá ser mucho mayor.

Aunque se ha propuesto que las CPH de sangre periférica se encuentran en un estado más diferenciado que las CPH de MO, han demostrado una ventaja significativa en términos de rapidez de injerto en el trasplante autólogo⁴⁹. Su capacidad de implante a largo término es incluso mayor que el de las CPH de MO. Además, en el trasplante autólogo, las CPH de sangre periférica presentarían una ventaja más respecto a las de médula como es la posibilidad de presentar menos contaminación de células tumorales aunque este es un punto de discusión y existen referencias bibliográficas a favor y en contra.

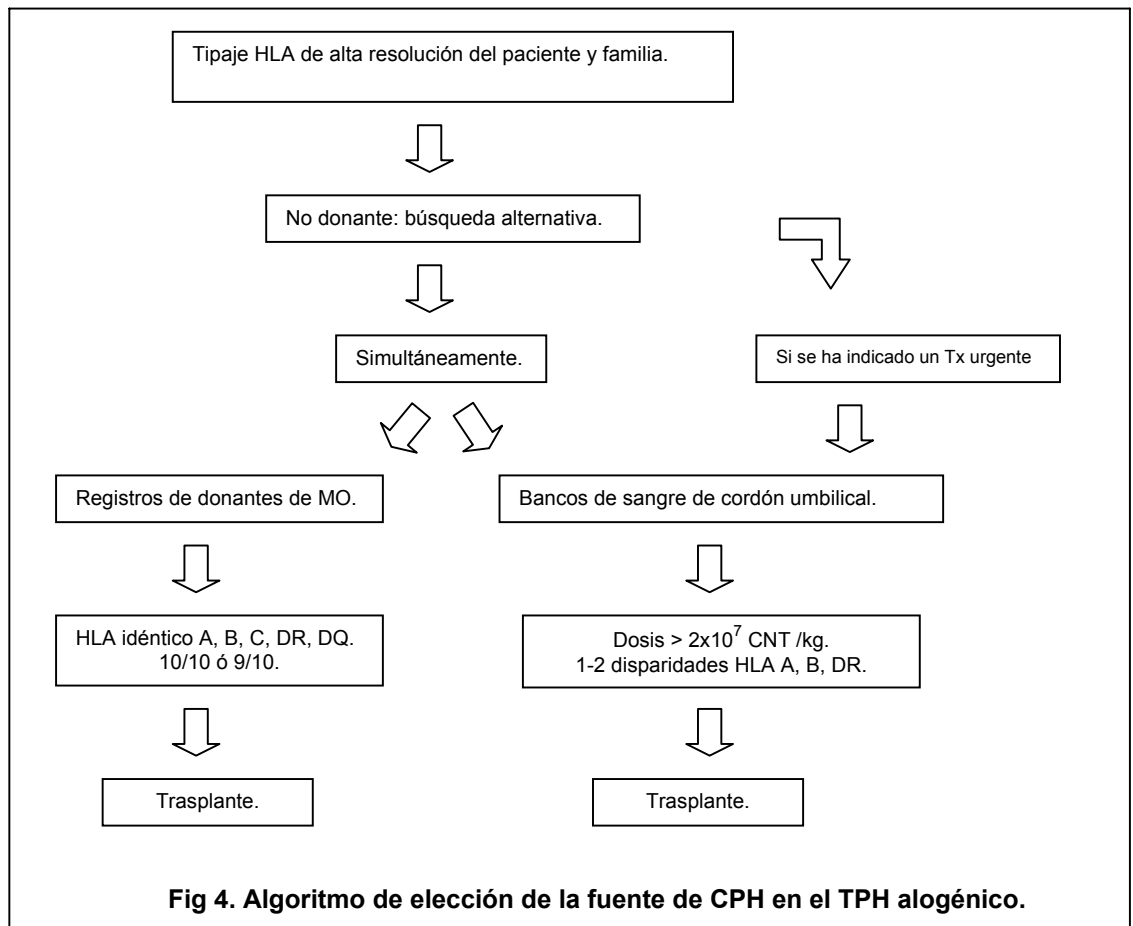
En el contexto del trasplante alogénico la presencia de linfocitos T en los productos de CPH-A, que inician y mantienen la EICH, elevan la probabilidad de una EICH severa postrasplante, principal complicación de este tipo de trasplante. Aunque en realidad es posible trasplantar CPH-A no manipuladas en el contexto alogénico con una incidencia y severidad aceptables de EICH, no existen datos suficientes a largo plazo como para asegurar que esta fuente de progenitores sea mejor o peor que la médula en aloinjertos^{50,51}.

I.2.4.C) SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL.

La falta de donantes HLA-idénticos y el hecho de que la incidencia de EICH aumente con la disparidad HLA entre donante y receptor limitan la ampliación de la aplicación clínica del TPH. En este sentido, la sangre de cordón umbilical (SCU) como fuente de CPH ha representado un avance significativo en el contexto del TPH alogénico en el que la probabilidad de obtener un producto HLA-idéntico de un hermano/pariente es del 30%⁵² y de un donante no relacionado es del 50% - 70% (calculado entre un pool potencial de 7 millones de donantes voluntarios en el mundo⁵³). Además, el tiempo requerido para encontrar un donante no relacionado HLA-compatible a partir de médula ósea es de 49 días de media mientras que para la SCU es de 19 días⁵⁴, un factor relevante para aquellos pacientes que necesitan un TPH urgente.

Comparadas a las CPH adultas, las CPH de SCU tienen más capacidad proliferativa y de autorenovación^{55,56}, una reactividad inmunológica reducida (menos células T y linfocitos inmaduros), una menor incidencia de contaminación con CMV y EBV y mayor disponibilidad, relacionada esta última con el almacenamiento de las unidades de SCU criopreservadas y tipadas para HLA en los bancos de sangre de cordón umbilical. Sin embargo, la dosis limitada de CPH en estas unidades (10 veces menos de CNT /kg que las CPH de MO y 100 veces menos de CNT /kg que las CPH de sangre periférica en TPH a adultos⁵²) está relacionada con un retraso de recuperación hematopoyética aún habiendo demostrado una incidencia de EICH reducida^{57,58}. Las dosis de CNT trasplantadas varía según el recipiente (adulto, pediátrico) y se han reportado dosis de $1.6 - 1.7 \times 10^7$ CNT /kg en adultos⁵⁹ y $0.24 - 3.6 \times 10^8$ CNT /kg en pacientes pediátricos⁶⁰. Una unidad de SCU suele contener entre $1-8 \times 10^6$ células CD34+.

La elección de la fuente de progenitores para un TPH es decisión del equipo clínico y se basa en la urgencia del trasplante y en los resultados previos para cada patología con las diferentes fuentes de CPH. En el caso del TPH autólogo, el 90% de los trasplantes se realizan a partir de CPH de sangre periférica. En el TPH alogénico, la fuente de progenitores depende de la disponibilidad de un donante HLA idéntico y en general, el algoritmo para la elección de una fuente de CPH en el contexto alogénico sería ⁶¹ (Fig 4).



II

**CRIOBIOLOGIA Y
PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.**

II.1 LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

II.1.1 Estructura de la membrana.

La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación celular. El comportamiento de las membranas durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia del inóculo descongelado.

La membrana plasmática de las células eucariotas, independientemente de su composición, tiene una estructura organizada según el modelo de mosaico fluido de SJ, Singer y GL, Nicholson⁶². (Fig 5). Así, las membranas plasmáticas son bicapas lipídicas continuas en las que las proteínas están embebidas y por las que los lípidos pueden difundir a través de la monocapa en la que se encuentran⁶³. Estas membranas se componen básicamente de lípidos anfipáticos, proteínas y un pequeño porcentaje de carbohidratos (estos carbohidratos pueden estar unidos a los lípidos o proteínas formando glicolípidos y glicoproteínas respectivamente). A modo de ejemplo, la membrana plasmática de los eritrocitos se compone de un 49% de proteína, un 43% de lípidos y un 8% de carbohidratos⁶⁴. Aunque la composición en porcentaje de peso seco es similar para los lípidos y las proteínas en las membranas plasmáticas, existen muchas más moléculas de lípidos que de proteínas porque los lípidos son moléculas más pequeñas, una relación 100:1 de moléculas de lípido:proteína es lo más habitual pudiendo ser de hasta 400:1 en células especializadas como las gliales (mielina). En membranas mitocondriales esta relación disminuye hasta 30:1 por el alto contenido en proteínas específicas.

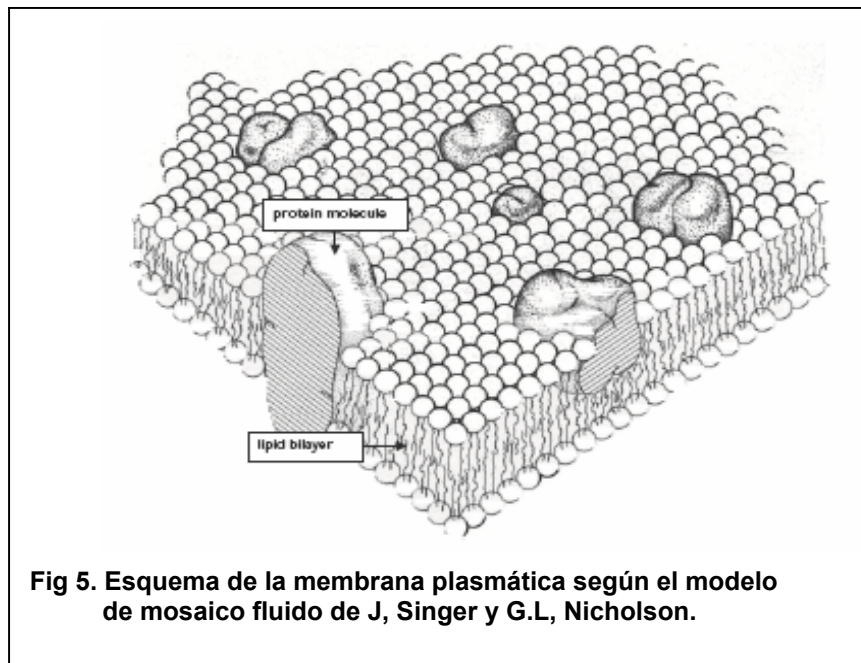
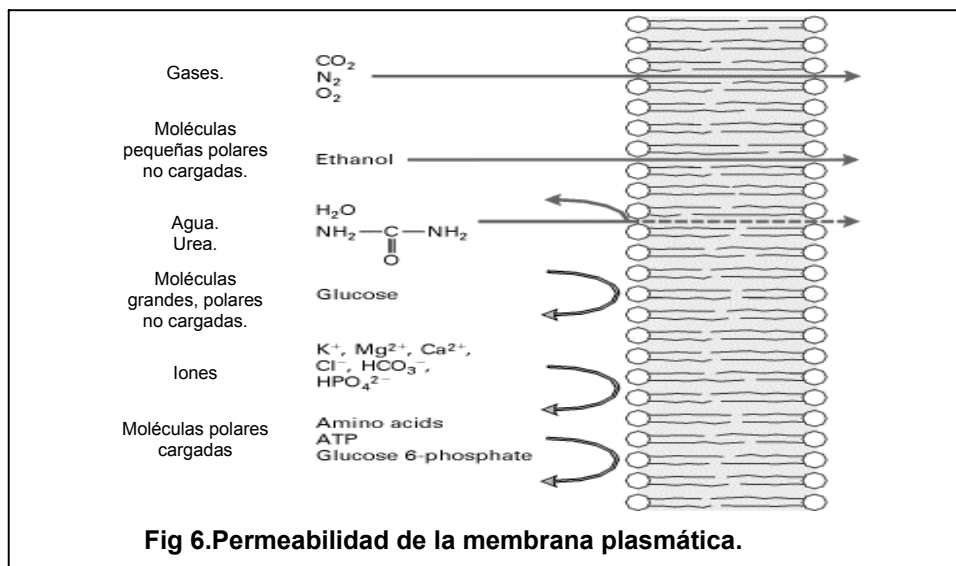


Fig 5. Esquema de la membrana plasmática según el modelo de mosaico fluido de J, Singer y G.L, Nicholson.

La membrana plasmática actúa como una barrera para casi todas las moléculas. Funciona como una barrera semipermeable permitiendo el paso de pequeñas moléculas pero impidiendo el flujo

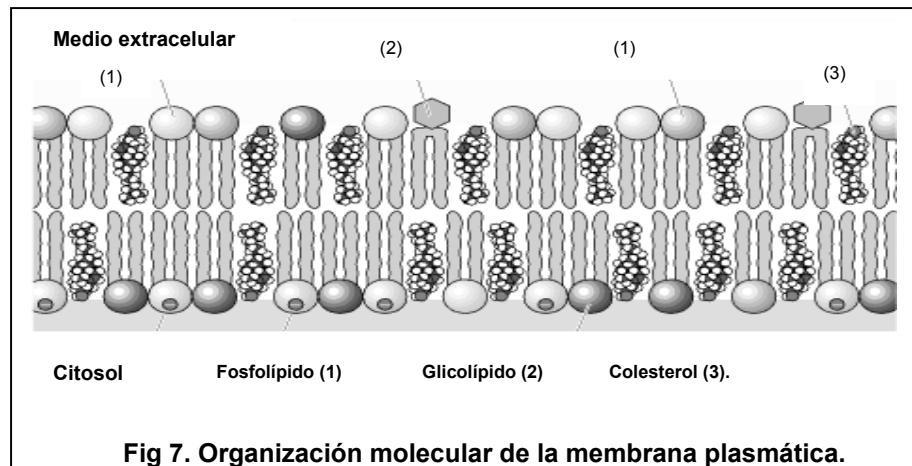
de las moléculas orgánicas producidas en su interior, actúa por tanto como una barrera permeable selectiva.

El tamaño de partícula, la polaridad y la carga iónica determinan el paso a través de las membranas y de esta forma, pequeñas moléculas como las de agua (PM:18), etanol (PM: 46), glicerol (PM: 92) y oxígeno pasan a través de la membrana mientras que la glucosa (PM: 180) no lo hace. En general, cuanto menos polar es una molécula (más hidrofóbica) más rápido puede pasar la membrana porque puede “disolverse” en la bicapa y las membranas son altamente impermeables a las moléculas cargadas o iones (Fig 6).



II.1.2 Composición de la membrana plasmática.

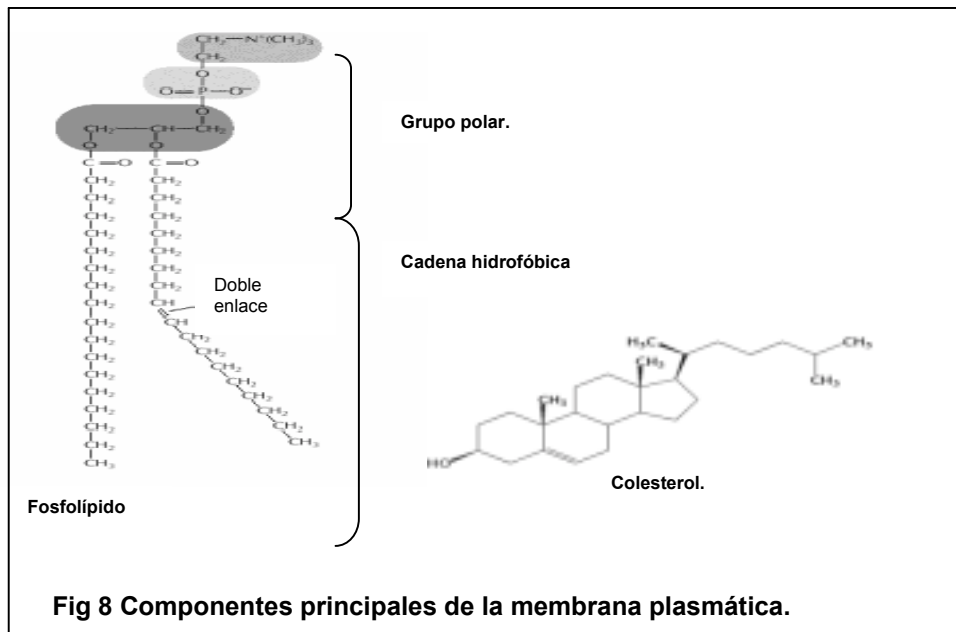
Los lípidos, como componentes más abundantes de la membrana plasmática, determinan la fluidez y resistencia de la membrana durante los procesos de criopreservación. Los lípidos más abundantes en las membranas plasmáticas de las células eucariotas son el colesterol y los fosfolípidos, que se encuentran en similares concentraciones molares (Fig 7). Los glicolípidos constituyen habitualmente un 2% de los lípidos de membrana y su porción carbohidratada está exclusivamente expuesta en la parte externa de la membrana, sugiriendo una función de señalización y/o comunicación intercelular para estos lípidos⁶⁵.



La estructura de los lípidos más abundantes de la membrana se presenta a continuación (Fig 8);

Fosfolípidos: Estructuras anfipáticas organizadas por un grupo polar (colina, serina, etanolamina) y uno apolar formado por dos ácidos grasos de longitud de cadena variable (14-24 átomos de carbono). Normalmente, una de las cadenas acílicas no contiene dobles enlaces (saturada) mientras que la otra si los contiene (insaturada) ⁶³.

Colesterol: Estructura de esteroide, con 4 anillos hidrocarbonados unidos (ciclopentanoperhidrofenantreno) de los que cuelgan una cola hidrocarbonada y un grupo hidroxilo (polar) en el lado contrario ⁶⁵.

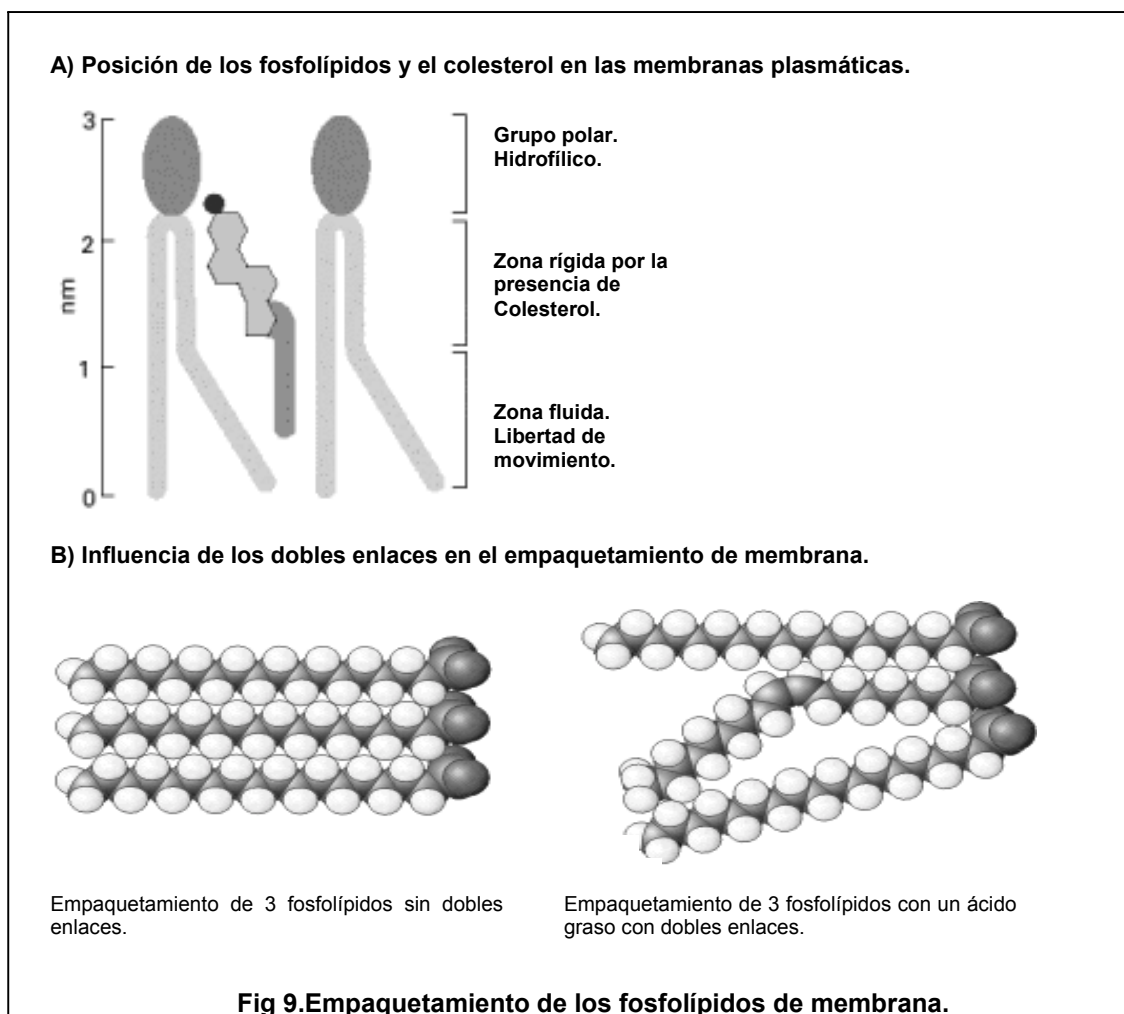


El empaquetamiento y la posición de estas moléculas en las bicapas determinaran la rigidez de las membranas y por tanto el transporte de moléculas. Este transporte a través de las membranas es el punto crítico para la supervivencia celular post descongelación.

II.1.3 Empaquetamiento de los lípidos de membrana.

En la bicapas, los ácidos grasos de los fosfolípidos se posicionan en paralelo los unos a los otros mientras que el colesterol se intercala entre ellos (Fig 7). Este empaquetamiento de las cadenas hidrofóbicas hace que interaccionen entre ellas y se estabilicen por fuerzas de Van der Waals. Cuanto más difícil sea este empaquetamiento más fluida será la membrana. Cuanto más larga es la cadena del ácido graso, más fácilmente se forman estas uniones y más rígida es la membrana.

Asimismo, la existencia de dobles enlaces en las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos introduce cambios de orientación en las cadenas y hace que estas moléculas no interaccionen tan fácilmente entre si y por tanto que la membrana sea más fluida (Fig 9). La presencia de moléculas de colesterol en la bicapa le proporciona rigidez a temperaturas fisiológicas por la unión de sus anillos a las cadenas de ácidos grasos (impide su libre movimiento y por tanto disminuye la fluidez) pero impide, por razones estéricas, que las cadenas de ácidos grasos se empaqueten libremente (cristalicen) al disminuir la temperatura aumentando, en ese momento, la fluidez de las membranas.



II.2 RESPUESTA CELULAR A LAS BAJAS TEMPERATURAS.

II.2.1- Conceptos generales.

La viabilidad celular asociada a los procesos de criopreservación depende casi exclusivamente de la integridad de la membrana. Los procesos de congelación y descongelación producen un movimiento de solutos y de moléculas de agua a través de las membranas celulares que pueden superar la resistencia física de estas. En este sentido la mayoría de los procesos de transporte a través de membrana dependen de la fluidez de esta, que a su vez depende de las propiedades de las cadenas de ácidos grasos y de la temperatura.

Los ácidos grasos pueden existir en un estado rígido ordenado (GEL) o en uno más flexible y relativamente desordenado (FLUIDO) (Fig 10). La transición de un estado al otro se da en un rango de temperaturas, la media del cual se conoce como temperatura de transición de fase (Melting Temperature, T_m)^{63,65}. Esta T_m será mayor o menor dependiendo la composición de los ácidos grasos que componen la membrana, esto es, el grupo polar, la longitud del grupo acilo y la saturación de la cadena. La mayoría de las membranas de células eucariotas tienen su T_m entre los 0°C y los 20°C⁶⁶.

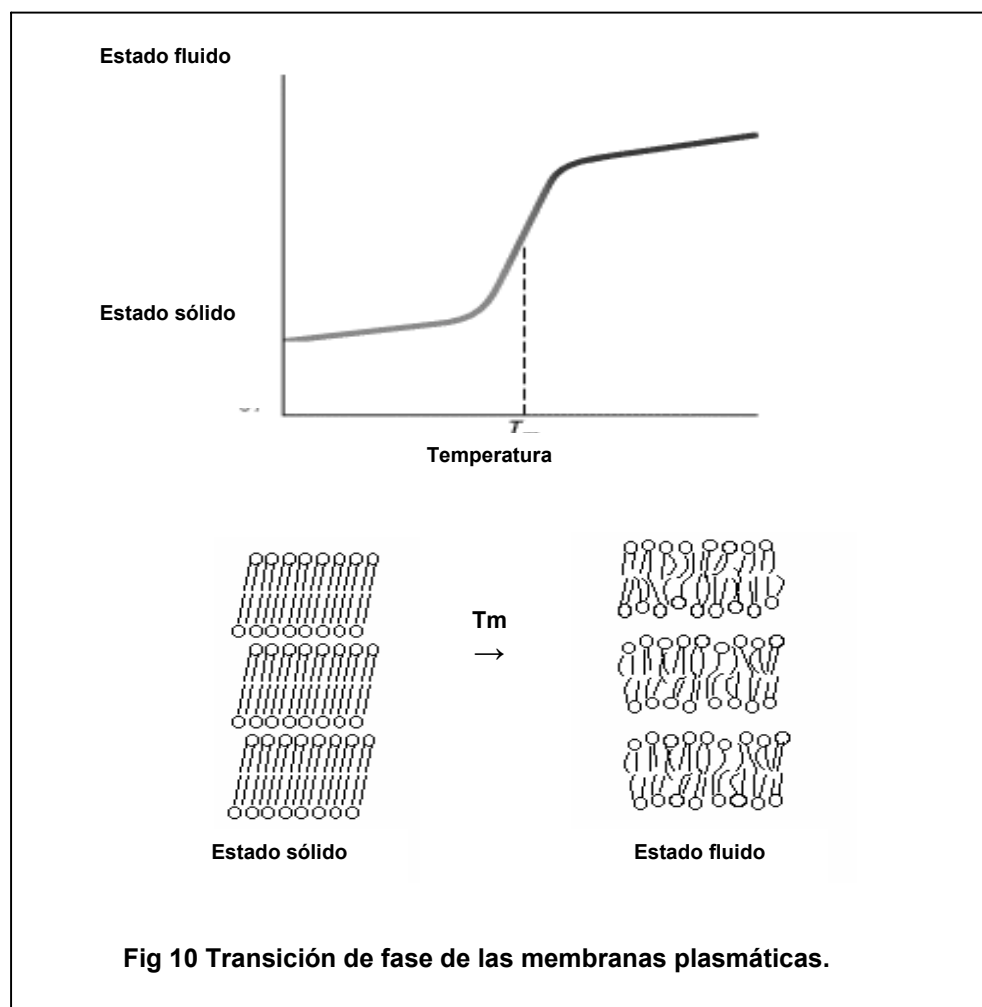
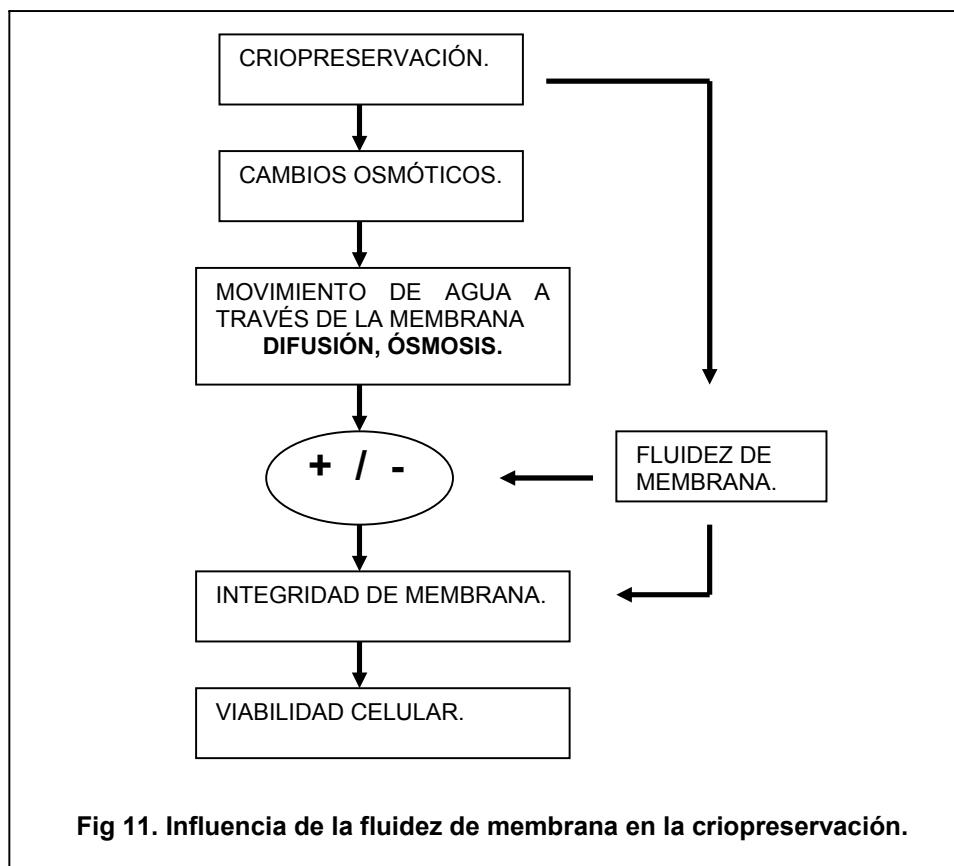


Fig 10 Transición de fase de las membranas plasmáticas.

La transición de fase de una membrana plasmática no se da simultáneamente en todos sus fosfolípidos y por tanto se espera la coexistencia de dominios en estado fluido y dominios en estado sólido (gel) durante la transición ⁶⁷. Esta situación produce defectos en el empaquetamiento de las membranas y está asociado a una mayor permeabilidad de solutos a través de la membrana. Así, se ha demostrado que al alcanzar la T_m en una bicapa determinada, se produce la mayor pérdida de solutos a través de la membrana ⁶⁶. Alternativamente, se ha propuesto ⁶⁸ la pérdida de lípidos de membrana durante la deshidratación celular que tiene lugar en el proceso de congelación como un mecanismo mediante el cual la membrana plasmática pierde capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas, comprometiendo en ese momento la integridad de membrana.

Por último, las bajas temperaturas (asociadas al aumento de la rigidez de membrana) y la rapidez (décimas de segundo) a la que suceden los cambios osmóticos en los procesos de congelación y descongelación hace muy difícil el movimiento de moléculas a través de la membrana sea mediante procesos de transporte activo (dependientes de ATP, la disminución de T^a de 25°C a 10°C reduce en un 60% la actividad de las bombas dependientes de ATP ⁶⁹), difusión facilitada o cotransporte (transporte concomitante de dos moléculas a través de la membrana dependiente una de ellas de ATP y/o iones H^+). En consecuencia, los procesos de difusión y osmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico ⁶⁵ asociados a la congelación y descongelación y, adicionalmente, los que conducirán el movimiento de agua a través de la membrana y su integridad (Fig 11).



II.2.2 Difusión y Ósmosis.

La Difusión es un proceso mediante el cual las moléculas de una sustancia tienden a alcanzar una distribución homogénea en todo el espacio que les es accesible, por ejemplo, el intercambio de nutrientes entre el plasma sanguíneo y las células del cuerpo tiene lugar en el lecho vascular por difusión.

La expansión de una sustancia se debe al movimiento caótico de sus partículas que la lleva a ocupar todo el volumen disponible. Cuando las moléculas o las partículas de un soluto están disueltas en un solvente, también están en continuo movimiento al azar (Fig 12). Si en una determinada zona hay mayor concentración del soluto, el choque entre las partículas es más frecuente que donde la concentración es menor y se produce un movimiento neto de partículas hacia la zona menos concentrada. De esta forma, las moléculas del soluto tienden a repartirse homogéneamente en el seno del disolvente, lo cual se alcanza al cabo de cierto tiempo. Así se logra que cada unidad de volumen tenga la misma concentración de soluto, se ha logrado el equilibrio.

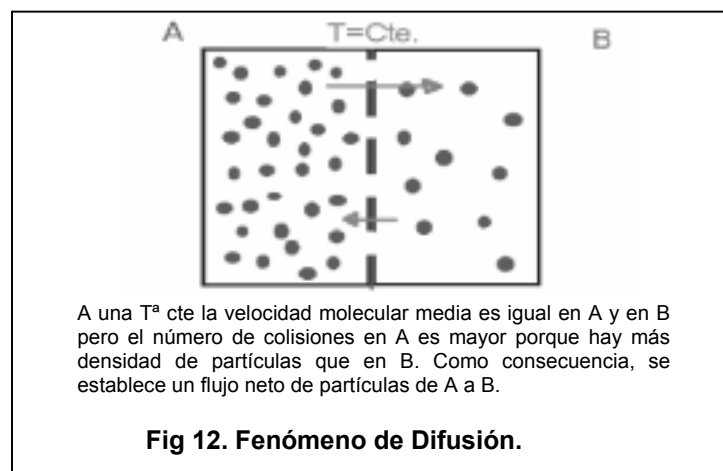


Fig 12. Fenómeno de Difusión.

Difusión a través de Membranas

La magnitud de la tendencia a difundir desde una zona a otra si está presente una membrana que separe las dos zonas está definida por la ley de **difusión de Fick**, que relaciona el gradiente entre las dos zonas (gradiente químico o de concentración), las características de la membrana (grosor, área de sección transversa y permeabilidad para un determinado soluto).

$$Q = -P \times A \times (C_A - C_B) \quad \text{donde;}$$

Q= velocidad de paso del soluto.
P= cte de permeabilidad para el soluto.
A= Área de la membrana (interfase).
C= concentración.

Así, la velocidad del movimiento de un soluto a través de una membrana, es directamente proporcional a la superficie (área) de la membrana y a la diferencia de concentración del soluto entre los

dos lados e inversamente proporcional al espesor (grosor) de la membrana ($P = \text{cte de difusión de un soluto} / \text{grosor de la membrana}$). Además, la velocidad de la difusión es proporcional a una constante de difusión que depende de las propiedades de la membrana y de cada soluto en particular. La constante de difusión es directamente proporcional a la solubilidad del soluto e inversamente proporcional a la raíz cuadrada de su peso molecular. La difusión sólo tiene relevancia cuando se trata de distancia muy cortas ya que su efectividad disminuye proporcionalmente al cuadrado de la distancia. Como resultado de esto, un equilibrio puede conseguirse en segundos si la distancia es de micras, pero puede subir a varias horas si la distancia de difusión se incrementa a milímetros.

Ósmosis.

La ósmosis es un caso especial de difusión en el que es el movimiento del disolvente el que se estudia, y se define en función de los solutos. Así, la osmosis es el movimiento del agua desde soluciones con baja concentración de soluto hasta soluciones con alta concentración de soluto y la presión osmótica es aquella que debemos ejercer para contrarrestar ese movimiento. Por tanto la presión osmótica es la presión hidrostática que se genera a través de una membrana semipermeable con un gradiente de concentración a lado y lado.

La presión osmótica depende del número de partículas de la solución de acuerdo con la fórmula:

$$P = R \times T \times \sum C, \quad \text{donde;}$$

P= presión osmótica.
R= cte de los gases.
T= temperatura.
C concentración.

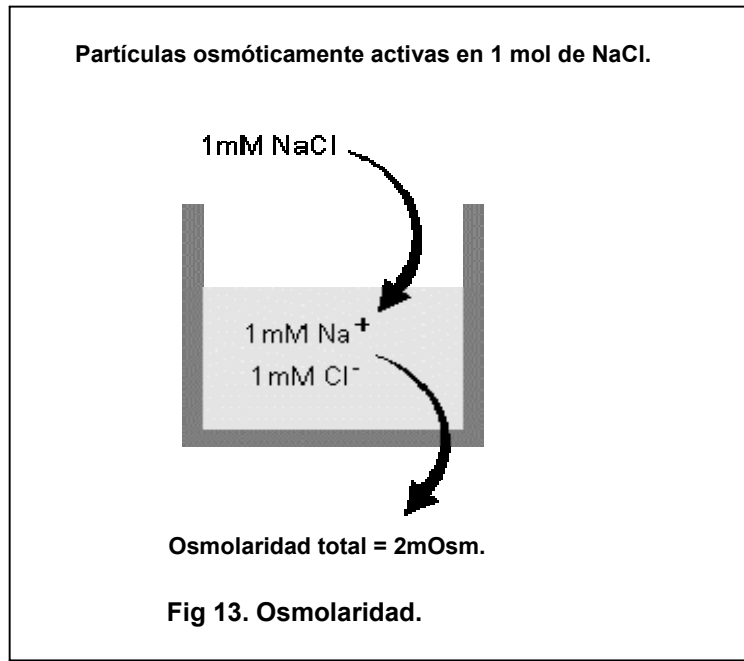
II.2.3 Osmolaridad, Osmolalidad.

Dada la dificultad práctica debida a la ionización y la formación de subgrupos osmóticamente activos en los fluidos biológicos, la presión osmótica se suele expresar en Osmoles. Una solución conteniendo 1 mol de un soluto no ionizable en 1 litro de agua tiene una presión osmótica de 22.4 atm. Como resultado de esta definición cualquier solución que tenga esta presión osmótica, independientemente de la concentración de sus solutos, se dice que tiene una presión de 1 Osm/litro. Como esta unidad es muy grande, en la práctica se utiliza el miliosmol (1 Osm = 1000 mOsm). La presión osmótica del plasma es de 300 mOsm y se determina experimentalmente a partir del punto de congelación.

La presión osmótica depende exclusivamente del número de partículas disueltas (moles) por unidad de volumen, con independencia de su carga eléctrica, peso o fórmula química.

La Osmolaridad es la medida de la presión osmótica que ejerce una solución a través de una membrana semipermeable debido a la diferencia de concentración de solutos a lado y lado de la

membrana. Es una medida de la concentración de partículas osmóticamente activas en solución. La osmolaridad es dependiente del número de iones en solución pero independiente de la naturaleza de esos, es por tanto una propiedad coligativa. Ejemplo: 1 mol de NaCl se disuelve en 1L de agua, la osmolaridad es de 2Osm/L porque la sal se disocia en 2 partículas Na+Cl (Fig 13)



El número total de partículas disueltas constituye la **osmolaridad** si su concentración se expresa por unidad de volumen total de la solución (moles/L), u **osmolalidad**, si se expresa por unidad de peso del disolvente (moles/kg H₂O). De hecho, la actividad osmótica depende de la osmolalidad, pero en la práctica, y debido a que las soluciones biológicas son muy poco concentradas, la diferencia entre ambos valores es pequeña y ambos términos se utilizan a menudo de forma indistinta. En ausencia de osmómetro, la concentración total de solutos del suero puede calcularse con una fórmula sencilla a partir de las concentraciones de sodio, cloro, glucosa y urea (los principales solutos del líquido extracelular). (Nitrógeno ureico sanguíneo: BUN. Si se emplea la urea hay que dividir por 6 (el peso de la urea es 60).

Así;

$$\text{Osmolaridad (mosm/l)} = 2 (\text{Na} + \text{K}) + (\text{glucosa mg/dL}) + (\text{BUN mg/dL})$$

$$\text{Osmolaridad (mosm/l)} = 2 (\text{Na} + \text{K}) + (\text{glucemia}/18) + (\text{BUN}/2.8)$$

La concentración de sodio se duplica para incluir la contribución osmótica del cloruro. La glucemia y el BUN se miden en mg/dL, los factores 18 y 2,8, los pesos atómicos divididos por 10, se

emplean para pasar mg/dL a mOsm/kg H₂O. Los valores obtenidos por esta fórmula difieren sólo de 1 a un 2 % de los valores obtenidos por osmometría y pueden utilizarse con fines clínicos.

Cálculo de osmolaridad en presencia de DMSO:

La osmolaridad es aditiva (no así las concentraciones). Por lo tanto en una mezcla de varios electrolitos se debe calcular la osmolaridad de cada compuesto y finalmente se suman,

$$\text{Osmolaridad (mOsm/l)} = 300 + ((\text{mg/dL DMSO}) / 7.8).$$

ó

$$\text{Osmolaridad (mOsm/l)} = 300 + (\text{mmol de DMSO}).$$

Así, para una solución al 10% de DMSO, la osmolaridad teórica será la suma de la osmolaridad del plasma más la debida a la presencia del crioprotector. Un 10% v/v de DMSO corresponde a una concentración molar de 1.4 M o 1400 mmol/litro;

$$\text{Osmolaridad (plasma al 10\%v/v DMSO)} = 1700 \text{ mOsm/L.}$$

Aunque esta es la presión osmótica a la que se vería sometida una célula que se encuentra en un medio isotónico al que añadimos en un solo paso un 10% v/v de DMSO. En realidad, la adición del crioprotector a las células a criopreservar se hace paulatinamente durante aproximadamente cinco minutos a 4°C, y a partir de adiciones discretas de una solución 20% v/v DMSO hasta completar una dilución 1:1 del material a congelar, hasta doblar su volumen. De esta manera y a pesar de los movimientos de agua y solutos a través de la membrana a consecuencia de la presión osmótica generada, se consigue mantener el volumen celular dentro de unos rangos de seguridad que no exceden sus capacidades mecánicas.

II.3 CRIOPRESERVACIÓN CELULAR.

II.3.1 Conceptos generales.

II.3.1.A) Congelación.

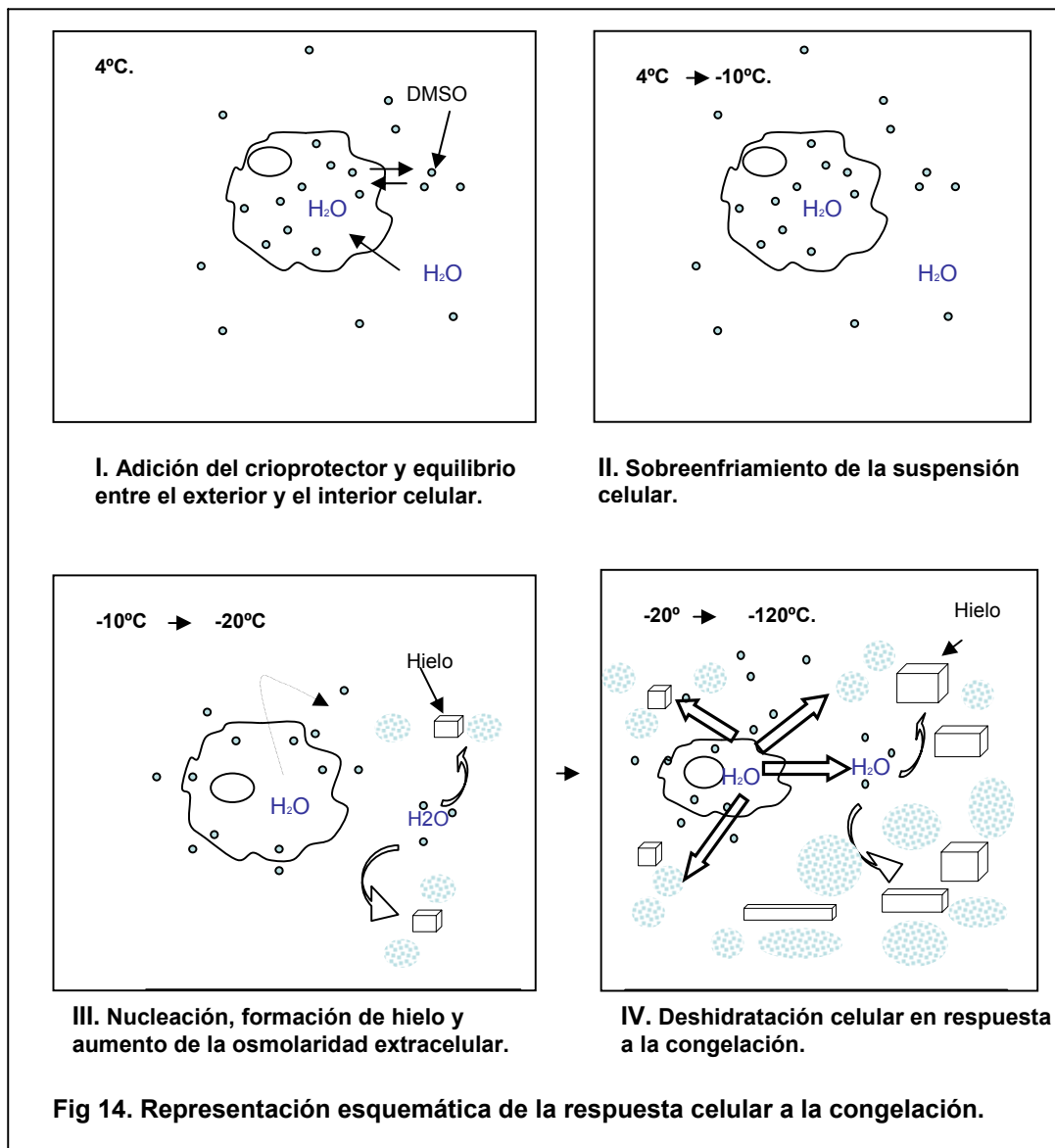
El objetivo principal de la criopreservación de progenitores hematopoyéticos es mantener la viabilidad y funcionalidad de los injertos a bajas temperaturas durante periodos cortos de tiempo (aféresis, MO) o incluso durante décadas (SCU). Los productos criopreservados se almacenan a -196°C (N_2 , líquido). A esta temperatura no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo las reacciones químicas y por tanto las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a temperaturas bajas sino de los procesos de congelación y descongelación.

Durante el proceso de congelación se producen diversos cambios fisicoquímicos en el espacio extracelular y las células responden a estos actuando como osmómetros (se hidratan y deshidratan). Los principales eventos a nivel celular que tienen lugar durante el proceso de congelación se resumen en el siguiente párrafo:

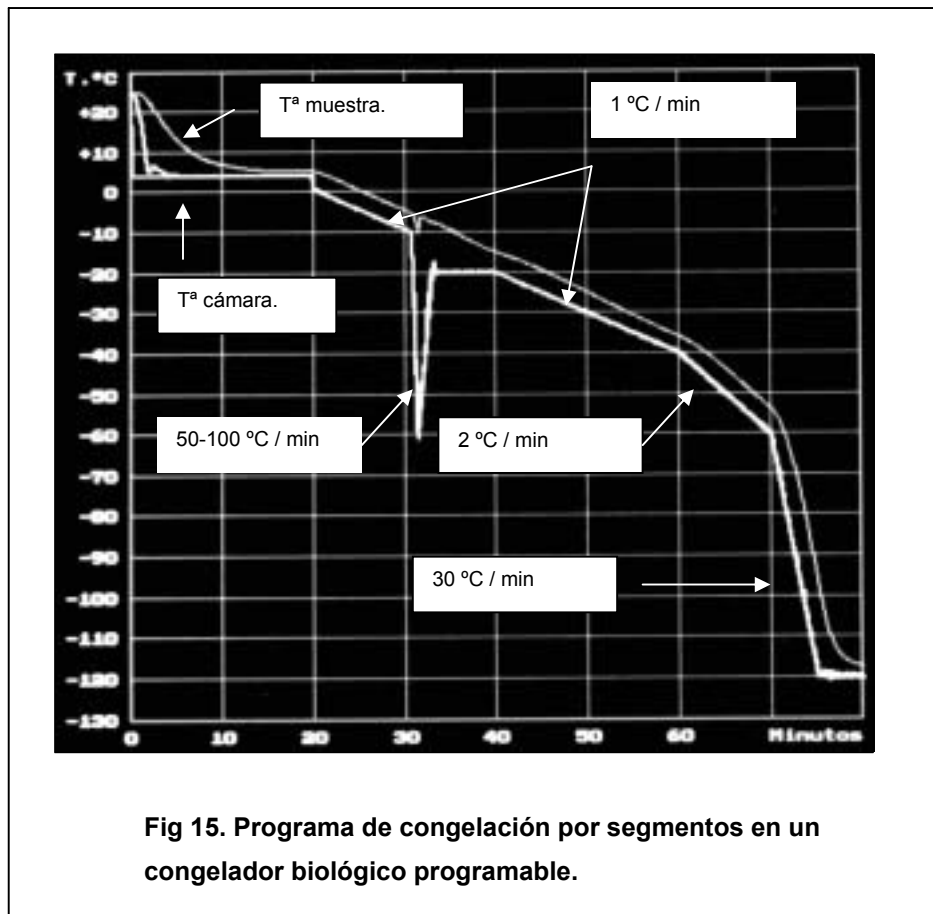
Antes de proceder a la disminución de temperatura en el proceso de congelación, se adiciona a las células el crioprotector de manera progresiva durante 5 minutos a 4°C con el objetivo de permitir que la concentración de este se equilibre entre el exterior y el interior celular (Fig 14.I). Posteriormente se introduce la solución con las células en un congelador biológico y se enfría la mezcla paulatinamente. Durante el proceso de enfriamiento, entre los 4°C y los -10°C , se somete a las células a temperaturas menores que las de congelación de la solución que las circunda (Fig 14.II), pero tanto las células como el líquido extracelular se mantienen sin congelar, (sobreenfriados). Este es un estado metaestable y el momento de la aparición de hielo (entre los -10°C y los -20°C) depende de la probabilidad de formarse centros de nucleación a partir de los que crecerán los cristales de hielo. Estos cristales crecen a medida que la temperatura disminuye en forma de frentes de congelación entre los que las células se sitúan en canales de solución líquida que aumenta su viscosidad a medida que el agua líquida pasa a formar parte de la fracción congelada.

El hielo se forma preferentemente en el solución extracelular que, simplificando, esta formada de agua y solutos. Al producirse la cristalización, las moléculas de agua se incorporan al hielo mientras que el soluto queda excluido de la fase sólida. De esta manera el espacio extracelular que se va concentrando progresivamente (se va haciendo cada vez más hipertónico) a la vez que el potencial químico del agua (en el espacio extracelular) decrece (Fig 14.III). Este cambio de potencial perturba el equilibrio termodinámico entre los espacios intra y extracelular y produce una salida de agua de la célula que intenta revertir el desequilibrio. En consecuencia, la célula se deshidrata progresivamente a medida

que el espacio extracelular se va concentrando y al mismo tiempo que el agua que exporta la célula se congela en el exterior (Fig 14.IV) ^{70,71}.



Los procesos de criopreservación se realizan mediante el uso de congeladores biológicos que enfrían las muestras según unas curvas programadas de congelación. En estos congeladores la transmisión de temperatura entre la cámara interior y las muestras a criopreservar se maximiza mediante el uso de placas metálicas que cubren las muestras dentro del congelador. Las curvas programadas de congelación se componen de segmentos cada uno de los cuales tiene una velocidad de enfriamiento (°C / minuto) determinada empíricamente para obtener una máxima viabilidad tras el proceso de congelación (Fig 15).

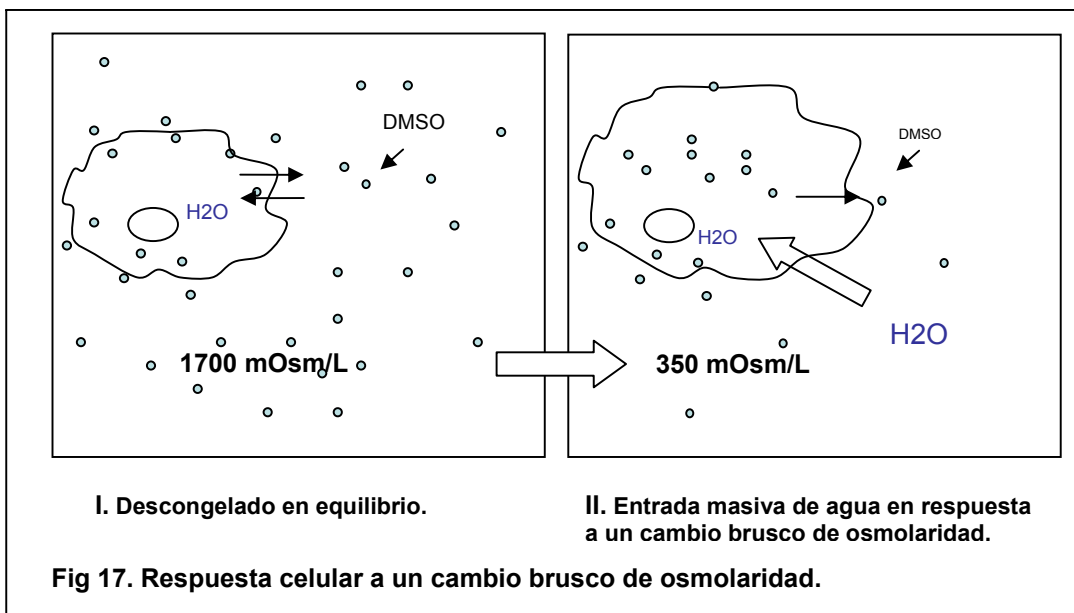
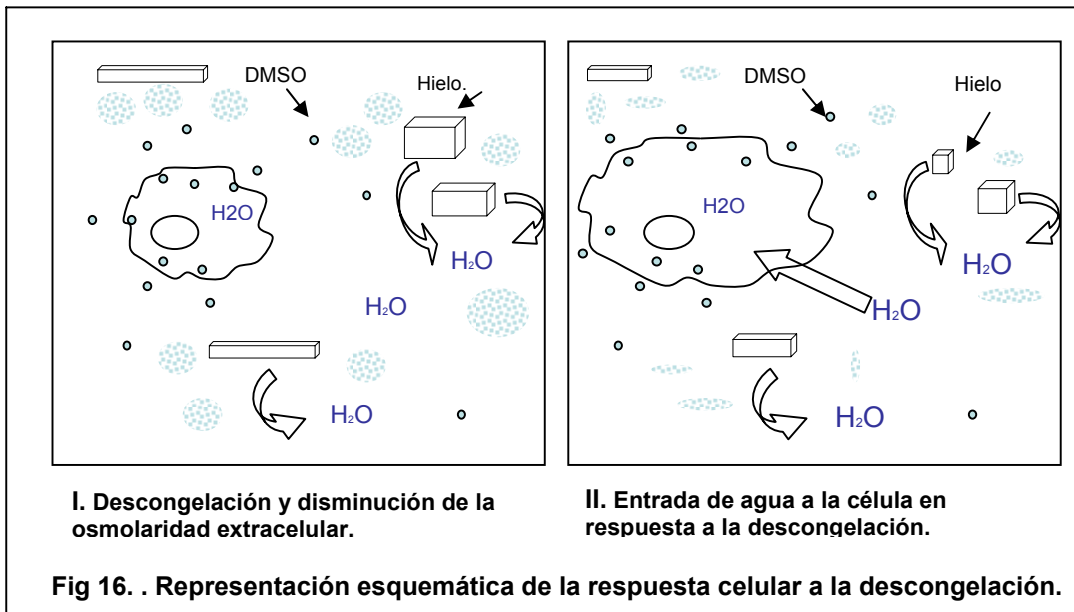


Una vez alcanzada la temperatura de -120°C (-50°C para la sangre de cordón umbilical congelada en el sistema Bioarchive) se retira la suspensión celular del congelador biológico (que se encuentra en bolsas estériles resistentes a las bajas temperaturas) y se almacena en la fase líquida de un tanque de nitrógeno líquido (-196°C).

II.3.1.B) Descongelación.

Durante la descongelación se reproducen los cambios osmóticos inversos a los descritos para la congelación. Así, cuando el agua congelada cambia de estado (sólido a líquido), la concentración de solutos en el medio extracelular se reduce progresivamente y la célula vuelve a hidratarse para compensar esta diferencia de concentraciones entre el exterior y el interior celular (**Fig 16.I-II**). La toxicidad del crioprotector y las condiciones de osmolaridad elevada determinaran en este momento la supervivencia celular dependiendo, básicamente, del tiempo de exposición a estas condiciones y de la temperatura.

Para evitar una disminución de la viabilidad celular post descongelación por causas relacionadas con la presencia del crioprotector se han propuesto el lavado y/o la dilución del DMSO. Estos procesos implican la dilución del descongelado y por tanto un cambio brusco de la osmolaridad (reducción de la concentración) a la que la célula responderá hidratándose (Fig 17. I-II). Los límites mecánicos de la membrana plasmática determinarán durante este proceso la supervivencia celular medida mediante ensayos de integridad de membrana.



II.3.2 Concentración celular durante la congelación de CPH.

La concentración celular utilizada en la mayoría de protocolos de criopreservación proviene de la aplicación práctica de consideraciones como congelar más de una bolsa de aféresis o minimizar el volumen total a congelar para optimizar el espacio destinado al almacenamiento ⁴⁸. El paradigma de este hecho es la sangre de cordón umbilical para la que, debido a que su aplicación clínica requiere del almacenamiento de numerosas unidades en bancos destinados a ello, se han desarrollado protocolos de separación de eritrocitos y reducción de volumen para congelar volúmenes tan pequeños como de 25 mL asegurando un 90% de recuperación de progenitores hematopoyéticos ⁷². Adicionalmente, aunque algunos laboratorios limitan la concentración de células nucleadas en los productos criopreservados otros definen la cantidad máxima de eritrocitos, granulocitos o plaquetas a congelar.

Teóricamente, la congelación de células a altas concentraciones puede resultar en bajas recuperaciones postdescongelación a causa del limitado espacio en los canales de solución no congelada que existen entre los frentes de hielo formados durante la congelación y la presión física de las células en estos canales debida al empaquetamiento.

Por esta razón desde la introducción de la sangre periférica como fuente de progenitores hematopoyéticos se recomendaron en los productos criopreservados concentraciones de células nucleadas menores de 100×10^6 CN/mL ^{73,74}. Posteriormente y con la intención de reducir costos y espacio en los procesos de criopreservación sin comprometer la eficiencia clonogénica, la recuperación ni la viabilidad de los progenitores hematopoyéticos, se realizaron estudios de funcionalidad de los progenitores postdescongelación y recuperación hematológica post infusión con aféresis altamente concentradas ^{75,76}. En estos trabajos se utilizaron concentraciones de 243×10^6 CN/mL y 370×10^6 CN/mL en los productos congelados y aunque Keung⁷⁵ reportó una pérdida de capacidad clonogénica en los productos descongelados Rowley⁷⁶ no observó este fenómeno congelando a concentraciones más altas. Es de destacar que ambos coinciden en que la recuperación hematológica y la toxicidad post infusión no se vieron afectadas por la utilización de altas concentraciones en el producto congelado.

En el año 2000 nuestro grupo publicó resultados similares a los de Rowley aportando nuevas pruebas, en un estudio pareado con aféresis congeladas a altas y bajas concentraciones, sobre el hecho de que la congelación a altas concentraciones (240×10^6 CN/mL) no se asocia a pérdidas de viabilidad ni de capacidad clonogénica ⁷⁷.

A continuación, y a modo de ejemplo, se muestran las medianas y rangos de volumen criopreservado y concentración celular de 630 productos hematopoyéticos (294 SCU y 336 Aféresis) congelados en nuestro centro (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración celular de productos criopreservados.

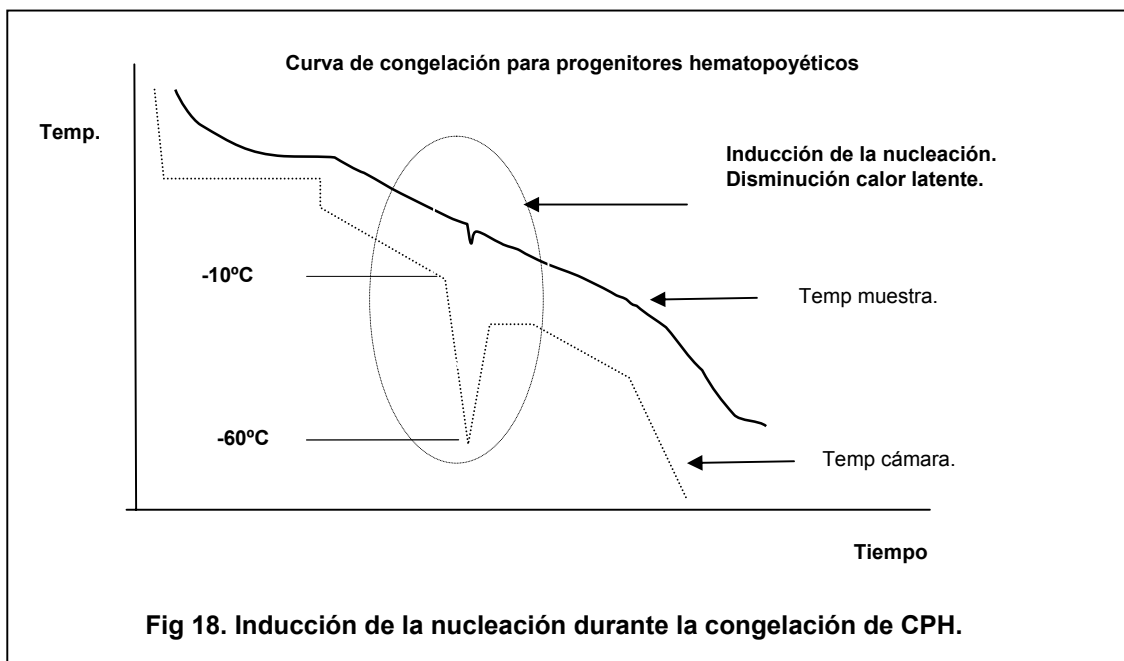
	SCU n=294	Aféresis n=336
Vol (mL)	25.2 (18-130)	200 (50-350)
CN x10⁶ /mL	46.2 (5-141)	236 (36-883)
CNT x10⁹	1.31 (0.14-3.5)	49.2 (2.5-220)
CD34 /μL	139 (2-1235)	N.D.

II.3.3 Lesiones crioaducidas.

Existen diferentes teorías sobre los mecanismos de daño celular durante la congelación de células vivas. Los más evidentes y demostrados empíricamente son aquellos producidos por la formación de hielo y los relacionados con la deshidratación celular (estrés osmótico) que tiene lugar durante el proceso de congelación ⁷⁸.

II.3.3.A)-Formación de hielo.

La existencia de solutos en el agua produce un descenso del punto de congelación (descenso crioscópico) y en consecuencia la cristalización del agua se produce a temperaturas menores a la del punto de congelación del agua pura. Este fenómeno produce, al disminuir la temperatura, un sobreenfriamiento de la muestra ⁷⁹. En una solución sofrenfriada la formación de hielo depende de la probabilidad de formación de un punto de nucleación, punto de inicio de un frente de cristales de hielo, que es inversamente proporcional a la temperatura. La nucleación se puede dar al azar (nucleación homogénea) o mediante una inducción externa (nucleación heterogénea). En los protocolos de criopreservación mediante el uso de congeladores biológicos programados la nucleación se induce mediante un descenso brusco de temperatura en el interior de la cámara de congelación (Fig 18). Este descenso de temperatura tiene una doble función, iniciar la nucleación y contrarrestar el calor producido por el cambio de estado del agua extracelular. El cambio de estado en el agua (líquido a sólido) libera energía en forma de calor latente de solidificación que debe ser contrarrestado para evitar fluctuaciones de temperatura sobre las membranas celulares.

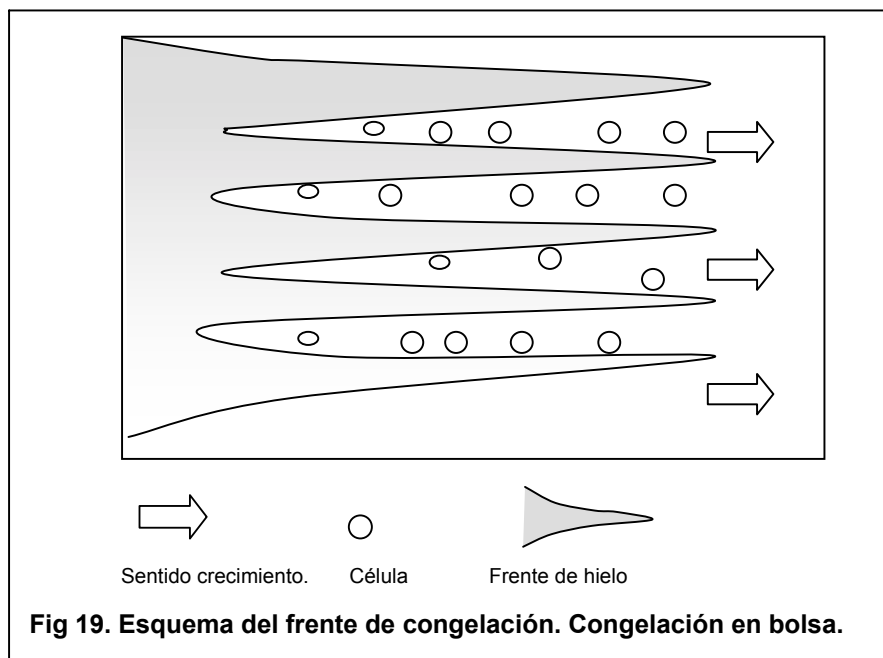


Así, el hielo se forma a partir de un punto de nucleación donde se inicia la transición de fase (hielo-agua) y al que se van añadiendo moléculas de agua que hacen crecer el cristal de hielo. El crecimiento de cristales de hielo durante el descenso de temperaturas podría ejercer un daño mecánico sobre las membranas celulares causando lesiones irreversibles que conducirían a la muerte celular. Los cristales de hielo se pueden formar en el exterior y en el interior celular.

II.3.3.A1) Formación de hielo extracelular:

Se ha demostrado que la formación de hielo extracelular no es una causa de lesión porque las células criopreservadas se mantienen en canales de solución no congelada mientras crecen los cristales de hielo en la solución extracelular superenfriada. Cuando la temperatura del medio alcanza los -130°C , el agua no existe en estado líquido y los canales donde se encuentran las células se encuentran en un estado vítreo (con una alta viscosidad, 10^{13} poises) y sin cristalización, un estado en el que los fenómenos de difusión de las reacciones bioquímicas no son posibles ⁸⁰ (Fig 19).

En el proceso de congelación de material biológico, por encima de los -5°C , las células y el líquido extracelular se mantienen sin congelar (sobrenfriados), entre los -5°C y los -10°C tiene lugar la formación de hielo en el espacio extracelular pero no dentro de la célula posiblemente por la barrera física que impone la membrana celular al proceso de nucleación y al crecimiento de los cristales de hielo. Asimismo, la probabilidad de iniciar la nucleación en el medio intracelular es mucho menor que en el medio extracelular ya que la nucleación (primer evento para la formación de hielo) está directamente relacionada con el tamaño del compartimiento a congelar ⁸¹.



II.3.3.1.A) Formación de hielo intracelular:

En el momento en el que se inicia la nucleación y posterior crecimiento de los cristales de hielo en el espacio extracelular (< -10°C), se produce una disminución de la proporción de agua extracelular en estado líquido que provoca una salida neta de agua intracelular para equilibrar el potencial químico del agua a lado y lado de la membrana. En este momento, lo que suceda en el espacio intracelular depende básicamente de la velocidad de enfriamiento^{81,82}.

Si la velocidad con que desciende la temperatura es muy rápida, la célula puede no ser capaz de deshidratarse suficientemente rápido y al llegar a la temperatura de nucleación, el agua remanente se congela formando hielo intracelular (Fig 20.Φ). Este alcanzará un tamaño mayor o menor dependiendo de la velocidad de enfriamiento. En general, cuanto más rápida es la congelación más pequeños serán los cristales.

Si por el contrario la velocidad de enfriamiento es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiéndose llegar al colapso celular (Daño osmótico, no representado en la figura). Con una velocidad de enfriamiento adecuada (Fig 20.ΦΦ), la célula se deshidratará y concentrará intracelularmente antes de alcanzar la temperatura de nucleación, de forma que la posibilidad de congelación intracelular y consecuentemente de daño celular se minimizará⁸³.

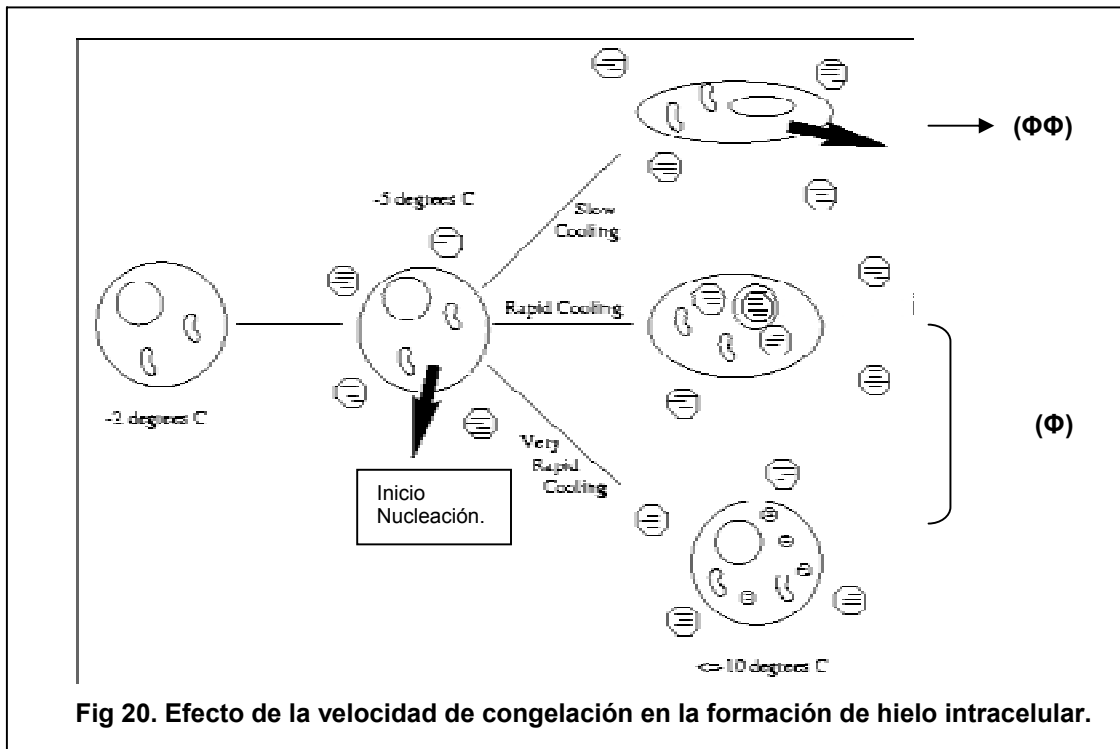
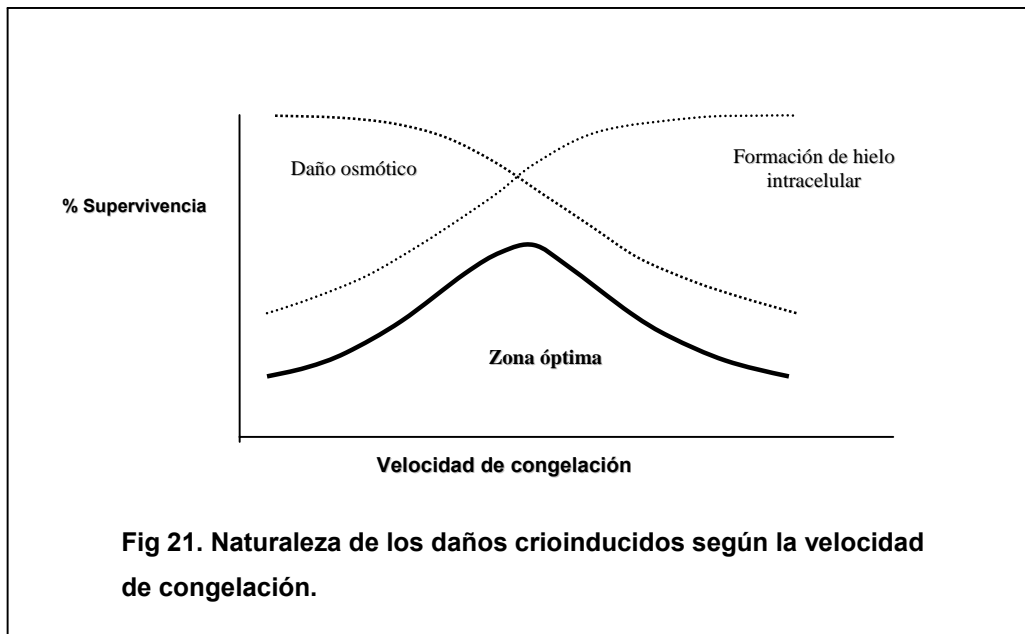


Fig 20. Efecto de la velocidad de congelación en la formación de hielo intracelular.

En general, la supervivencia celular a la congelación será máxima a una velocidad de enfriamiento óptima, que es específica para cada tipo celular. A velocidades mayores o menores a la óptima la muerte celular aumenta y las causas serán la formación de hielo intracelular y el daño osmótico resultante de la concentración de solutos (Fig 21).



II.3.3.B) Estrés Osmótico.

De acuerdo a Mazur⁸³ (uno de los pioneros de la criobiología), los períodos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial del enfriamiento y el período de retorno a condiciones fisiológicas. Si bien una velocidad de enfriamiento adecuada es necesaria para evitar la congelación intracelular, *per se* no garantiza la supervivencia celular. Mazur⁸³ postula que la lesión celular criinducida podría explicarse en función de la formación de hielo intracelular (consecuencia de una velocidad de enfriamiento inadecuada) y el stress osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación a consecuencia de la formación de hielo y al retornar a las condiciones fisiológicas de osmolaridad.

Existen básicamente dos teorías para explicar el fenómeno de estrés osmótico durante la criopreservación; la de Lovelock y la de Merymann, son complementarias y aunque los resultados experimentales las avalan, los mecanismos celulares exactos no se conocen.

En 1953 Lovelock publica un trabajo con eritrocitos humanos a los que expone a diferentes soluciones hipertónicas para simular el efecto de la congelación y demuestra empíricamente que la concentración de solutos produce *per se* un efecto deletéreo sobre las células. Esta aproximación se

basa en la observación de que la hemólisis de los eritrocitos durante la congelación empieza a ser evidente a partir de una concentración de solutos determinada (0.8M NaCl, 1600mOsm/L).

La introducción de un crioprotector (glicerol) en la muestra reduce la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada y por tanto reduce la concentración de solutos en ese punto de la congelación. No obstante, independientemente de la temperatura, se produce una masiva lisis celular (al descongelar) a partir de una concentración de 0.8M de NaCl ⁸⁴. Los mecanismos propuestos a este respecto son las interacciones del soluto iónico con las proteínas que producirían la desnaturalización de proteínas de membrana y/o facilitarían la formación de puentes disulfuros entre aminoácidos ⁸⁵.

Estos resultados se confirmaron cuando el agente osmótico utilizado fue glucosa. Por tanto, el hecho de que la lisis celular se produzca independientemente de la concentración del soluto o la naturaleza de este, sea un azúcar o sal (electrolito o no), apoya el hecho de que no es la concentración de soluto en sí ni lo que daña las células (la membrana celular es impermeable a la glucosa), sino la deshidratación celular que produce. En este sentido, Mazur ⁸⁶ propone que es la gran concentración salina que se alcanza durante la congelación es la que altera la permeabilidad de membrana aumentando el influjo de iones al interior celular, causando un efecto deletéreo.

Alternativamente, Meryman (1971) ⁸⁷ propone la hipótesis del volumen celular mínimo que relaciona el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos (congelación) y la muerte celular (lisis) con la vuelta a las condiciones isotónicas después de la descongelación (choque osmótico) ⁷⁸. Merymann propone esta hipótesis basándose en la observación de que aunque algunas células presentan alteraciones en la membrana dependiendo de la concentración de solutos y del tiempo de exposición a las condiciones hipertónicas, la lisis celular se produce al retornar a condiciones isotónicas debido a que la hipertonicidad intracelular produce una entrada masiva de agua que conduce a la lisis osmótica (choque osmótico).

Hipótesis del “volumen celular mínimo” ⁸⁸: Esta hipótesis explica los mecanismos de daño celular producido por la concentración de sales durante la congelación y se basa en que el volumen celular se reduce a medida que aumenta la osmolaridad extracelular (formación de hielo). A medida que la célula pierde volumen la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen (pérdida de agua), en consecuencia, la progresiva incapacidad de la célula a responder a los cambios osmóticos externos produce una presión hidrostática a través de la membrana plasmática que llegado a un punto (volumen celular mínimo) excederá la resistencia física de la membrana y producirá cambios irreversibles en su permeabilidad. En este sentido, los crioprotectores permeables actuarían reduciendo, por sus propiedades coligativas, la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada y por tanto la concentración de soluto durante la congelación y así la deshidratación celular. Esta reducción en la deshidratación celular haría que la célula no llegase nunca al volumen celular mínimo durante el proceso de congelación.

II.3.4 Crioprotectores.

Además de una adecuada velocidad de enfriamiento, para mejorar la viabilidad celular es necesario alterar el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas en las cuales tiene lugar la criopreservación, para ello se añaden al medio de congelación agentes crioprotectores (ACP). Los ACP son sustancias muy hidrosolubles y de baja citotoxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución determinada (temperatura mínima a la que una solución se encuentra en estado líquido). El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que en el momento en el que se induce la nucleación en el espacio extracelular la célula estará más hidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor en el momento en que el espacio extracelular se congela (Fig 22).

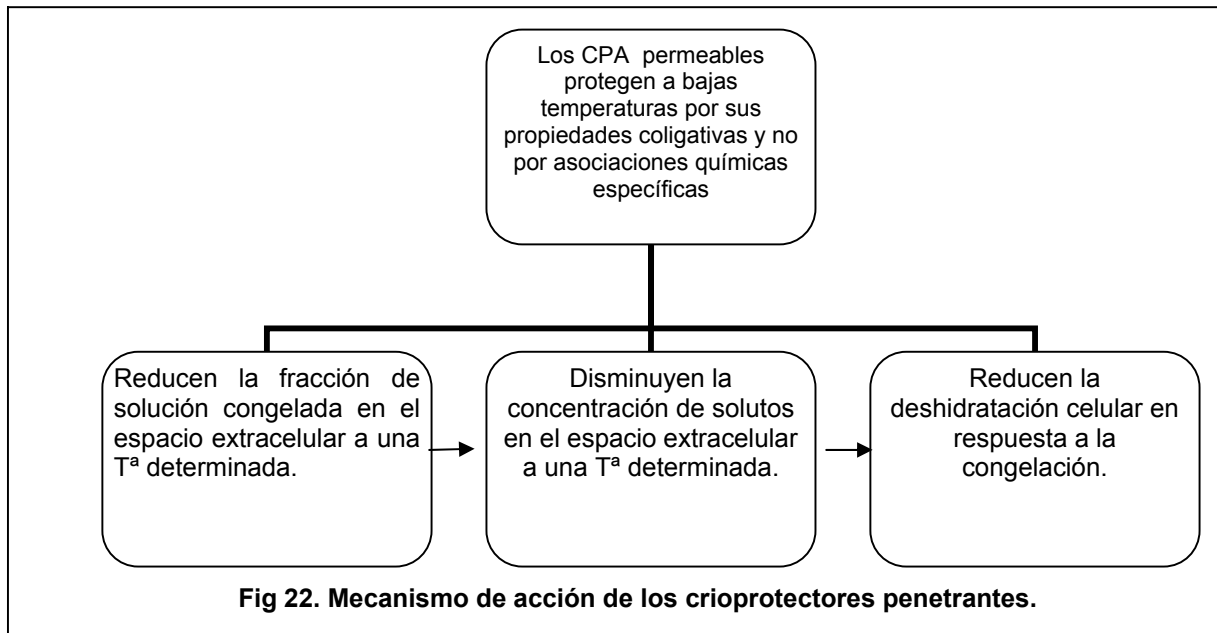
Los crioprotectores pueden clasificarse en agentes penetrantes y no penetrantes, de acuerdo a la permeabilidad a través de la membrana celular⁸⁹.

- i) Los ACP penetrantes son sustancias de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana, que protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta. Los más utilizados son: 1,2-Propanodiol (PROH), Dimetilsulfóxido (DMSO), Etilén-Glicol (EG), Glicerol.

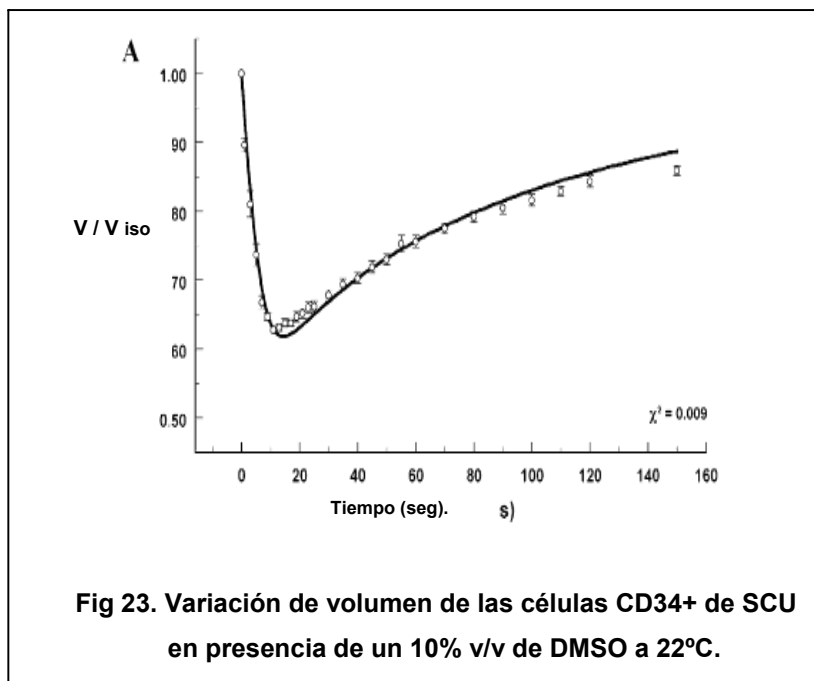
Si bien la célula es permeable a estos agentes su permeabilidad nunca es de la misma magnitud que la del agua.

- ii) Los ACP no penetrantes son sustancias de alto peso molecular, que son efectivas cuando se utilizan velocidades altas de congelación. No son crioprotectores propiamente dichos, ya que no penetran en la célula sino que ejercen su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son: Sacarosa, Glucosa, Dextrosa, Polivinil-pirrolidona (PVP), Dextrano. Polietilen-glicol (PEG).

Dependiendo de la permeabilidad del crioprotector utilizado y de su citotoxicidad, la adición se realiza a 4°C, 37°C o a temperatura ambiente. Los agentes crioprotectores pueden añadirse y extraerse en pasos, es decir aumentando (o disminuyendo) gradualmente la concentración de crioprotector en el medio, lo que reduce el stress osmótico sobre la célula a congelar; o bien añadirse (o extraerse) en un solo paso, lo que reduce el tiempo de exposición celular al crioprotector. Las técnicas utilizadas actualmente para uso clínico se han definido empíricamente para obtener la máxima viabilidad celular

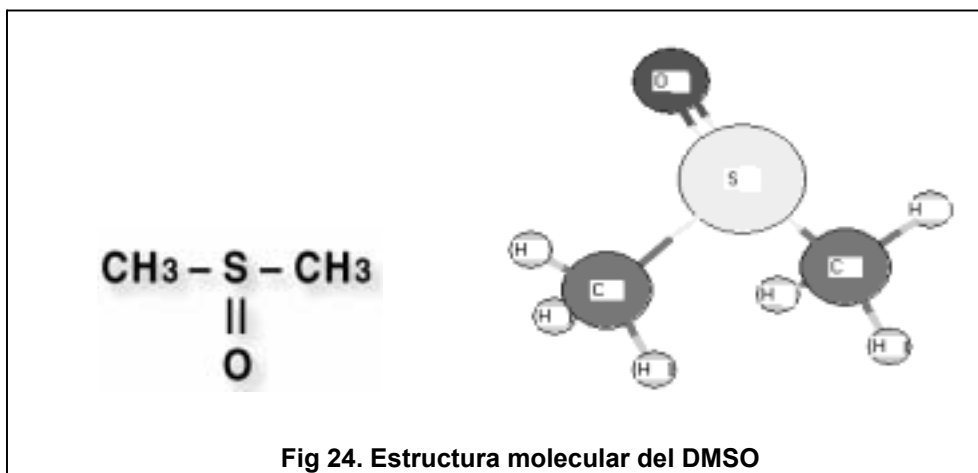


La adición de ACP ejerce *per se* un estrés osmótico sobre las células porque aumentan la osmolaridad del medio. Las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los ACP y después se hidratan a la vez que el agua vuelve al interior celular junto con el ACP (permeable) (Fig 23).



II.3.4.A) DMSO (Dimetil Sulfoxido).

El DMSO (C_2H_6SO) es el crioprotector más utilizado en la congelación de progenitores hematopoyéticos de cualquier fuente ⁹⁰. El DMSO puro es un líquido incoloro e inodoro con una densidad de 1.108 g/cm^3 y un peso molecular de 78.13 g/mol . La vida media del DMSO en plasma es de 20 horas aunque el $DMSO_2$ (sulfato de dimetilo), resultante del metabolismo del DMSO, tiene una vida media de 72 horas y es excretado vía renal ⁹¹. Una pequeña proporción del DMSO se reduce a sulfuro de dimetilo (DMS) que es excretado a través de la respiración durante 24 horas después de la infusión (origen del olor característico, aliento y piel, que aparece durante la infusión).



La concentración óptima para la criopreservación de progenitores hematopoyéticos parece ser la de un 10% v/v aunque concentraciones del 5% v/v ⁹² y combinaciones con HES (5% / 6%) también han sido reportadas con buenos resultados postdescongelación ⁹³. En este sentido es de destacar un ensayo clínico con 12 pacientes comparando la criopreservación con DMSO/HES y DMSO en el que no se observaron diferencias significativas en la recuperación hematológica ⁹⁴. Finalmente, el DMSO se utiliza como crioprotector acompañado en la mayoría de los casos de una fuente de proteína (albúmina plasmática), autóloga o no, a una concentración final del 2%-5% v/v.

II.3.4.B) Toxicidad del DMSO

Podemos considerar la toxicidad del DMSO a dos niveles; toxicidad sobre las células criopreservadas (toxicidad celular) y toxicidad relacionada con la infusión. Así, debemos diferenciar entre los mecanismos que disminuyen la viabilidad y/o capacidad clonogénica de los progenitores hematopoyéticos en presencia de DMSO y la reacción fisiológica resultante de la infusión de este.

II.3.4.B.1) Toxicidad química.

Los resultados experimentales publicados en referencia a la toxicidad química del DMSO sobre las células son contradictorios. Así, aunque existe una creencia generalizada de que el DMSO es tóxico a temperatura ambiente y no lo es a 4°C, diversos autores reportan resultados a favor y en contra de esta teoría.

En 1978 Goldman ⁹⁵ publica que la capacidad clonogénica en MO descongelada disminuye en presencia de un 10% de DMSO y que esta puede ser prevenida con una dilución volumen:volumen en salino, sugiriendo que el choque osmótico tras una dilución brusca de las CPH descongeladas y la hiperosmolaridad son los factores responsables de este fenómeno. En 1982 Douay ⁹⁶ reporta la pérdida de un 15% de la capacidad clonogénica en MO descongelada y la atribuye a la toxicidad química del DMSO a 4°C, sin embargo, estudios más recientes muestran como concentraciones de DMSO del 8%-10% tienen poco o ningún efecto sobre la capacidad clonogénica de las CPH de MO y Sangre periférica. Así, Rowley en 1993 ⁹⁷ publica que la exposición de una hora de CPH de MO y SP al DMSO (8 -10%) no afecta a la capacidad clonogénica pero que si la exposición es durante 14 días (cultivo clonogénico) no existe formación de colonias. Adicionalmente, en 1994 Branch ⁹⁸, reporta que la exposición de CPH de MO descongelada a un 8% de DMSO durante dos horas no tiene un efecto significativo en la recuperación de colonias.

En definitiva, los resultados de recuperación de colonias clonogénicas de un descongelado podría estar más relacionado con la hiperosmolaridad, y más concretamente con el cambio brusco de esta, que con la toxicidad directa del DMSO, por lo menos en periodos de hasta dos horas, aunque las condiciones de osmolaridad parece que sí son deletéreas a largo plazo.

II.3.4.B.2) Toxicidad asociada a la infusión.

La infusión del DMSO residual del proceso de criopreservación ha sido relacionada directamente con diversas reacciones adversas durante la infusión y está aceptado que estas son dependientes de la dosis de crioprotector administrada en la transfusión ⁹⁹⁻¹⁰¹. Estas complicaciones van desde mareos hasta fallos renales agudos y paradas cardíacas, aunque las complicaciones más frecuentes son las náuseas, el vómito, el dolor abdominal y los escalofríos ^{102,103}. Estos síntomas, que no son totalmente prevenidos con la premedicación administrada antes de la infusión, desaparecen después de la infusión.

Otras complicaciones como las variaciones de presión sanguínea, la disnea y la toxicidad cardíaca también se han asociado a la administración del DMSO ^{104,105}. En este sentido, Alessandrino ¹⁰⁰ reporta

que la incidencia de la hipertensión fue del 36% en un estudio con 75 pacientes sometidos a TPH. Aunque poco frecuentes, también se han publicado complicaciones neurológicas¹⁰⁶ en pacientes que han recibido CPH criopreservadas. Así, se han descrito episodios de amnesia global transitoria en 3 pacientes de una serie de 179 sometidos a TPH, sugiriendo que aunque inusual, la infusión de DMSO puede resultar en isquemias cerebrovasculares severas secundarias a una toxicidad neurológica severa, tal y como se había sugerido anteriormente en trabajos fuera del contexto del TPH¹⁰⁷.

Todos estos síntomas coincidieron con la infusión de los CPH criopreservados y parece improbable por tanto que provengan únicamente de la quimioterapia previa a la que se sometieron los pacientes. Por otra parte, aunque se atribuyen al DMSO, la aparición de estas complicaciones puede estar influenciada por otros factores como la infusión de los restos celulares y de citoquinas provenientes de las células muertas o dañadas. En este sentido, las reacciones febriles pueden provenir de la infusión de agregados de glóbulos blancos y la bradicardia y la hemoglobinuria reportadas tras la infusión de MO pueden estar relacionadas con la contaminación de glóbulos rojos y la consecuente liberación de hemoglobina, electrolitos y “debris” celulares¹⁰⁸.

Se ha sugerido que los restos celulares y la baja temperatura de los productos hematopoyéticos infundidos podrían provocar perse repuestas vagales, alteraciones electrolíticas locales y expansiones de volumen que estarían asociadas a un ritmo cardíaco ralentizado y que por tanto podrían dar origen a las complicaciones cardiovasculares observadas durante la infusión de los CPH descongelados^{104,109}. Adicionalmente, la premedicación antihistamínica para prevenir la liberación de histamina inducida por el DMSO podría causar por si misma bradicardia. Por tanto, la patogénesis de muchas de las complicaciones observadas durante la infusión de CPH descongelados puede ser multifactorial.

II.3.5 Respuesta osmótica de las CPH.

En esta sección se presentan las características osmóticas de los progenitores hematopoyéticos en respuesta a los cambios físico químicos que tienen lugar durante los procesos de congelación y descongelación. Por razones didácticas se han evitado intencionadamente las expresiones matemáticas complejas que explican estos procesos y se muestran únicamente resultados publicados para ilustrar el comportamiento de las células CD34+ durante la criopreservación.

II.3.5.A) Parámetros biofísicos.

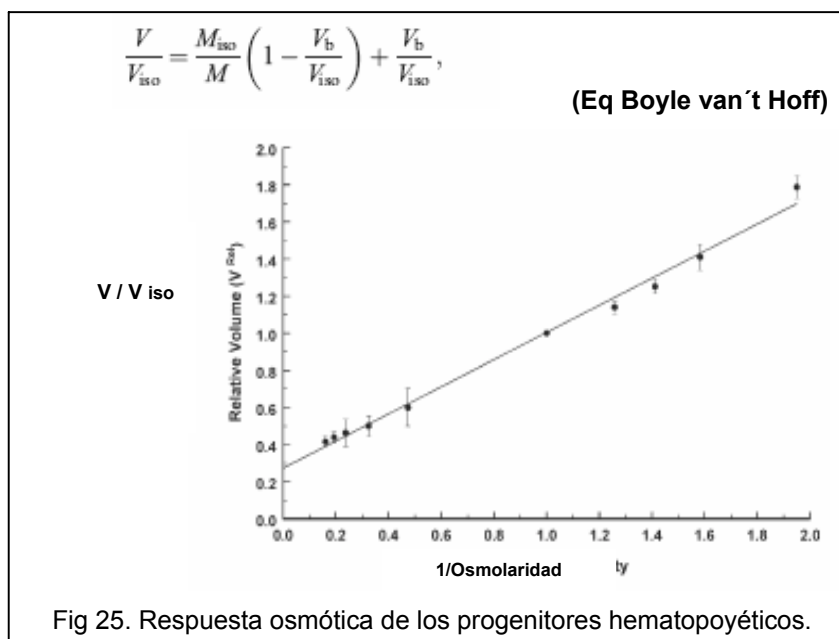
Los movimientos de agua y crioprotector a través de la membrana celular durante la criopreservación se rigen por diversos parámetros biofísicos que deben ser definidos para cada tipo celular y temperatura y son los que establecen los límites físicos que aseguran la supervivencia celular en los procesos de introducción y eliminación del crioprotector así como durante la congelación/descongelación. Los más importantes son el volumen osmóticamente inactivo y la permeabilidad de membrana.

El **volumen osmóticamente inactivo** de una célula define el agua que nunca dejará el interior celular en respuesta a un aumento de concentración de solutos en el espacio extracelular por estar asociado a las macromoléculas y estructuras intracelulares, este volumen está relacionado con la hipótesis de volumen mínimo de Marymann. Para las células CD34+ de SCU se ha definido en un 0.2 - 0.36 del volumen de la célula en condiciones isotónicas¹¹⁰. Este volumen se ha calculado en $0.27 \times 10^{-10} \text{ cm}^3$ mientras que el volumen medio en condiciones isotónicas para estas células es de $2.38 \times 10^{-10} \text{ cm}^3$ ¹¹¹. Por tanto, si la deshidratación celular llega al volumen osmóticamente inactivo, aproximadamente el 60% del volumen celular en condiciones isotónicas, se somete a la célula a un estrés osmótico que puede comprometer su viabilidad.

La permeabilidad de membrana a los diferentes solutos presentes en solución define el comportamiento osmótico de la célula a una temperatura y concentración de solutos determinadas. La permeabilidad del agua en las células CD34+ es de $5 \times 10^{-3} \text{ cm/min}$ mientras que la del DMSO es de $0.91 \times 10^{-3} \text{ cm/min}$ a 20°C.¹¹⁰ Esta permeabilidad se reduce una cinco veces a temperaturas de 1.5°C^{111,112}.

La diferencia entre permeabilidades explica que ante un gradiente de concentración intra-extra celular siempre son las moléculas de agua las primeras que atraviesan la membrana, cinco veces más rápidamente, y por tanto las que determinan principalmente el volumen celular. Los iones como el Na+, debido a su carga, tienen una permeabilidad varios órdenes de magnitud menor, del orden de $0.6 \times 10^{-10} \text{ cm/min}$ ⁷⁸. Como dato curioso, el volumen de una célula pasa a un 130% de su volumen isotónico en menos de 10 segundos cuando se diluye de forma abrupta la solución circundante compuesta por un 1M DMSO¹¹⁰.

Las células CD34+ se comportan como osmómetros ideales en el intervalo de osmolaridades de 160-1800 mOsm/L ¹¹¹. Por tanto estas células variaran su volumen, en respuesta a los cambios osmóticos extracelulares en el rango indicado siguiendo la ecuación de Boyle van't Hoff donde, V=volumen celular; M=molaridad, V_b=volumen osmóticamente inactivo y iso= condiciones isotónicas (Fig 25). Así, las células pierden o captan agua según se expongan a condiciones hipo o hiperosmóticas respectivamente.



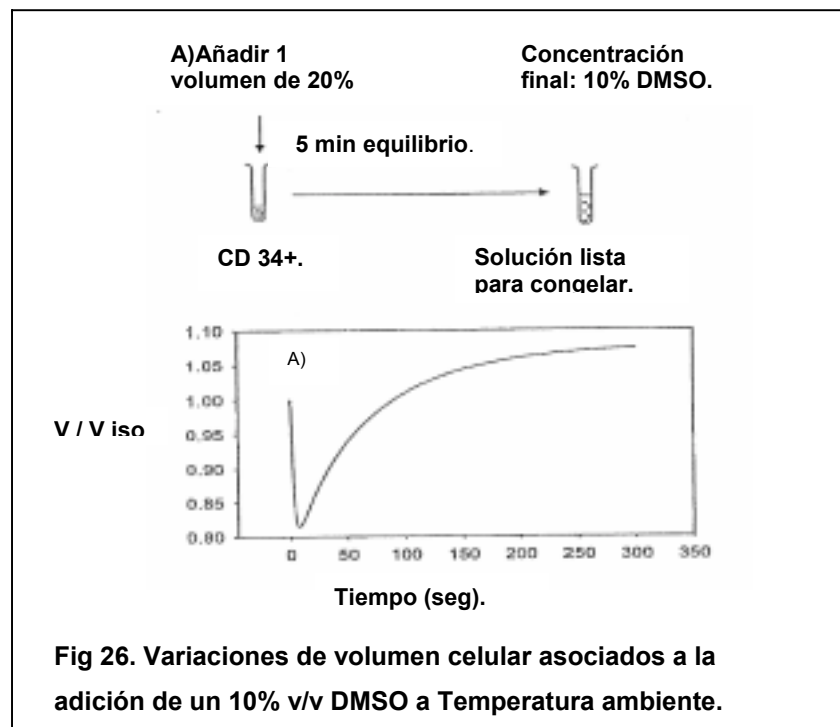
Este tipo de respuesta osmótica es la que permite calcular, para los rangos de osmolaridad dentro de la linealidad, los parámetros biofísicos descritos anteriormente así como los cambios de volumen biológicamente seguros durante la congelación y descongelación celular.

Los límites de seguridad que garantizan el mantenimiento estructural de las membranas plasmáticas de los progenitores hematopoyéticos de SCU se han definido, ensayando la capacidad clonogénica después de la exposición a diferentes osmolaridades extracelulares, entre un 40%-140% del volumen celular en condiciones isotónicas ^{110,111}. Por tanto cualquier proceso o manipulación que sobrepase los límites descritos de expansión/reducción del volumen celular producirá, teóricamente, un daño estructural en la membrana que conducirá a la muerte celular.

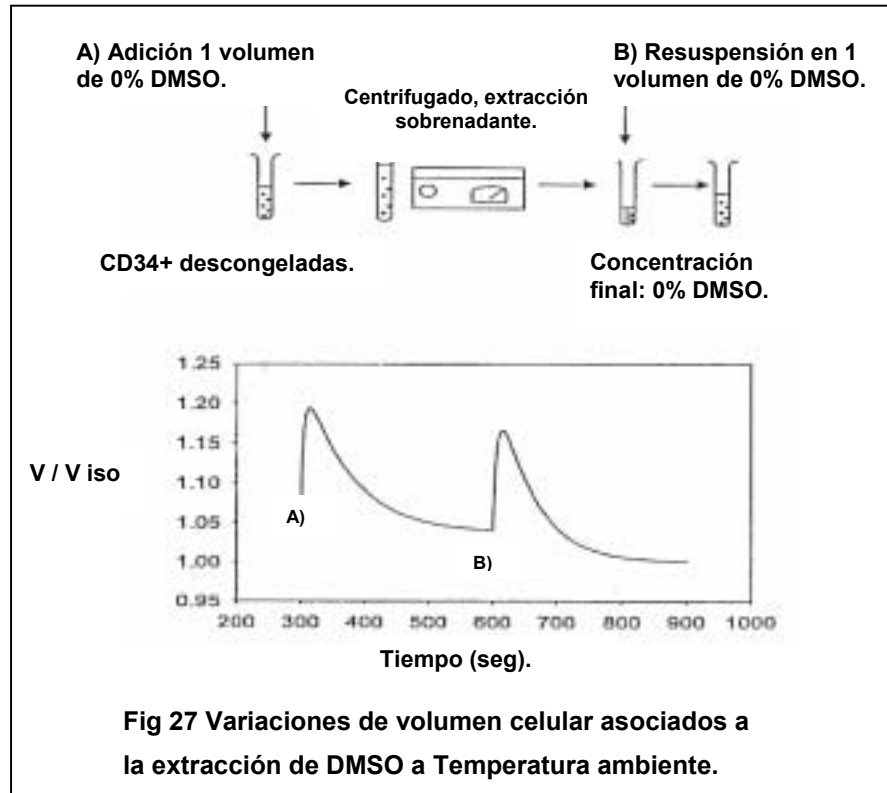
II.3.5.B Respuesta volumétrica celular.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la introducción-extracción de crioprotector produce cambios de volumen en las células en respuesta a los cambios de concentración de la solución circundante. A continuación se muestran las variaciones de volumen calculadas según la ecuación de Boyle van't Hoff ¹¹⁰ (Fig 26, Fig 27).

II.3.5.A.1) Adición del crioprotector:



La adición de DMSO a una suspensión celular se realiza mediante la dilución 1:1 en una solución al 20% vol/vol de DMSO (Fig 26.A) que provoca una deshidratación celular inicial muy rápida debida al aumento de solutos en el medio. Esta situación va revirtiendo a medida que el ACP se equilibra a lado y lado de la membrana celular. Tras cinco minutos de equilibrio y a causa del aumento de soluto en el interior celular, existe un ligero incremento del volumen celular respecto al volumen en condiciones isotónicas.

II.3.5.A.2) Extracción del crioprotector:

La extracción del ACP se basa en la dilución 1:1 de la suspensión celular descongelada en un medio ligeramente hipertónico sin DMSO. Esta dilución reduce la concentración de DMSO extracelular hasta el 5% (10% en el interior celular) y provoca una entrada de agua a la célula que se traduce en un aumento del volumen celular (Fig 27.A). Durante los cinco minutos de equilibrio posteriores, el DMSO tiende a equilibrarse entre el interior y el exterior celular por lo que sale de la célula junto con moléculas de agua (Fig 27. Paso de A) a B)). La suspensión celular es posteriormente centrifugada, el sobrenadante extraído y es finalmente diluida en medio sin DMSO (Fig 27. B) repitiéndose el paso de hidratación inicial (ahora 0% DMSO en el exterior celular y 5% DMSO en el interior) y el de equilibrio posterior (hasta alcanzar una concentración de 0% DMSO en el interior celular).

II.3.5.C) Retorno a condiciones fisiológicas.

La descongelación del producto hematopoyético criopreservado es el último proceso antes de la infusión en el paciente. Los eventos físico químicos y la respuesta celular durante este proceso se han detallado en secciones anteriores (ver II.3.1, II.3.5.2). Simplemente añadir que este proceso se realiza mediante la inmersión del injerto hematopoyético en un baño a 37°C aplicando un suave masaje sobre la bolsa hasta que no queda hielo visible. Este proceso de descongelación rápida ($> 100^{\circ}\text{C}/\text{min}$) evita la recristalización del agua, asociación de pequeños cristales de hielo que al unirse pueden crecer en tiempos muy cortos y dañar las membranas mecánicamente ¹¹³. Si se han formado cristales microscópicos durante la congelación y debido a que estos tienen un estado de energía libre mayor que los cristales de más tamaño, al descongelarse tenderán a asociarse entre ellos para obtener un estado energético menor (termodinámicamente favorable) fusionándose y formando cristales de mayor tamaño que pueden perforar la membrana plasmática ¹¹⁴.

Una vez las células criopreservadas han sido descongeladas, la exposición prolongada a un ambiente hiperosmótico junto con una vuelta descontrolada en condiciones isotónicas mientras la célula está reparando posibles daños en su membrana y reiniciando un metabolismo normal resulta en una entrada masiva de agua en la célula que puede llevar a la ruptura de la membrana y por tanto a la muerte celular ¹¹⁵. Cuando enfrentamos un producto hematopoyético descongelado a una solución isotónica, la gran concentración intracelular de DMSO conducirá una introducción de agua del medio circundante a través de la membrana. En consecuencia, las células se expandirán para igualar la concentración del crioprotector a lado y lado de la membrana al mismo tiempo que el DMSO difundirá hacia el exterior celular que presentará una concentración menor de crioprotector. Como las células descongeladas son infundidas inmediatamente post descongelación en la mayoría de instituciones, el plasma del paciente será la solución circundante que tendrá una concentración de DMSO igual a cero.

El Dextrano 40 y las proteínas (moléculas que asocian agua a su estructura molecular) pueden ayudar al control del flujo de entrada de agua en las condiciones descritas ¹¹⁶. Para evitar el choque osmótico en el momento de la reinfusión, entrada en plasma, 300mOsm/L, se ha propuesto un valor máximo de 500 mOsm/L para la suspensión celular descongelada. ⁹³ antes de su entrada en plasma.

II.3.5.D) Lavado celular post descongelación:

La infusión directa de los productos hematopoyéticos descongelados está asociada a diversas complicaciones que varían desde las frecuentes náuseas y vómitos hasta las inusuales pero reportadas complicaciones cardiovasculares y neurológicas (ver II.3.4.1). Estas complicaciones relacionadas con el trasplante se conocen con el término toxicidad asociada al trasplante de progenitores y se atribuyen a la infusión de DMSO y de restos celulares.

Para reducir y/o evitar la toxicidad asociada al TPH se han propuesto diversas aproximaciones; la criopreservación a altas concentraciones de células nucleadas⁷⁷, el uso de menos DMSO en las soluciones de criopreservación^{117,118}, la mezcla de crioprotectores¹¹⁹, el fraccionamiento de las infusiones¹²⁰ y la selección de células progenitoras para reducir el volumen de producto criopreservado¹²¹. Sin embargo, todas estas técnicas resultan en una reducción limitada de crioprotector y de los restos celulares y moléculas resultantes de la lisis celular post descongelación.

Alternativamente, se ha propuesto la eliminación del DMSO antes de la infusión mediante técnicas de centrifugación y extracción de volumen tanto manual^{122,123} como semiautomática¹²⁴. En estas técnicas el sobrenadante que contiene parte del DMSO es descartado tras la centrifugación y el "pellet" que contiene las células es resuspendido en un medio isotónico antes de la infusión. Los resultados reportados al respecto son variables y casi siempre resultan en poca eliminación del DMSO y nada o casi nada de reducción de los "debris" celulares. Además, estas técnicas pueden resultar en una pérdida sustancial de progenitores comprometiendo la probabilidad de injerto y por tanto deben considerarse con cautela.

Por tanto, el uso de sistemas automáticos de lavado celular postdescongelación que aseguren una recuperación celular aceptable, que produzcan resultados reproducibles y funcionen en sistemas cerrados podría ser de gran utilidad para aminorar los efectos de la infusión directa de productos hematopoyéticos descongelados.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

La principal diferencia entre un producto hematopoyético en fresco y el mismo descongelado es la hipertonicidad de la suspensión celular. La hipertonicidad de las soluciones celulares descongeladas se debe a la presencia de crioprotector y de solutos intracelulares que provienen, estos últimos, de la lisis celular durante la descongelación. Esta gran concentración de solutos, el hecho de que las células se comporten como osmómetros en respuesta a cambios de osmolaridad y las restricciones de fluidez de los lípidos de membrana a bajas temperaturas hacen que se puedan superar los límites físicos de las membranas celulares al efectuar cualquier manipulación que implique un cambio brusco de osmolaridad, incluidas aquellas que forman parte de los protocolos de control de calidad.

Dentro de los controles de calidad de un producto celular, la CMF es la herramienta más útil para la cuantificación de poblaciones celulares específicas. Sin embargo no se utiliza rutinariamente en el análisis de productos hematopoyéticos descongelados porque los resultados de recuento y viabilidad celulares se ven sensiblemente reducidos siendo el choque osmótico producido durante la dilución directa post descongelación en soluciones hiposmóticas (lisis de eritrocitos) la principal causa de esta disminución en la integridad de membrana.

Por último, la evidencia de que el cambio brusco de osmolaridad sobre las células descongeladas afecta su viabilidad puede extenderse al momento de su entrada en la circulación sanguínea. Por tanto, si el cambio de osmolaridad que representa la entrada en plasma afecta negativamente al estado de las células infundidas, estas pueden perder potencial funcional. En consecuencia, la utilización de técnicas de eliminación del crioprotector y de restos celulares antes de la infusión rendiría un producto isotónico con el que se minimizaría el choque osmótico sobre el injerto hematopoyético durante la infusión.

Así, los objetivos concretos de este trabajo experimental son:

OBJETIVO 1-Evidenciar y cuantificar el efecto del choque osmótico (simulado mediante dilución directa de las células descongeladas) sobre el recuento, viabilidad y capacidad clonogénica de productos hematopoyéticos descongelados.

OBJETIVO 2-Proponer una técnica de manipulación de muestras descongeladas para prevenir el choque osmótico.

OBJETIVO 3-Proponer y validar una técnica de CMF para el recuento de progenitores hematopoyéticos descongelados en el que se minimice el efecto del choque osmótico durante la etapa de lisis de eritrocitos.

OBJETIVO 4-Validar el lavado automático de productos hematopoyéticos descongelados para uso clínico así como cuantificar el efecto que la presencia del crioprotector tiene sobre la recuperación celular in vitro a lo largo del tiempo

MATERIAL Y MÉTODOS

I- SOLUCIONES

Durante el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral se hace referencia a diversas soluciones y a la dilución de las muestras descongeladas en estas para simular el efecto del choque osmótico (cambio brusco de osmolaridad) post descongelación. A continuación se muestra la composición de estas soluciones.

DEXTRANO 40.

Rheomacrodex 10 % Salino (500mL) (Fresenius Kabi, España).

Composición por cada 100 mL:

Dextrano de peso molecular medio 40000	10.0 g
Cloruro sódico (NaCl)	0.9 g
Agua para inyección	c.s.

ALBÚMINA HUMANA.

Albúmina humana Grifols® al 20% (50 mL) (Grifols, España).

Composición por cada mL:

Albúmina humana	0.200 g
Caprilato sódico	0.016 mmol
N-acetilriptofanato sódico	0.016 mmol
Contenido Al	≤ 200µg / L.
Agua para inyección	c.s.

El contenido de Na⁺ está comprendido entre 130-160 mmol/L y el de K⁺ es inferior a 2 mmol /L. Cada 50 mL contienen 10 g de Albúmina humana equivalentes osmóticamente a 200 mL de plasma.

SUERO FISIOLÓGICO.

Fisiológico Braun (500mL) (Braun Medical, España).

Solución isotónica de cloruro sódico al 0.9%.

Composición por cada 100 mL:

Cloruro sódico		0.9 g	
Agua para inyección			c.s.
	mEq/L	mg/100mL	
Na ⁺	154	354	
Cl ⁻	154	546	

PBS.

Phosphate Buffered Saline without Ca²⁺ Mg²⁺. (500mL) (Invitrogen, Carlsbad, CA)

Composición:

	mg/L	mM
KCl	200	2.67
KH ₂ PO ₄	200	1.47
NaCl	8000	137.9
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	2160	8.06
Agua para inyección	1000	

SOLUCIÓN DEXTRANO ALBÚMINA.

La solución Dextr-Alb se preparó según la siguiente fórmula:

Para 300mL de Dextr-Alb:: 225 mL Dextrano 40 + 75 mL Albúmina humana 20%

La concentración final de los dos componentes fue de un 7.5% de Dextrano 40 y un 5% de Albúmina humana. Esta solución se prepara para diluciones 1:1 de sangre periférica o de cordón umbilical, por lo que una vez diluidas las concentraciones son 3.75% v/v de Dextrano 40 y 2.5% v/v de Albúmina humana. La mezcla directa de los dos componentes de la solución aporta el agua estéril necesaria para la dilución. Esta solución se preparó para cada procedimiento experimental y se utiliza preenfriada a 4°C.

PBA 1%

Se refiere a una solución de PBS al 1% v/v de Albúmina.

Composición por cada 100mL:

PBS	95 mL.
Albúmina 20% v/v.	5 mL.

Esta solución se preparó para cada procedimiento de dilución del descongelado y se utiliza preenfriada a 4°C

PBA 5%.

Se refiere a una solución de PBS al 5% v/v de Albúmina.

Composición por cada 100mL:

PBS	75 mL.
Albúmina 20% v/v.	25 mL.

Esta solución se preparó para cada procedimiento de dilución del descongelado y se utiliza preenfriada a 4°C

II- CITOMETRÍA DE FLUJO.

Conceptos básicos.

La Citometría de Flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparamétrico que se basa en hacer pasar una suspensión de células alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. La CMF determina parámetros relacionados con características intrínsecas de la célula (tamaño, complejidad de núcleo y citoplasma) y parámetros relacionados con sus características antigénicas (inmunofenotipo).

Las señales producidas por la interacción de las células con el haz de luz son de dos tipos: las señales de dispersión y las de fluorescencia.

Señales de dispersión: La dispersión resulta de la interacción de la luz con una partícula que produce un cambio de dirección (no de la longitud de onda) en todas las direcciones del espacio. Las características morfológicas que determinan la dispersión de la luz son fundamentalmente el tamaño celular (FSC, Forward Scatter) y el material granular del interior de la célula, llamado complejidad (SSC, Side Scatter).

Señales de Fluorescencia: Cuando un fluorocromo interacciona con la luz de excitación procedente del láser emite energía radiante. Debido a que parte de la energía se utiliza para la absorción, la luz emitida es de menor energía que la luz de excitación, es decir la longitud de onda emitida es mayor. La diferencia entre la longitud de onda de absorción y emisión se denomina Stokes shift. Los citómetros de flujo permiten detectar señales de fluorescencia procedentes de complejos Antígeno/Anticuerpo marcados con un fluorocromo y situados en una célula, siendo la cantidad de señal de fluorescencia emitida igual a la proporción de la cantidad de componentes fluorescentes de la partícula.

Determinación de CPH. Plataforma única

La determinación citométrica de células CD34+ se basa en la identificación fenotípica de células de tamaño (FSC) y complejidad (SSC) linfocítica, con un nivel de fluorescencia medio-bajo para CD45 y alta expresión de CD34+. Esta determinación se realiza a partir de células vivas mediante el marcaje de la muestra con 7AAD.

Actualmente se utilizan métodos de plataforma simple o única para la determinación celular por CMF. La plataforma única permite la adquisición de los eventos totales de una población específica directamente del citómetro sin utilizar los datos de recuento del contador automático (que sería la segunda plataforma). La determinación por plataforma única es un ensayo volumétrico en el que se determina el recuento de unas partículas de concentración conocida (beads) y se relaciona con el del subconjunto de células que queremos cuantificar, esto porque conocemos el volumen de muestra y de partículas en la muestra. Para ello, se dispensa (por pipeteo reverso para asegurar la precisión) en el tubo a analizar el mismo volumen de muestra que de partículas de concentración conocida. Así:

$$V_{\text{cell}} = V_{\text{beads}} \rightarrow [\text{cell}]/n^{\circ} \text{ cell} = [\text{beads}]/n^{\circ} \text{ beads} \rightarrow [\text{cell}] = n^{\circ} \text{ cell} \times ([\text{beads}]/n^{\circ} \text{ beads}).$$

Protocolo para la determinación de CPH en descongelados:

Este protocolo es idéntico al utilizado rutinariamente para muestras en fresco, protocolo de lisis y no-lavado por plataforma única, pero con una etapa de equilibrio osmótico previa al marcaje, lisis y adquisición de la muestra.

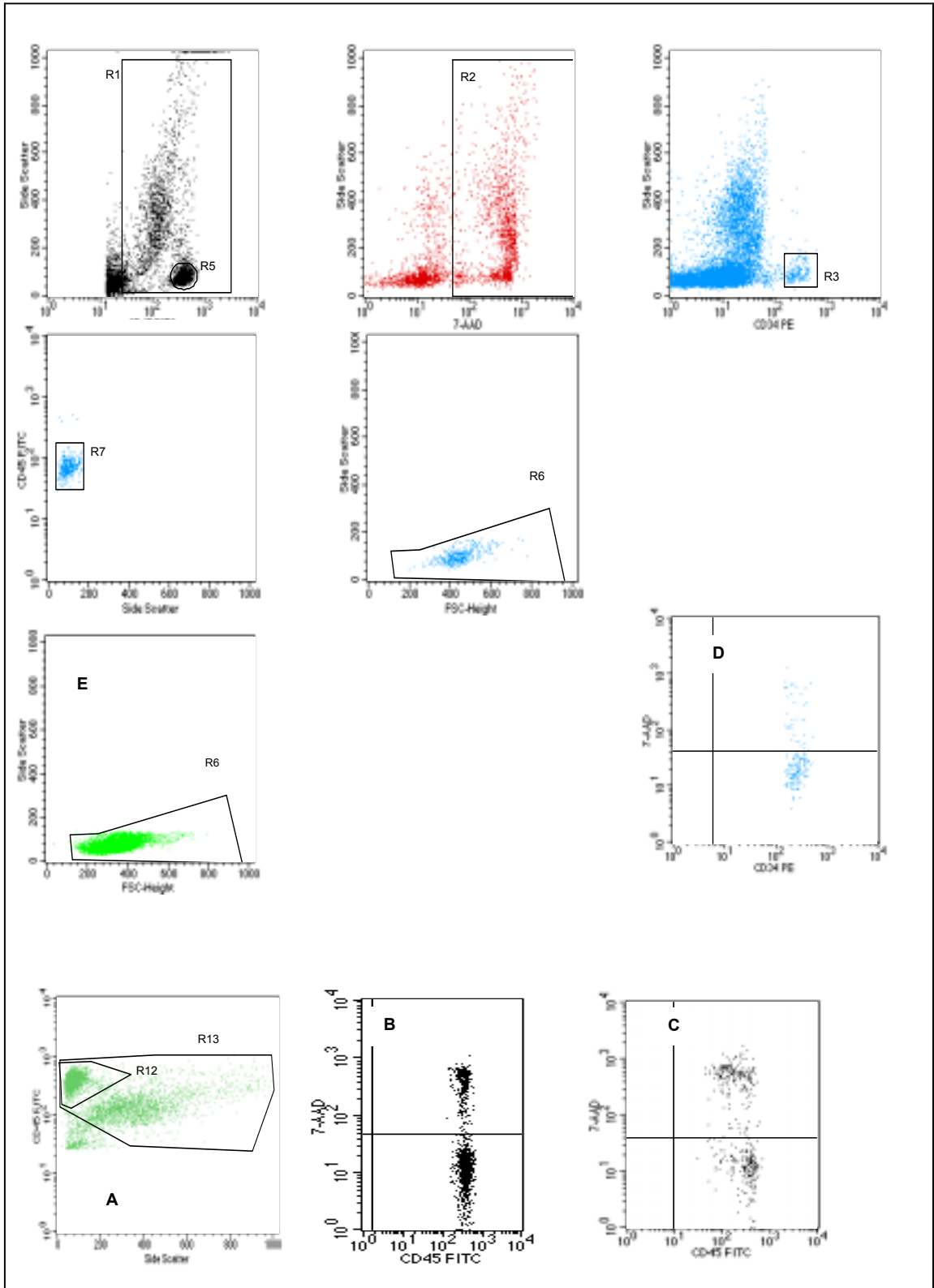
- 1- Dilución vol:vol de la muestra descongelada en solución Dextrano-Albúmina durante cinco minutos a 4°C .
- 2- Marcaje de la muestra (**vol.1**) con CD45-FITC y CD34-PE. 20 min, 4°C, Oscuridad.
- 3- Lisis de eritrocitos. (dilución 1/10 a 1/100). 10 min. 4°C, Oscuridad.
- 4- Adición de las partículas (**vol.2**) de concentración conocida (**vol.2= vol.1**).
- 5- Adquisición de la muestra.

A continuación se muestra el método de análisis para la determinación de CPH (ver figura página siguiente):

La región R1 contiene todas las células CD45+. Estas células son representadas según su marcaje para 7AAD (viabilidad) y los eventos que presentan defectos de membrana (R2) son excluidos del análisis posterior. En R3 están las células CD45+ vivas con más expresión para CD34 y de bajo SSC. Del total de las células en R3, las que presentan una expresión media-baja de CD45 (R7) y con un tamaño y complejidad linfoide (R6) son las que determinaran el recuento total de CPH. La viabilidad de estas células se determina representando R6 frente a 7AAD (D).

El tamaño (FSC) y la complejidad (SSC) linfoide se obtiene al representar los linfocitos (R5) frente a estos parámetros (R6, E). Finalmente, en el mismo análisis se determinan los linfocitos y granulocitos por FSC y SSC (A) para conocer la viabilidad linfoide (B), del total de las células CD45+ (C).

Análisis para la determinación de CPH

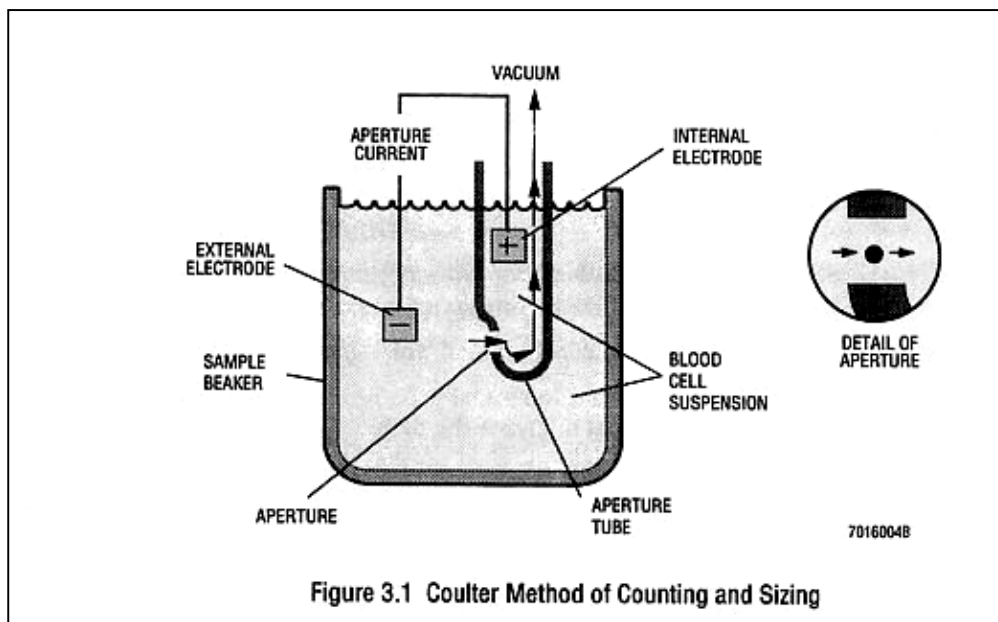


III- CONTADOR AUTOMÁTICO

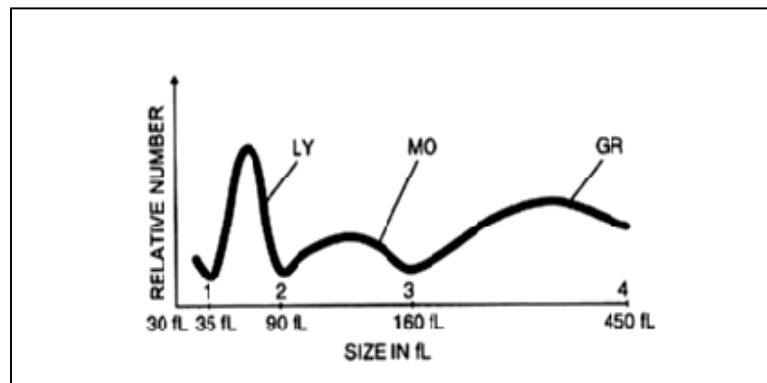
El contador ACT diff (Beckman Coulter) es un analizador hematológico automático para la cuantificación de leucocitos mediante el paso de las células a través de un pequeño orificio en el que se genera un pulso eléctrico y sobre el que las células producen un cambio de impedancia que es proporcional al tamaño celular. El número total de células contadas en cada determinación es aproximadamente cien veces mayor que el que se contaría por métodos de microscopía y reduce el error estadístico de la medida diez veces aproximadamente. El contador recuenta las células de cada muestra en dos ciclos, uno para el recuento de eritrocitos y el siguiente para los leucocitos

Principio general.

El contador ACT dic calcula el recuento y el tamaño celular detectando los cambios de resistencia eléctrica cuando una partícula pasa a través de las pequeñas aperturas de medida que incorpora el medidor. Cada partícula (núcleo celular) que pasa por la apertura impide el paso de corriente y crea un pulso eléctrico. El número de pulsos determina el número de células en la muestra mientras que la altura de cada pulso es proporcional al volumen celular. El analizador utiliza un recuento por triplicado antes de emitir el resultado. Este triplicado se realiza midiendo los pulsos emitidos durante 12 segundos en intervalos de 4 segundos, si existen discrepancias entre los tres recuentos el contador no emite resultados.



Existen diferentes aperturas de medida según el tipo celular, así existe una apertura para medir leucocitos y otra para medir glóbulos rojos. El volumen celular determinado durante cada recuento (en cada una de las aperturas) permite clasificar las partículas que pasan por la apertura de medida en leucocitos (WBC; white blood cells) si el pulso emitido representa volúmenes entre 35 fL y 450 fL, Eritrocitos (RBC, red blood cells) si el pulso emitido representa volúmenes mayores de 36 fL y plaquetas si el pulso emitido representa volúmenes entre 2 fL y 20 fL. A su vez, este contador también emite resultados para clasificar leucocitos en Linfocitos, Monocitos y Granulocitos según el tamaño de partícula siguiendo el criterio; Linfocitos (35-90fL), Monocitos (90-160 fL) y Granulocitos (160-450 fL).



Precisión del recuento.

Los parámetros de precisión fueron calculados después de 31 medidas consecutivas de la misma muestra.

Parameter	Level	Units	CV%	SD
WBC	6.0 - 15.0	$\times 10^3$ cells/ μ L	≤ 3.0	
RBC	3.00 - 6.00	$\times 10^6$ cells/ μ L	≤ 3.0	
Hgb	12.0 - 18.0	g/dL	≤ 2.0	
MCV	80.0 - 100.0	fL	≤ 3.0	
Plt	200 - 500	$\times 10^3$ cells/ μ L	≤ 7.0	
MPV	5.0 - 20.0	fL	≤ 3.0	
RDW	12.0 - 15.0	%	≤ 3.0	
LY	20 - 50	%		≤ 1.5
MO	2.0 - 10.0	%		≤ 1.5
GR	30.0 - 70.0	%		≤ 3.0

IV- DETERMINACIÓN DE DMSO POR HPLC EN PRODUCTOS HEMATOPOYÉTICOS DESCONGELADOS.

La determinación de DMSO en muestras descongeladas y en aquellas post lavado (tanto para CPH-A como para SCU) se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) siguiendo el método de Carpenter y Dawson (Cryobiology 1991).

El aparato de HPLC utilizado fue un Beckman System Gold HPLC (Beckman, San Ramon, CA) con entrada múltiple de solvente y acoplado a un detector de longitud de onda variable (Beckman-168, Beckman, San Ramon, CA). La columna utilizada fue una Ultrasphere ODS2 C18 (5 μ m) de 4.6 x 25cm. La fase móvil fue una solución 10% v/v en metanol de alta pureza. Para la determinación cromatográfica del DMSO, 20 μ l de cada muestra fueron inyectadas, con un flujo de 1.0 mL / min y el detector a 214 nm. Con estos parámetros, el pico de DMSO apareció a los 3 minutos de la inyección de la muestra. Antes de cada determinación, las muestras fueron diluidas para entrar en el rango en el que la medida de DMSO es lineal (recta de calibración). Las diluciones de la muestra se realizaron de la siguiente manera; las muestras descongeladas y no lavadas fueron diluidas 1/100 en solución de metanol 10% v/v en diluciones consecutivas 1/200 y 1/5 y siempre mediante pipeteo reverso. Las diluciones 1/10 de las muestras lavadas se realizaron con el mismo tampón y directamente.

Recta de calibración:

Antes de la determinación del contenido de DMSO en las muestras se calculó la recta de calibración que nos permitiría relacionar el **área de pico** de DMSO de cada muestra con el contenido de DMSO en **molaridad**. La recta de calibración se realizó determinando el contenido en DMSO de 5 muestras por triplicado y en un intervalo de 0.5 mM a 10 mM. Las muestras para la determinación de la recta de calibración se prepararon a partir de concentraciones molares de 0.1, 0.2, 0.4, 1 y 2 M y diluidas 1/200 antes de la determinación. La razón de este rango de concentraciones (0.5-10 mM) fue que a priori de este ensayo sabíamos (por valores de osmolaridad) que la eliminación de DMSO era prácticamente del 95% después del lavado y que la concentración mínima esperada en las muestras descongeladas era del orden del 10% v/v, por tanto una dilución 1/10 de la muestra post lavado tendría un valor aproximado de 7mM (5% de 1,4M, 0.07M), dentro del rango de linealidad de la recta patrón. La concentración máxima esperada en una muestra descongelada es del 10% v/v en DMSO o 1,4M, por tanto una dilución 1/1000 de estas muestras tendrían un valor aproximado de 1.4 mM, dentro del rango de linealidad.

Tabla. Datos recta de calibración para HPLC. Los resultados corresponden a la media de los triplicados realizados para cada punto de la recta.

[M]	[mM] / 200	Area	c.v.(n=3)
0.1	0.5	944868	0.6
0.2	1	1912671	2.6
0.4	2	3984907	2.9
1	5	8888802	1.2
2	10	17724917	5.5

[mM] / 200; se refiere a la concentración mM después de la dilución 1/200 en MetoH 10% de la muestra.
Área es el resultado que se obtiene del cromatógrafo para una concentración de DMSO determinada.

El coeficiente de variación medio de la técnica fue del 2.5% para las 5 concentraciones ensayadas por triplicado.

Fig 1. Recta de calibración del ensayo de HPLC (A) y situación de los picos de DMSO para cada punto de la recta (B).

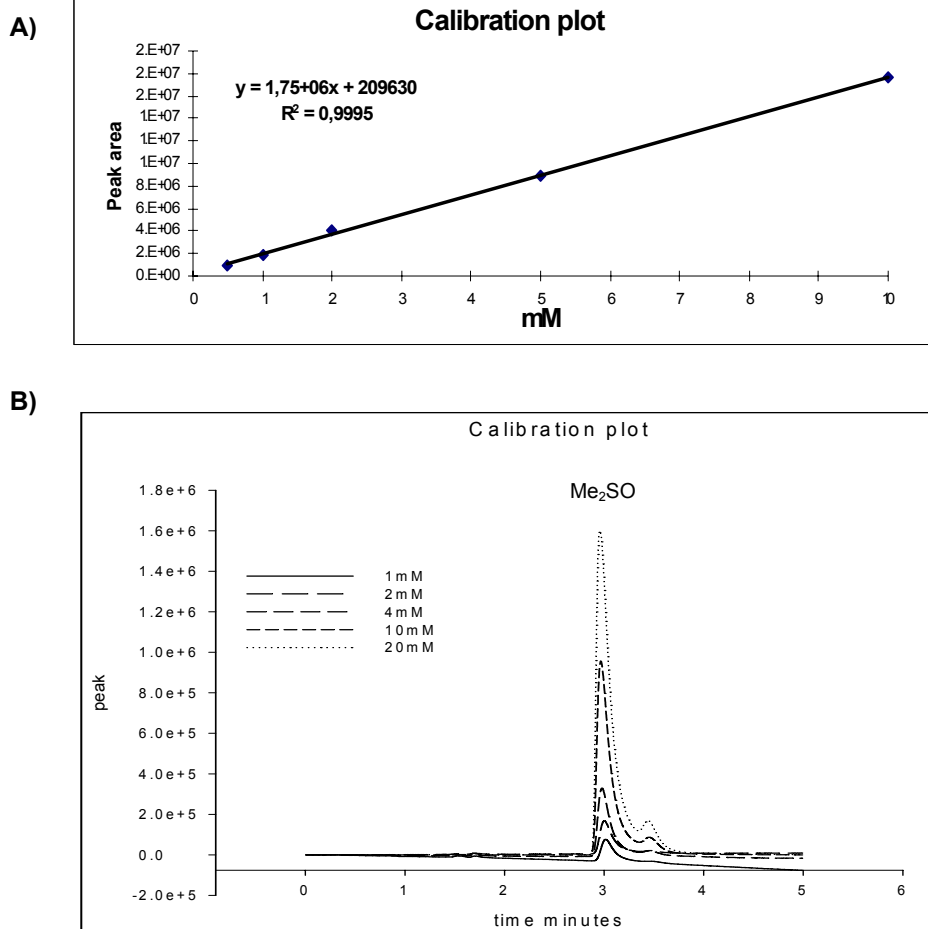
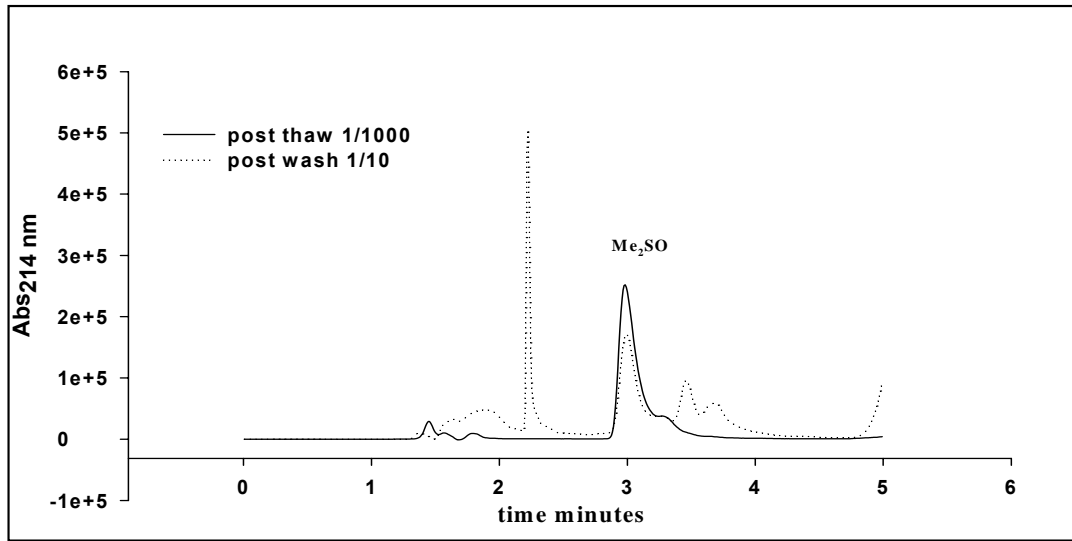
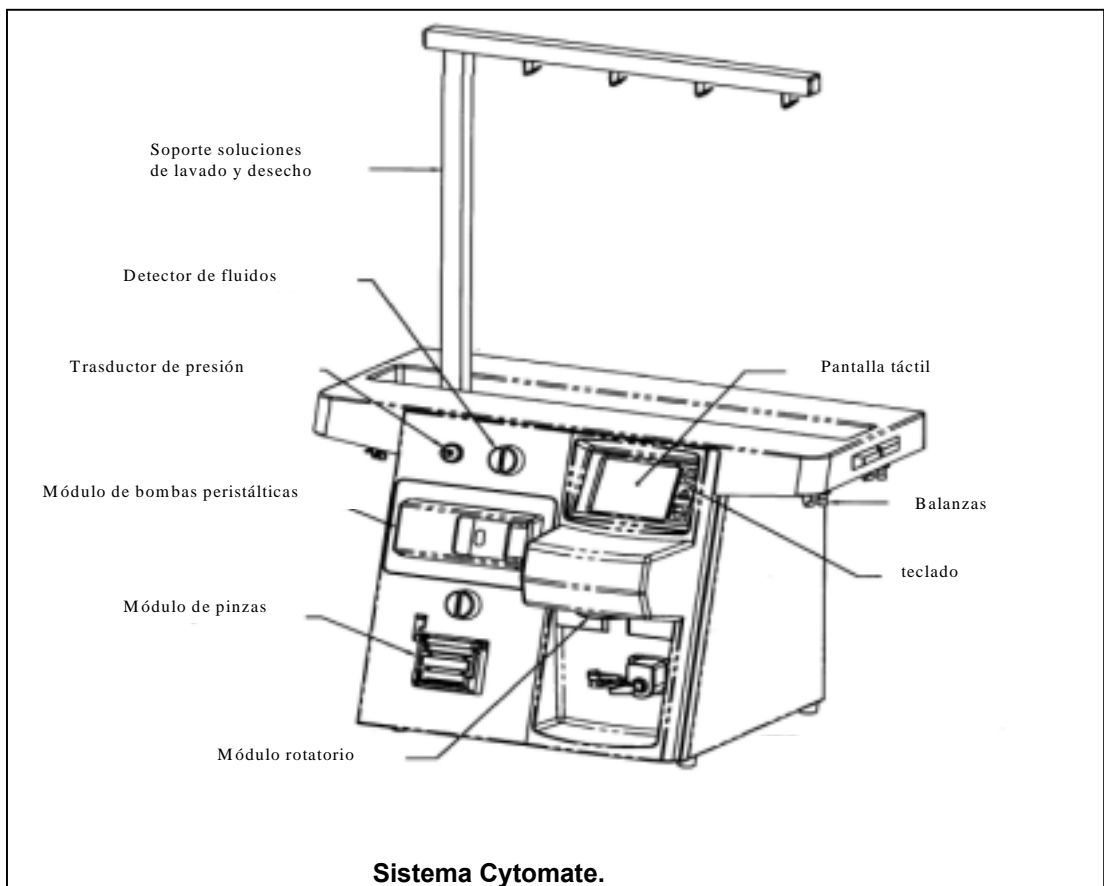


Fig2. Cromatograma típico de una muestra antes y después del lavado de DMSO.

V- SISTEMAS AUTOMÁTICOS DE LAVADO DE DMSO EN PRODUCTOS HEMATOPOYÉTICOS DESCONGELADOS

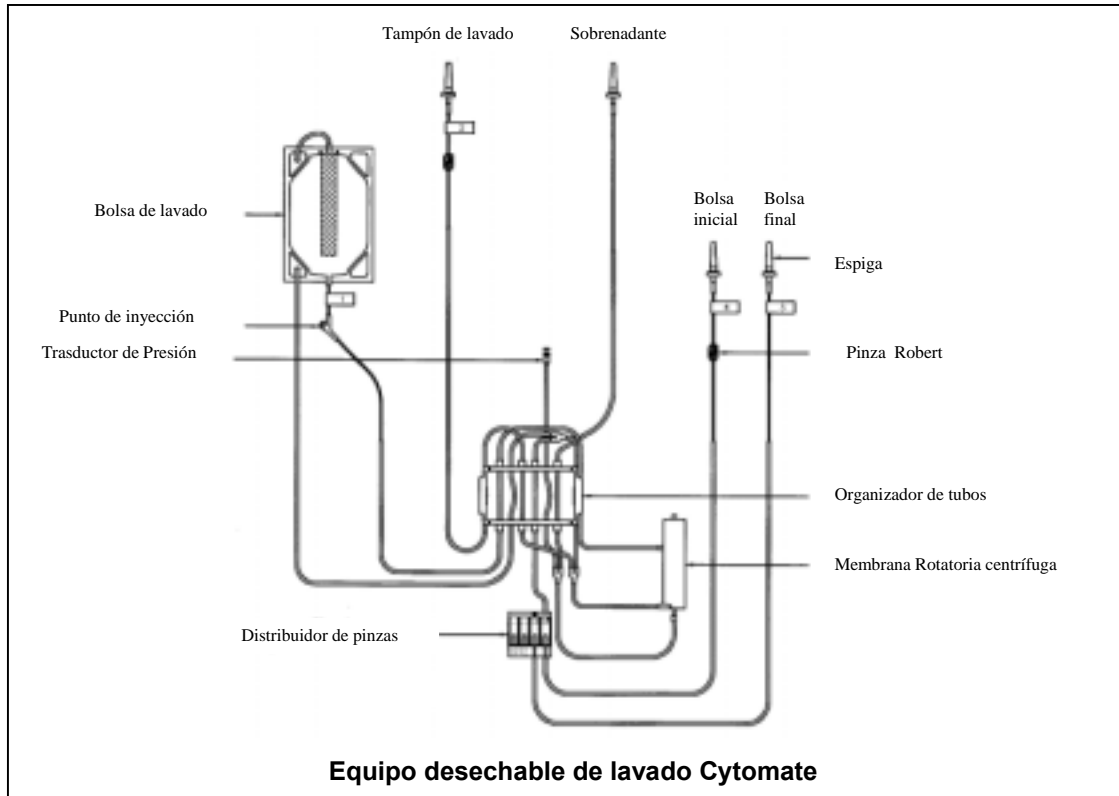
V.1- CYTOMATE.

Cytomate es un dispositivo totalmente automático diseñado para el lavado y concentración de productos leucocitarios. Este aparato se utiliza con un equipo desechable que incorpora una pequeña centrifuga, eliminando la necesidad de pasos de centrifugación externos y reduciendo así el tiempo de proceso y la intervención manual del operador. Consiste en un sistema cerrado que transfiere la suspensión celular por medio de bombas peristálticas desde una bolsa inicial a la membrana giratoria centrífuga en la que se elimina el sobrenadante libre de células a la vez que se concentra la suspensión celular. Las células pasan finalmente a una bolsa que retiene los agregados que se puedan haber formado durante el proceso para obtener así un producto final lavado listo para el trasplante.



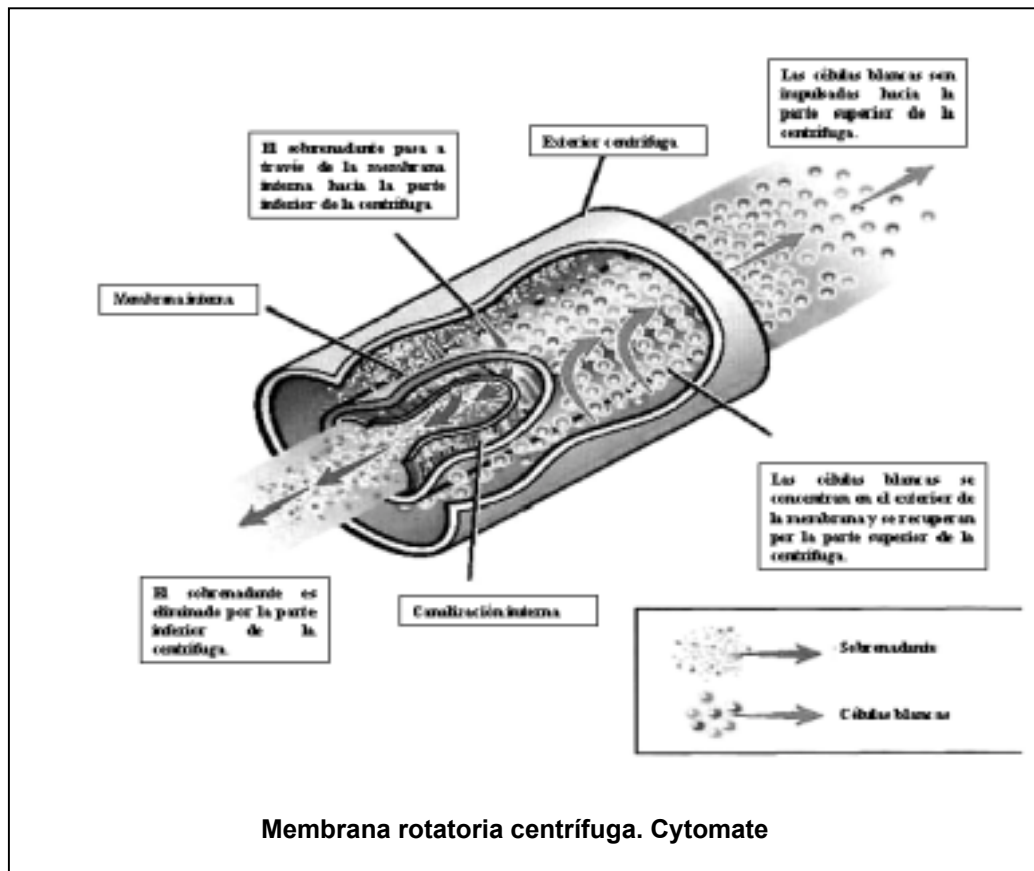
Equipo desechable:

Consiste en un equipo de tubos apirogénicos, estéril y de un solo uso al que se conectan la/las solución /es de lavado, el producto inicial, una bolsa para desecho (sobrenadante) y una bolsa para el producto final.

**Membrana rotatoria centrífuga:**

El proceso de lavado tiene lugar en la membrana giratoria centrífuga que incorporan todos los kits desechables para lavado celular en Cytomate. Esta membrana solo permite el paso de sobrenadante y restos celulares facilitando así la concentración de leucocitos en su interior.

La suspensión celular llega a la membrana por la parte inferior y el movimiento giratorio desplaza a las células hacia la parte superior desde donde pasan a la bolsa de lavado. En el interior de la membrana el sobrenadante resultante de la centrifugación, compuesto básicamente de glóbulos rojos, productos resultantes de la lisis celular, crioprotector y plasma, pasa al interior desde donde se canaliza, aprovechando el mismo movimiento centrífugo, a la parte inferior de la centrífuga desde donde es eliminado a la bolsa de deshecho.



Protocolo de lavado:

El protocolo de lavado incluyó un paso previo de equilibrio osmótico con una solución hiperosmolar compuesta por Dextrano40, Albúmina humana y citrato sódico (solución de equilibrio), después de la que se procedió al lavado de las células.

Este protocolo puede ser definido por cada usuario gracias a un menú de configuración programable. En los experimentos de validación de este dispositivo para uso clínico utilizamos los parámetros que se muestran a continuación y que se aplican una vez descongelada la suspensión celular y conectada al equipo desechable.

El tiempo medio del proceso de lavado para una bolsa de aféresis de 250 mL es de 32min, utilizando para ello una media de 156ml de tampón de equilibrio y de 402 ml de tampón de lavado. El tiempo medio del proceso de lavado secuencial de dos bolsas es de 54min, utilizando para ello una media de 294 ml de tampón de equilibrio y de 785 ml de tampón de lavado. El tiempo medio del proceso de lavado de un pool de dos bolsas es de 70min, utilizando para ello una media de 333ml de tampón de equilibrio y de 1087 ml de tampón de lavado.

Protocolo de lavado celular en dispositivo Cytomate.

1. Transferencia de tampón de equilibrio al producto inicial:
Volumen: Dilución 1:1
Solución de equilibrio: **PBS + Dextrano40 5% + HSA 5% + Citrato Na⁺ 5%**
4° C en agitación
Velocidad bomba: 10 ml/min.
2. Pausa de tiempo definida para equilibrio osmótico:
5 minutos. 4° C en agitación.
3. Pausa para permitir el cambio de solución:
Solución de lavado: **PBS + HSA 2,5% + Citrato Na⁺ 5%** .
4. Lavado/concentrado del producto inicial:
Reducción residual: 50
Peso final máximo: 250
Volumen tampón aclarado origen: 75 ml.
5. Transferencia de la bolsa de lavado a la bolsa final:
Volumen de aclarado: 30 ml.
6. Transferencia de tampón a la bolsa de lavado:
Volumen de tampón: 30 ml.
7. Transferencia desde la bolsa de lavado a la bolsa final.

V.2- SEPAX S-100

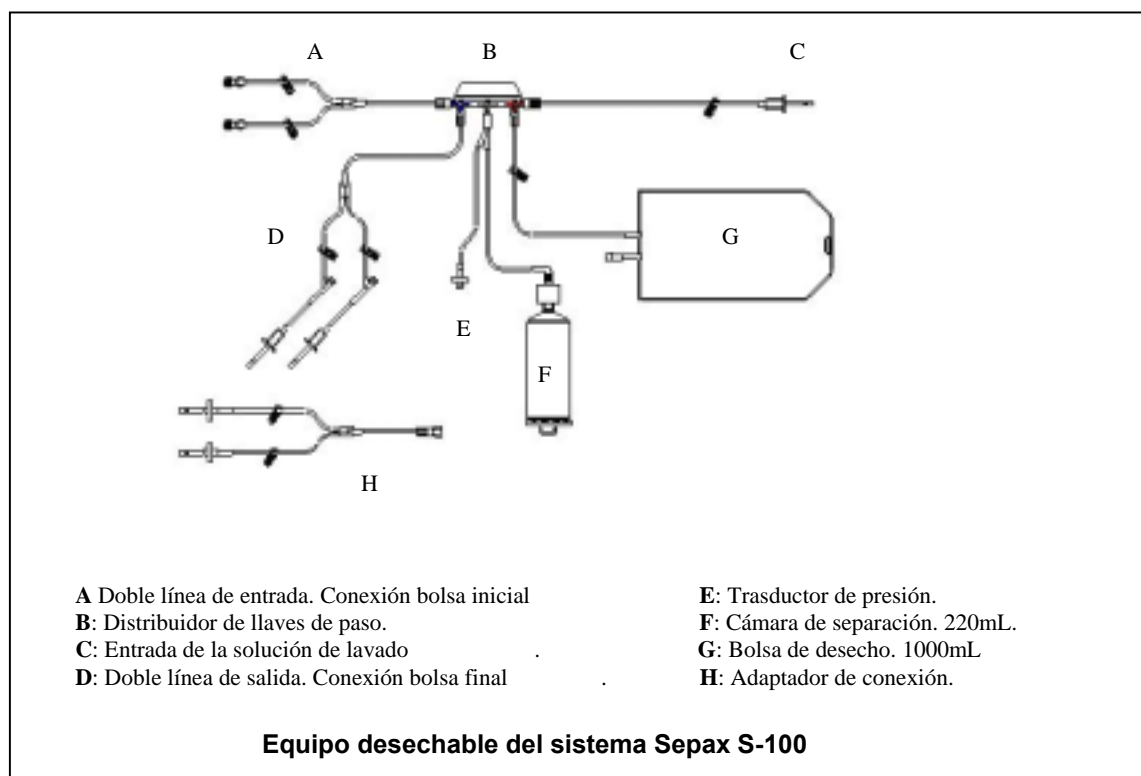
EL dispositivo Sepax S-100 es un procesador celular que consta de una cámara centrífuga para la separación de componentes sanguíneos según su densidad y tamaño. Este sistema utiliza equipos desechables estériles de un solo uso y el producto final se recoge en una bolsa individual lista para su uso clínico. La cámara centrífuga incorpora un sistema neumático (émbolo) que permite su llenado y vaciado así como la transferencia de los diferentes componentes a bolsas de recogida en un sistema de tubulares cerrado y estéril.

La cámara neumática produce una presión negativa (retirada del émbolo) que permite el paso de la suspensión celular de su bolsa inicial al interior de la cámara donde da comienzo la centrifugación que separará los componentes de la sangre y permite al finalizar el proceso, mediante la aplicación de una presión positiva (avance del émbolo) la transferencia de los componentes a diferentes compartimentos finales.



Equipo desechable:

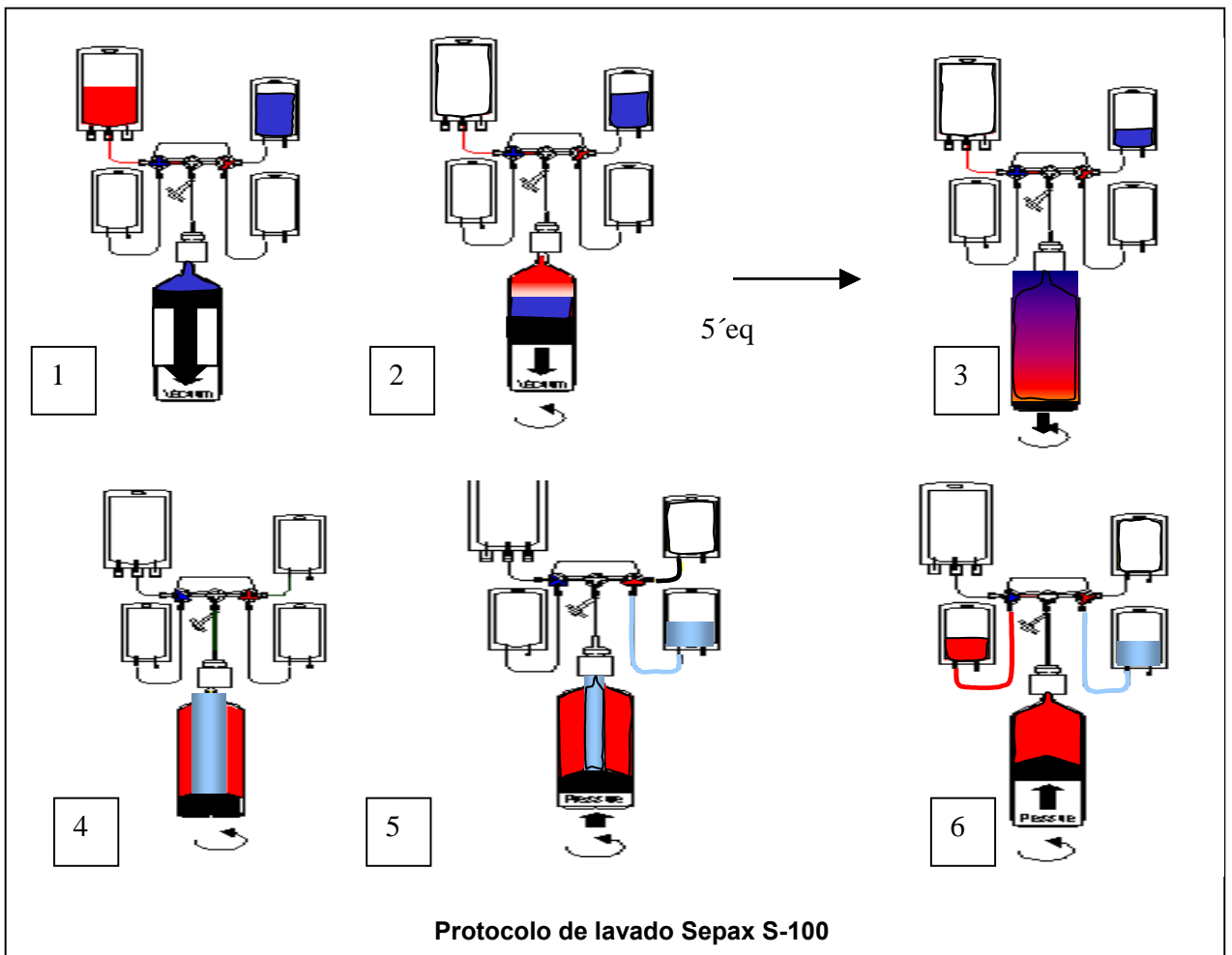
Consiste en un sistema de tubos apirogénicos, estéril y de un solo uso al que se conecta la solución de lavado y el producto inicial. La bolsa de residuos viene incorporada en el equipo así como la cámara centrífuga / neumática.



Protocolo de lavado (ver figura página siguiente):

Una vez conectadas las bolsas de muestra y de solución de lavado (salino al 7,5% de Dextrano40 y 5% Albúmina), la cámara centrífuga retira el émbolo y permite la entrada de la unidad de SCU a su interior seguida de la entrada de un volumen igual de solución de lavado, la mezcla permanece durante cinco minutos en agitación para permitir el equilibrio osmótico de la muestra (1,2). Posteriormente, se llena la cámara totalmente con solución de lavado (3) y da comienzo la centrifugación (4), los componentes celulares se separan por densidad hasta que el émbolo fuerza la salida del sobrenadante, compuesto de eritrocitos, restos celulares y DMSO a la bolsa de deshecho (5). Las células son entonces diluidas con 10 mL de solución de lavado para aumentar la recuperación y el émbolo las extrae hacia la bolsa final (6). Finalmente, la cámara es lavada dos veces para minimizar las pérdidas celulares inespecíficas.

La dilución total de la muestra durante el lavado fue de 1:9. El proceso consume una media de 28 minutos y el volumen final de la muestra fue de 60 mL. Para cada proceso se preparan un mínimo de 300mL de solución de lavado.



RESULTADOS

I

Evidencia de pérdida celular tras descongelación y dilución isotónica. Efecto en los protocolos de citometría de flujo sobre células descongeladas.

I.1- Recuperación celular tras dilución directa del descongelado en PBS.

En estos experimentos se cuantificó la recuperación celular respecto al producto congelado y la viabilidad de 25 productos hematopoyéticos descongelados (10 x SCU, 15 x CPH-A) después de una dilución 1/10 en PBS. El objetivo fue el de tener una primera aproximación a la cuantificación del fenómeno de choque osmótico provocado por un cambio brusco de osmolaridad post descongelación simulado mediante dilución directa del descongelado. Asimismo, se valoraron las diferencias de recuperación celular al comparar las técnicas habituales de control de calidad de estos productos; contador automático, citometría de flujo, viabilidad por tinción con TB y viabilidad por tinción con 7AAD (Tabla 1).

Tabla1. Recuperación celular y viabilidad tras la dilución directa de células descongeladas en PBS.

Dilución 1/10 en PBS post descongelación.			
	Recuperación.		Método de análisis.
	SCU. n=10	CPH-A. n=15	
CNT	84% (55-105)	80% (51-110)	Contador automático
Viabilidad	73% (58-89)	75% (60-97)	Tinción TB
CD34+ total	51% (40-71)	58% (45-79)	Citometría de flujo
Viabilidad	71% (24-90)	79% (44-98)	Tinción 7AAD
CD34+ vivas	41% (31-63)	46% (30-76)	Citometría de flujo

Observamos que los valores de recuperación celular con un contador automático están en el rango de lo esperado para este tipo de muestras pero que las viabilidades (TB) son aproximadamente un 10% menores de lo esperado. La recuperación de CNT vivas calculada mediante contador automático y tinción con TB están en el rango del 60%. Curiosamente, la recuperación de células CD34+, determinada por CMF se alejó del rango de recuperación esperado (80%-90%) y la viabilidad de estas células (7AAD) disminuyó a prácticamente el 50% del valor de recuperación esperado. La recuperación de células CD34+ vivas fue del 45%.

Así, la dilución directa del descongelado en PBS rindió una pérdida celular global y de viabilidad respecto a los análisis precongelación que se vio acentuada cuando utilizamos la citometría de flujo como técnica analítica.

Para descartar el efecto de los procesos de congelación y descongelación en estos resultados se realizaron los siguientes experimentos.

I.2- Efecto de la dilución en PBS sobre el recuento y viabilidad celular.

Ensayamos el efecto de un cambio brusco de osmolaridad en CPH-A descongeladas mediante la dilución directa en PBS (1/10). Este planteamiento experimental fue planteado para reproducir el efecto que tiene sobre las células descongeladas el retorno a las condiciones fisiológicas. Se determinó el recuento y la viabilidad mediante CMF de las células CD45+ y de las CD34+ de 10 productos hematopoyéticos descongelados antes y después del cambio brusco de osmolaridad (choque osmótico) (Tabla 2).

Es de destacar que los resultados observados en esta sección no se vieron afectados por los procesos de congelación y descongelación ya que la recuperación celular se calculó en este caso a partir de los productos descongelados.

Tabla2. Efecto de la dilución fisiológica sobre la pérdida celular en un descongelado.

Recuento celular CPH-A n=10.

	Post- Descongelación	Post-Dilución 1/10 en PBS.	% Recuperación
CD45+ totales x 10⁹	79 (22-146)	61 (19-127)	86% (50-106)
% Viabilidad 7AAD	55 (33- 87)	49 (22-77)	
CD45+ vivas x 10⁹	42 (13-74)	28 (5-56)	70% (33-107)
CD34+ totales x 10⁷	8 (1.8-34)	6 (0.9-21)	71% (48-133)
% Viabilidad 7AAD	91 (60-99)	70 (44-92)	
CD34+ vivas x 10⁷	7 (1.6-33)	3.9 (0.6-15)	60% (38-152)

El cambio brusco de osmolaridad post descongelación resultó en una pérdida del 14% de células CD45+ totales ($p=0.01$, Wilcoxon muestras pareadas) pero en un 30% de las CD45+ vivas ($p=0.007$, Wilcoxon muestras pareadas), sugiriendo que el choque osmótico afecta tanto al recuento celular como a la viabilidad de las células. De forma similar, la dilución del producto hematopoyético descongelado en PBS resultó en una pérdida del 40% de las células CD34+ vivas ($p=0.002$, Wilcoxon muestras pareadas).

La pérdida celular observada se debe fundamentalmente a la dilución directa del producto descongelado en medio isotónico.

I.3- Pérdida celular en el control de calidad por citometría de flujo.

El control de calidad del descongelado cobra especial importancia en el caso de la SCU como fuente de CPH debido al limitado número de estas células en este producto. Sin embargo, tal y como hemos observado, la CMF de estos productos rinde recuperaciones celulares por debajo de lo esperado posiblemente por el efecto del choque osmótico.

Los resultados de esta sección se presentan en forma de artículo original (Manuscrito nº 1: "Predictive utility of the attached segment in the quality control of a cord blood graft. Biology of Blood and Marrow Transplantation".2005). En este trabajo se valoró la utilidad predictiva de una alícuota de producto congelado en el tubular adherido a la bolsa de congelación (segmento) respecto al propio injerto. Para ello se compararon el recuento, viabilidad y capacidad clonogénica de la bolsa y el segmento en análisis pareados. La principal ventaja de la utilización del segmento como fuente de células para el control de calidad es que se trata de una muestra que ha seguido los mismos procesos que el resto del injerto y que para su utilización no es necesario descongelar el resto de las células en la bolsa de congelación.

De los resultados obtenidos son de destacar; **1-** La elevada correlación entre las muestras de segmento y bolsa por cualquiera de los métodos de análisis utilizados (Fig1). **2-** La pérdida celular (Tablas1, 2) respecto al producto congelado cuando se aplican técnicas de citometría de flujo para el análisis del descongelado. **3-** La pérdida celular observada parece estar directamente relacionada con una disminución de la viabilidad celular que puede ser debida a un proceso de choque osmótico post descongelación.

A continuación se presenta el manuscrito original al que hacen referencia estos comentarios:

Manuscrito nº 1:

Luciano Rodríguez, Joan García, Sergi Querol.

"Predictive utility of the attached segment in the quality control of a cord blood graft. Biology of Blood and Marrow Transplantation".11:247-251.2005.

Biology of Blood and Marrow Transplantation 11:247-251 (2005)
 © 2005 American Society for Blood and Marrow Transplantation
 1083-8791/05/1104-0002\$30.00/0
 doi:10.1016/j.bbmt.2004.12.333



Predictive Utility of the Attached Segment in the Quality Control of a Cord Blood Graft

Luciano Rodríguez, Joan García, Sergi Querol

Barcelona Cord Blood Bank, Transfusion Centre and Tissue Bank, Hospital Duran i Reynals, Barcelona, Spain

Correspondence and reprint requests: Sergi Querol, MD, PhD, Barcelona Cord Blood Bank, Transfusion Centre and Tissue Bank, Hospital Duran i Reynals, Autovia de Castelldefels, Km 2.7, 08907 Barcelona, Spain (e-mail: squerol@iro.es).

Received October 14, 2004; accepted December 29, 2004

ABSTRACT

The limited number of progenitor stem cells in umbilical cord blood (UCB) enforces the optimization and strict control of all the procedures involved in its therapeutic use—ie, collection, processing, cryopreservation, thawing, and transportation—to ensure graft potency at transplantation. For this reason, international UCB standards recommend storage of a cell sample attached to the UCB unit as a quantitative and functional control of the unit selected for transplantation. To validate the use of the sample attached to the UCB unit as a quality-control tool for the final product, UCB units ($n = 20$) stored in liquid nitrogen with the Bioarchive system were analyzed. The UCB units and their attached segments were thawed, and the number and viability of total nucleated cells, mononucleated cells, CD45⁺ cells, and CD34⁺ cells were determined, as were colony-forming cell counts. There was no significant difference between UCB units and segments for any of the parameters assessed. Additionally, the linear correlation coefficient (R^2) in these paired samples was 0.85 and 0.78 for CD34⁺ cells and colony-forming cells, respectively. In conclusion, the cell sample in the tube segment physically linked to the transplant UCB bag predicts the total cell content and functionality of the unit and may serve as a source for final quality control of the UCB unit before transplantation.

© 2005 American Society for Blood and Marrow Transplantation

KEY WORDS

Cord blood • Transplantation • Quality control • CD34 • CFC • Segment

INTRODUCTION

Assessment of graft quality is one of the most relevant issues in hematopoietic stem cell transplantation [1,2], particularly in the case of a cord blood bank, where the stored units may be used years after their cryopreservation. Therefore, a reliable method to assess the cell content and viability of a graft before transplantation is crucial. Although it has been shown that the number of total nucleated cells (TNCs), CD34⁺ cells, and colony-forming cells (CFCs) per kilogram body weight of the recipient in the graft are good predictors of patient survival [3], all of these variables are normally defined before cryopreservation. However, the quality of a cord blood graft might be affected during the freezing process, storage, and transportation to the transplant unit, as well as during the thawing process.

The importance of CFC content for all sources of progenitors in the hematologic recovery after trans-

plantation has been established by several authors [4-6]. Recently, McKenna et al. [7] reported that poor clonogenicity obtained after thawing resulted in engraftment failure of an umbilical cord blood (UCB) unit that had been characterized exclusively by the prefreeze tests. These studies point to the relevance of a postfreezing functional analysis of the graft to demonstrate its adequacy as a final quality control (QC) test before transplantation.

The use of a tube segment attached to the UCB unit containing an identical aliquot of the cryopreserved product that is exposed to the same postprocessing freezing and storage conditions as the unit has been proposed as a QC tool for UCB banking [7,8]. Cell counts, CD34 analysis, and CFC assessment are recommended by UCB standards for the qualification of the graft, and all of them can be performed from the segment attached to the UCB unit.

The aim of this study was to investigate the use of

the segment attached to the UCB unit for qualification of the unit for transplantation. A paired study was performed that compared cell quantity and viability, including CFCs, in the attached segment with that in the UCB unit. Our results show that the segment may serve as a predictor of the unit's cellular content and viability after thawing.

MATERIAL AND METHODS

Cord Blood Collection

Placental UCB was collected at several maternity clinics within the Barcelona Cord Blood Bank program. Informed consent was obtained according to routine procedure. The cord blood, collected with the placenta in utero, was drained by gravity from the umbilical vein in a collection bag (MacoPharma, Tourcoing, France) containing 29 mL of citrate phosphate dextrose. The collected blood was stored at 4°C until processing and was cryopreserved within 48 hours after collection.

Processing and Cryopreservation

The UCB units were volume-reduced by following a modified approach of the automated procedure described previously [9]. This consisted of a double buffy coat collection after hydroxyethyl starch addition (Grifols, Barcelona, Spain) by using the Sepax S-100 device and the UCB/hydroxyethyl starch protocol (Biosafe, Eysins, Switzerland). After dimethyl sulfoxide addition (10% final concentration), the concentrated cells were transferred to a freezing bag (Sepax cell-separation kit CS-530; Biosafe) that was compatible with the Bioarchive system (Thermogenesis, Rancho Cordova, CA). The tube attached to the freezing bag was filled with cell concentrate by squeezing the freezing bag. Three segments were sealed in the attached tube that contained approximately 200 μ L each. The tube was left attached to the bag. The UCB unit (bag and segments) was then overwrapped with a Bioarchive overwrap bag (Thermogenesis, Rancho Cordova, CA).

Cryopreservation was performed by using a programmed freezing rate in the Bioarchive at a starting temperature of 10°C, with a cooling rate of 10°C/min until -3°C (maximum rate to -13°C and -2°C/min until -50°C; mean cooling rate of -3°C/min), and stored in the liquid nitrogen phase of the same device.

Twenty UCB units were used in this study. These units had been rejected after conventional processing from the Barcelona Cord Blood Bank inventory because of lack of documentation ($n = 3$), positive sterility test ($n = 7$), and/or low content of CD34 cells ($n = 10$). The mean content of CD34⁺ cells was 0.20% \pm 0.1% before cryopreservation, whereas the median content in our entire inventory is 0.31%. The

storage time for the units used was more than 5 years for 6 units, 5 years for 8 units, and between 3 and 5 years for the remaining 6 units.

Thawing

UCB units were removed from the Bioarchive and immersed in liquid nitrogen to separate the attached segment for further analysis. At the time of analysis, UCB bags or the attached segments were thawed by immersion in a 37°C water bath, mixed thoroughly, and analyzed without delay, according to the different QC assay described below.

Quality Controls

Automatic cell count. The TNC count was performed for each sample by using an automatic cell counter that detects and measures changes in electrical resistance (impedance) when a particle in a conductive liquid passes through the device (ACTdiff; Coulter, Miami, FL).

Flow cytometry. The method used was the lysis and nonwash single-platform CD34 measurement described previously [10]. Briefly, samples drawn just after thawing were incubated for 20 minutes at 4°C in the dark with anti-human phycoerythrin-labeled monoclonal antibody against CD34 and fluorescein isothiocyanate-labeled CD45 at saturating concentration (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). After incubation, samples were lysed in ammonium chloride (final dilution of the sample, 1:10) for 5 minutes at 4°C in the presence of 1 μ g of 7-aminoactinomycin D for cell viability assessment. Twenty microliters of commercially available fluorescent microbeads were added and gently mixed for an internal standard before acquisition according to the manufacturer's instructions (Perfect-Count; Cytognos, Salamanca, Spain) [11] to evaluate the absolute count. The cell subsets were then analyzed by their fluorescence profile and forward scatter (FSC)/side scatter (SSC) characteristics on a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson) by using CellQuest software (Becton Dickinson) and the International Society of Hematotherapy and Graft Engineering recommendations for gating [10]. CD45⁺ cells, mononucleated cells (MNCs), CD34⁺ cells, and 7-aminoactinomycin D viability were assessed by using flow cytometry.

Clonogenic assay. Progenitor cell assays were performed on thawed samples, in duplicate, and only for units with a negative sterility test ($n = 13$), by using a methyl cellulose-based H4434 medium (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Briefly, 5×10^4 cells were seeded directly on methyl cellulose, gently mixed, and then plated on petri dishes and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Colony-forming unit-granulocyte-macrophage, burst-forming unit, erythroid, and colony-forming unit-mix

Table 1. UCB Content before and after Cryopreservation

Variable	Fresh	After Thawing	% Recovery
TNC $\times 10^6$	10.4 \pm 3.7	10.0 \pm 3.8	94 \pm 9.0
CD45 $\times 10^6$	9.30 \pm 4.2	8.82 \pm 4.8	98 \pm 30
MNC $\times 10^6$	5.65 \pm 2.5	5.34 \pm 2.4	98 \pm 28
CD34/10 ⁵ TNC	2.03 \pm 1.0	1.58 \pm 0.7	77 \pm 26
Viability (7-AAD)			
CD45	94 \pm 3.3	42 \pm 15	—
MNC	90 \pm 3.2	63 \pm 13	—
CD34	98 \pm 2.0	80 \pm 14	—

Total cell counts and viabilities are presented as mean \pm SD. TNC indicates total nucleated cells; MNC, mononucleated cells; 7-AAD, 7-aminoactinomycin D.

colonies were identified and counted according to standard criteria after 2 weeks in culture [12]. For the CFC count, only colonies with more than 50 cells were enumerated. The total CFC content, defined as the total count of colonies independently of their lineage, was used for colony recovery analysis.

Expected donogenic efficiency. Expected clonogenic efficiency (ECLONE) was defined as the ratio between the CFCs scored in the clonogenic assays and the total number of CD34⁺ cells seeded in the same assay [13].

Statistical Analysis

Descriptive analysis is presented as mean \pm SD. Paired *t* tests were used to assess differences between the UCB unit and the related segment. Linear correlation was evaluated and plotted by using Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, WA), and the coefficient of correlation (R^2) was calculated.

RESULTS

Cord Blood Graft Description

UCB units (volume, 25 \pm 1 mL) stored in the Bioarchive system were thawed and assessed for their content. Description of the UCB unit contents, assessed by flow cytometry, before cryopreservation and after thawing is shown in Table 1. The recovery of total CD45⁺ cells and MNCs was 98% \pm 30% and 98% \pm 28%, respectively. Using an automatic cell counter, similar recovery of TNCs was observed (94% \pm 9%). However, the recovery obtained for the CD34⁺ cells was lower: 77% \pm 26%.

The viability of CD45 cells, MNCs, and CD34⁺ cells was greater than 90% in fresh samples but showed reduced values after thawing (Table 1). Compared with other cell types, the CD34⁺ cells showed higher viability: 80% \pm 14% after thawing.

Progenitor Cell Count on the Attached Segment Predicts UCB Bag Content

In Table 2, descriptive results of total cell contents and viability obtained after assessment of bags and the

corresponding contiguous segments are presented. There was no significant difference between the cells in the UCB unit and the segment in any of the parameters assessed. In addition, the linear correlation of viable CD34⁺ cells was very high between UCB units and segments (Figure 1A). The percentage of viable CD34⁺ cells found within the TNC in the segment (0.12% \pm 0.1%) was not statistically different from that obtained in the bag after thawing ($P = .29$; data not shown).

Finally, the total CFC content after thawing was 9.6 $\times 10^5 \pm 9.9 \times 10^5$ colonies in the UCB unit and 8.1 $\times 10^5 \pm 7.0 \times 10^5$ in the segment ($P = .29$; data not shown). Moreover, the CFC content in the unit and the attached segment had a high linear correlation (Figure 1B).

Comparison of Other Parameters

The cell viability, total CD45⁺ cells, and total MNCs were also compared between UCB units and the attached segment. In all cases, a strong correlation was found between samples. Again, for all the parameters assessed, differences among bags and segments were not statistically significant (Table 2). Data from nucleated cells concentration measured by the automatic cell counter were equivalent between unit and segment and correlated strongly ($P = .29$; data not shown).

Use of Colony-Forming Unit/CD34 Correlation as a Qualitative Assessment of Graft Potency

It is interesting to note that the number of CD34 cells and CFCs correlated after thawing both in the segment and the unit ($R^2 = 0.58$ and $R^2 = 0.77$, respectively; data not shown). In this regard, the number of CFCs expected to be scored according to a known number of seeded CD34⁺ cells (ECLONE) could be used as a reference value for qualitative as-

Table 2. UCB Unit Contents after Thawing and Its Prediction Assessed by Analysis of the Attached Segment

Variable	UCB Unit	Attached Segment	P Value*	R ² †
TNC $\times 10^6$	10.0 \pm 3.9	9.53 \pm 3.8	.08	0.92
CD45 $\times 10^6$	8.82 \pm 4.8	8.59 \pm 4.5	.68	0.74
MNC $\times 10^6$	5.34 \pm 2.4	5.16 \pm 2.0	.53	0.71
CD34/10 ⁵ TNC	1.58 \pm 0.7	1.65 \pm 0.8	.53	0.85
CFC/10 ⁵ TNC	89.4 \pm 61.0	78.9 \pm 37.7	.27	0.78
Viability (7-AAD)				
CD45	42 \pm 15	39 \pm 15		
MNC	63 \pm 13	65 \pm 19		
CD34	80 \pm 14	74 \pm 16		

Total cell counts and viabilities are presented as mean \pm SD. TNC indicates total nucleated cells; MNC, mononucleated cells; CFC, colony-forming cells; 7-AAD, 7-aminoactinomycin D.

*Associated probability for the 2-tailed Student *t*-test.

†Pearson correlation coefficient.

L. Rodríguez et al.

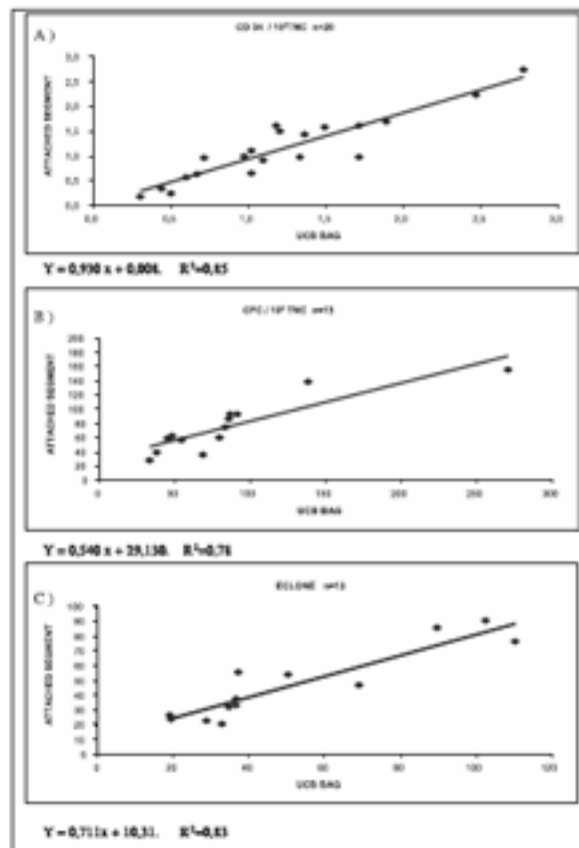


Figure 1. Linear correlation of CD34/10³ TNC (A), CFC/10³ TNC (B), and ECLONE (colony-forming unit/CD34 ratio) (C) between the UCB bag and the attached segment.

assessment of graft potency. We found that the ECLONE for the UCB unit and the related segment was $51\% \pm 31\%$ and $47\% \pm 24\%$, respectively, and did not show statistical differences between samples ($P = .24$). Again, the linear correlation was high when the ECLONE of the samples was plotted (Figure 1C).

DISCUSSION

Selection of a suitable UCB unit for progenitor cell transplantation is based on HLA matching and the total cell content of the unit [14]. Despite a demonstrated association of TNC [1,15], colony-forming unit-granulocyte-macrophage [4], and CD34⁺ cell [3] doses with the speed and probability of neutrophil and platelet recovery, such variables are currently determined before cryopreservation, without taking into account that in some cases graft potency might be affected by different uncontrolled events during freezing, storing, and shipment of the unit to the transplant center. This is particularly relevant in cord blood banking, where grafts could be stored for years and where QC before transplantation is usually based only on the TNC count and viability at time of thawing.

Although the TNC count measurement is well standardized and relatively reproducible between laboratories, it correlates weakly with CD34 content in cord blood [16]. Consequently, one might find a selected unit with an acceptable TNC count after thawing that contains a very low number of CD34⁺ cells and CFCs [8] and that, therefore, has a reduced probability of engraftment. This situation has already been reported [7], and it is not possible to know how often an appropriate QC before transplantation could have prevented other engraftment failures. Moreover, the election of a UCB unit for transplantation has some degree of uncertainty due to the different protocols, lack of standardized techniques, cord blood banks, and transplant centers involved in this process. Recently, Van haute et al. [16] published a study in which the best predictor of viable CD34⁺ cells obtained in the transplantation bag was obtained from a reference sample assessment.

In this study, we focused on demonstrating that the analysis of a contiguous segment may be used to predict the content and graft potential of the transplantation unit by using the variables described here. Taken together, our results suggest that, for all the variables assessed (TNC, MNC, CD45, CD34, and CFC), the number of cells and viability in the attached segment with this particular freezing bag (Thermogenesis) and with the freezing protocol described will be representative of the graft. Whether this result can be extended to freezing bags with different geometry and to other freezing methods remains to be determined.

It is interesting to note that the CFC/CD34⁺ ratio determined in the UCB bag was conserved in the attached segment. As a result, the percentage of colonies generated per CD34⁺ cell seeded is expected to be constant in a specific unit after thawing (ECLONE). By assessing the specific ECLONE of a progenitor source, we could define normality ranges for the qualitative detection of functional defects after cryopreservation by using the colony score. This finding is supported by the fact that the CFC/CD34 ratio has been already reported as a good predictor in short-term platelet engraftment in mobilized blood progenitor cell transplantation [13]. In this respect, and especially for practical application of this parameter, CFC assays and cytometry techniques in thawed samples should be carefully standardized. In our experience, special attention should be taken to avoid osmotic shock in thawed samples. Direct dilution in lysis buffers, as with those used in cytometry, might influence the absolute counts, as well as the viability, of the cells. In this study, a possible underestimation of the number of CD34⁺ cells might have influenced the unexpectedly low recovery values observed. In addition, the high ECLONE values observed could reflect this situation, because the aliquots taken for CFC

assessment were directly diluted in the methyl cellulose medium, thus avoiding the osmotic shock produced by the lysis reagent used in flow cytometry.

The use of the segment to predict the hematopoietic potential of the graft requires that the cord blood bank standardize and validate a reproducible method to generate and analyze these samples. Additionally, such analyses could be useful in determining the real potential of all the events that occur during storage. Finally, at the transplant center, the attached segment may serve as a means to assess the progenitor cell content of the unit according to its own analysis techniques and stringencies without compromising the cord blood graft.

In conclusion, using well-controlled and standardized conditions, we can use the segment physically linked to the transplantation bag to predict the cell and progenitor cell content of a cord blood graft. The use of a segmental minithaw technique performed in the cord blood bank or after shipment to the transplant center facility could minimize the risk of graft failure secondary to undetected loss of functional activity of the cord blood product before transplantation.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Deutsche Jose Carreras Leukämie-Stiftung and Eurocord III and is enclosed in the Medicine PhD program of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB, Bellaterra, Spain). We thank Dr. E. Semple for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2000;28:1197-1205.
2. Feugier P, Beaumont D, Girard F, et al. Hematologic recovery after autologous PBPC transplantation: importance of the number of postthaw CD34+ cells. *Transfusion.* 2003;43:878-884.
3. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood.* 2002;100:1611-1618.
4. Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM, Rubinstein P. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood.* 2000;96:2717-2722.
5. Figueras E, Haut PR, Okocinski M, Klezoi M. Analysis of parameters affecting engraftment in children undergoing autologous peripheral blood stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25:583-588.
6. Zubair A, Zahrick D, Daley H, et al. Early neutrophil engraftment following autologous BMT provides a functional predictor of long-term hematopoietic reconstitution. *Transfusion.* 2003;43:614-621.
7. McKenna D, McCullough J. Clinical utility of the clonogenic assay in the QC of UCB units for transplant [abstract 167]. 10th Annual ISCT Meeting, Dublin, 2004. 2004:71.
8. Goodwin HS, Gruninger LM, Regan DM, et al. Long term cryostorage of UC blood units: ability of the integral segment to confirm both identity and hematopoietic potential. *Cytometry.* 2003;5:80-86.
9. Zingoni J, Stramer E, Weisbach V, et al. Cord blood processing with an automated and functionally closed system. *Transfusion.* 2003;43:806-13.
10. Keeney M, Chin-Yee I, Weir E, Popma J, Naysa R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Cytometry.* 1998;34:61-70.
11. Menendez P, Redondo O, Rodriguez A, et al. Comparison between a lyse-and-then-wash method and a lyse-non-wash technique for the enumeration of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Cytometry.* 1998;34:264-271.
12. Capranny G, Querec S, Caneda JA, Garcia J. Short-term, serum-free, static culture of cord blood-derived CD34+ cells: effects of FLT3-L and MIP-1alpha on in vitro expansion of hematopoietic progenitor cells. *Hematologica.* 1999;84:675-682.
13. Fu SQ, Alsoud CN, Brennan JK, Iftikharuddin JJ, Nichols D, Lierbeck JL. Impact of mobilized blood progenitor cell quality determined by the CFU-GM/CD34+ ratio on rapid engraftment after blood stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;28:315-321.
14. Gluckman E, Rocha V, Arcene W, et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol.* 2004;32:397-407.
15. Rubinstein P, Carrier C, Scarsandro A, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med.* 1998;339:1565-1577.
16. Van Haute I, Loozen N, De Smet S, et al. Viable CD34+ stem cell content of a cord blood graft: which measurement performed before transplantation is most representative? *Transfusion.* 2004;44:547-554.

II

Prevención del choque osmótico sobre células descongeladas.

II.1- Prevención del choque osmótico postdescongelación mediante la adición de proteína y macromoléculas a los medios de dilución.

El comportamiento de un producto hematopoyético descongelado frente a una dilución en medio isotónico es de interés porque esta es una manipulación habitual en los QC. La elevada concentración de solutos e iones osmóticamente activos en el medio extracelular de un descongelado hace que las células se comporten como osmómetros en respuesta a los cambios de osmolaridad, así, una reducción brusca de la osmolaridad del medio extracelular, como la inducida por la dilución en medio isotónico, conduce a una entrada de agua en la célula y los límites físicos de las membranas pueden verse sobrepasados comprometiendo la viabilidad celular. Las técnicas analíticas que incluyen este tipo de manipulación son el recuento de CN contador automático, la tinción de viabilidad y la determinación citométrica de CPH.

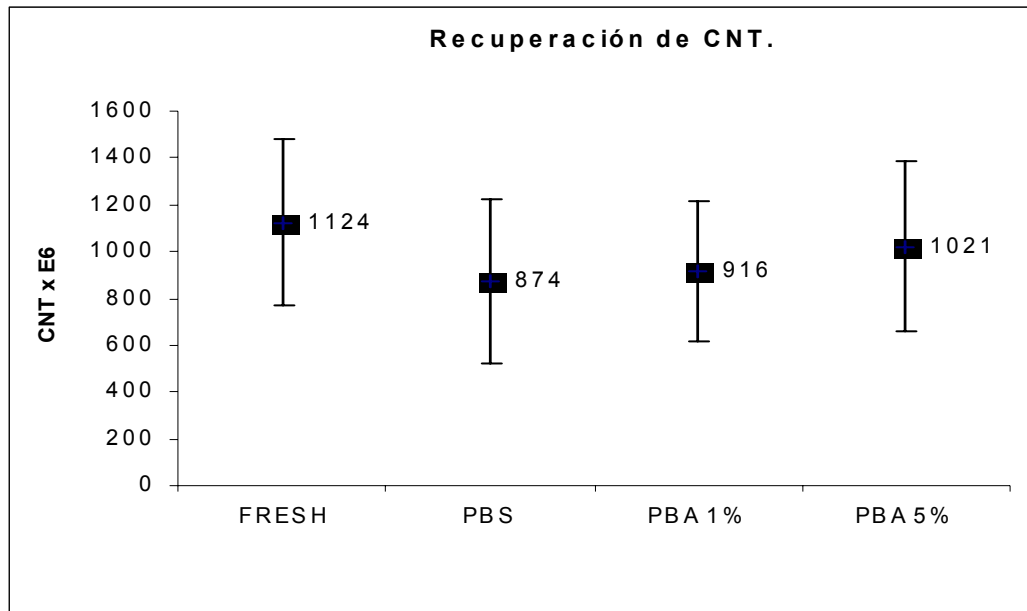
II.1.1- Recuperación de CNT en SCU descongelada.

Con el objetivo de valorar el efecto de la presencia de proteína en los medios de dilución de un descongelado sobre la recuperación celular post descongelado, se diluyeron unidades de SCU (n=10) directamente post descongelación en tres soluciones isotónicas distintas; PBS, PBA1% y PBA5%.

La concentración celular en fresco, antes de la congelación, de las muestras estudiadas fue de 44.9×10^6 CN/ mL (CNT: $1124 \times 10^6 \pm 353$). En el momento de la descongelación esta concentración disminuyó hasta 36.4×10^6 CN/ mL (CNT: $874 \times 10^6 \pm 350$), 38.1×10^6 CN/ mL (CNT: $916 \times 10^6 \pm 300$) y 42.6×10^6 CN/ mL (CNT: $1021 \times 10^6 \pm 364$) para las muestras diluidas 1/10 en PBS, PBA 1% y PBA 5% respectivamente (Fig 1).

La recuperación media de CNT post-descongelación respecto a la muestra en fresco (n =10) cuando la alícuota fue diluida (1/10) en PBS, PBA1% y PBA5% fue del $84\% \pm 16$, $81\% \pm 13$ y $90\% \pm 10$ respectivamente. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre las diluciones en PBS y PBA1%, ($p = 0.64$), pero si lo fueron respecto a la muestra en fresco ($p = 0.03$). La dilución en PBA5% mostró una diferencia no significativa respecto a la muestra en fresco pero sí respecto a las muestras diluidas en PBS o PBA1% ($p = 0.04$) (Fig 1).

Fig.1. Efecto de la dilución sobre las CNT de un descongelado.
SCU descongelado n=10.

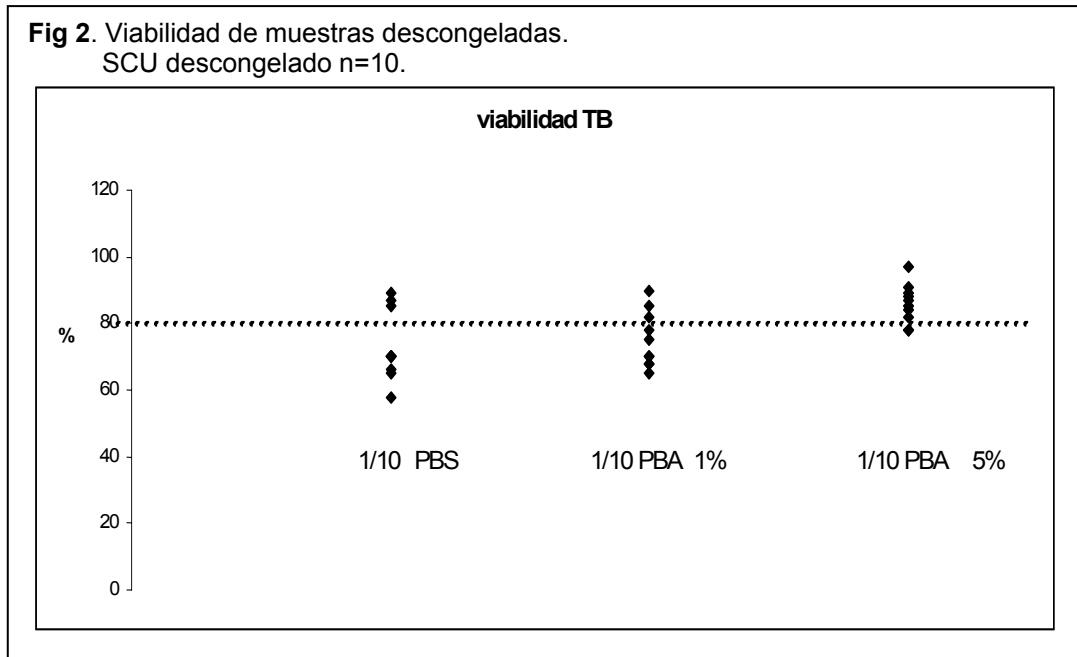


Para las muestras estudiadas, la dilución en PBA 5% proporciona un 10% más de recuperación de CNT (estadísticamente significativa) respecto a la misma dilución con soluciones de igual osmolaridad pero con menos concentración proteica.

II.1.2- Viabilidad de CNT en SCU descongelada.

A pesar de que el recuento de CNT fue similar independientemente del medio de dilución empleado, la viabilidad de las CN, ensayada por tinción TB varió significativamente según la concentración de proteína en el medio de dilución.

Habitualmente la viabilidad celular medida por tinción en TB de una muestra en fresco, previa a la congelación, varía entre el 85% y el 99%. Sin embargo, si descongelamos y diluimos esta muestra antes del ensayo, se espera que los valores de viabilidad estén en un rango más amplio. Las muestras descongeladas y diluidas 1/10 en los medios PBS, PBA 1% y PBA 5% mostraron una viabilidad media de $73\% \pm 10\%$, $75 \pm 8\%$ y $86\% \pm 6\%$ respectivamente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en todos los casos ($P \leq 0.0003$) (Fig.2).



En las muestras diluidas en PBS o PBA 1%, se observó que solo el 30% mostraban una viabilidad mayor del 80%, valor que se aceptaría como un signo de que durante los procesos de congelación, almacenamiento de la muestra y descongelación no ha habido una mortalidad excesiva. Para las muestras diluidas en PBA 5%, solo el 20% de ellas mostraron valores de viabilidad inferiores al 80%.

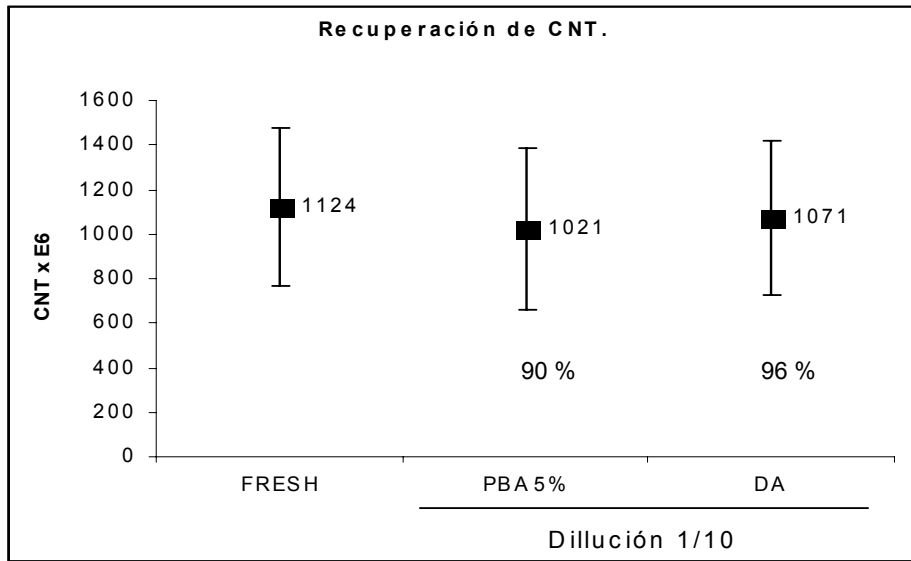
II.1.3- Solución Dextrano-Albúmina.

Una vez evidenciado el efecto de la composición proteica (Albúmina humana) de la solución de dilución sobre el recuento de CNT y viabilidad en muestras de SCU descongeladas, ensayamos el efecto de una solución de Dextrano-Albúmina en la manipulación de estas muestras. La solución de Dextrano-Albúmina (Dextr-Alb) se ha convertido en referencia para la descongelación de unidades de SCU para uso clínico porque garantiza una mejor recuperación funcional de CPH, tal y como indican los resultados de recuperación clonogénica de muestras descongeladas. Este medio fue validado por el NY Cord Blood Centre y es utilizado como solución de dilución para la descongelación de unidades de SCU en la práctica clínica diaria.

Las mismas muestras utilizadas en los experimentos de dilución en PBS con diferentes concentraciones de Albúmina (II.1.1 y II.1.2) fueron diluidas 1/10 en una solución de Dextr-Alb y el recuento celular (CNT) y viabilidad (TB) fueron monitorizados.

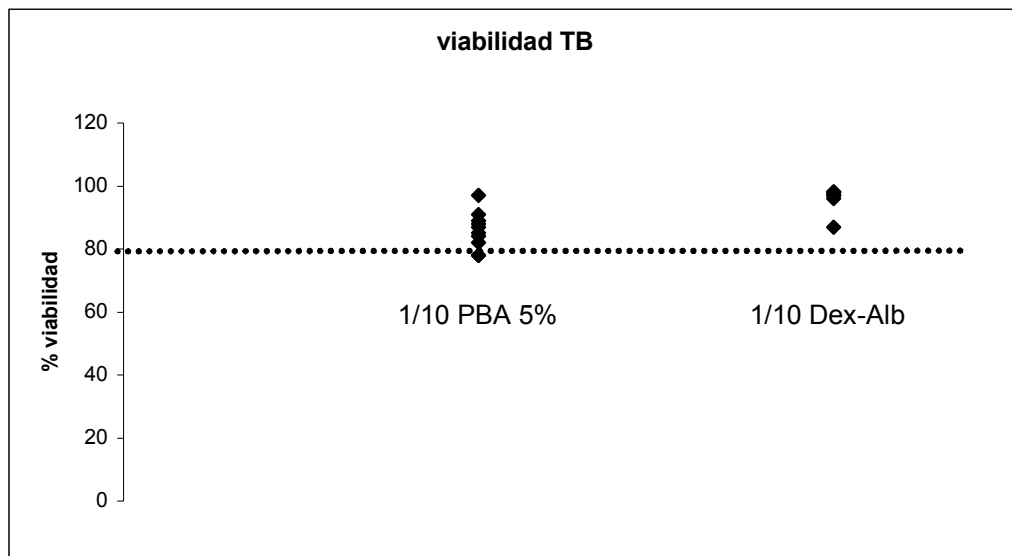
La recuperación media de CNT respecto al producto en fresco fue de un $95 \pm 8\%$ cuando diluímos la muestra 1/10 en la solución Dextrano-Albúmina (CNT: $1071 \times 10^6 \pm 345$) frente a un $90 \pm 10\%$ cuando se utilizó PBA 5% (CNT: $1021 \times 10^6 \pm 364$). Aunque solo se observó una diferencia del 5%, esta fue estadísticamente significativa ($p = 0.04$) (Fig.3).

Fig 3. Efecto de la dilución sobre las CNT de un descongelado. Solución Dextr-Alb. SCU descongelado n=10.



La viabilidad media de las muestras (TB) fue del $96 \pm 4\%$ y del $86 \pm 6\%$ con las soluciones de Dextrano-albúmina y PBA 5% respectivamente. La diferencia media en viabilidad (10%) fue estadísticamente significativa ($p=0.005$) (Fig4.) y pone de manifiesto que la recuperación de CN vivas es aproximadamente un 15% superior cuando la muestra se manipula con el tampón Dextrano-Albúmina que cuando se diluye en una solución PBA 5%, ($92\% \pm 10\%$ vs $77\% \pm 11\%$).

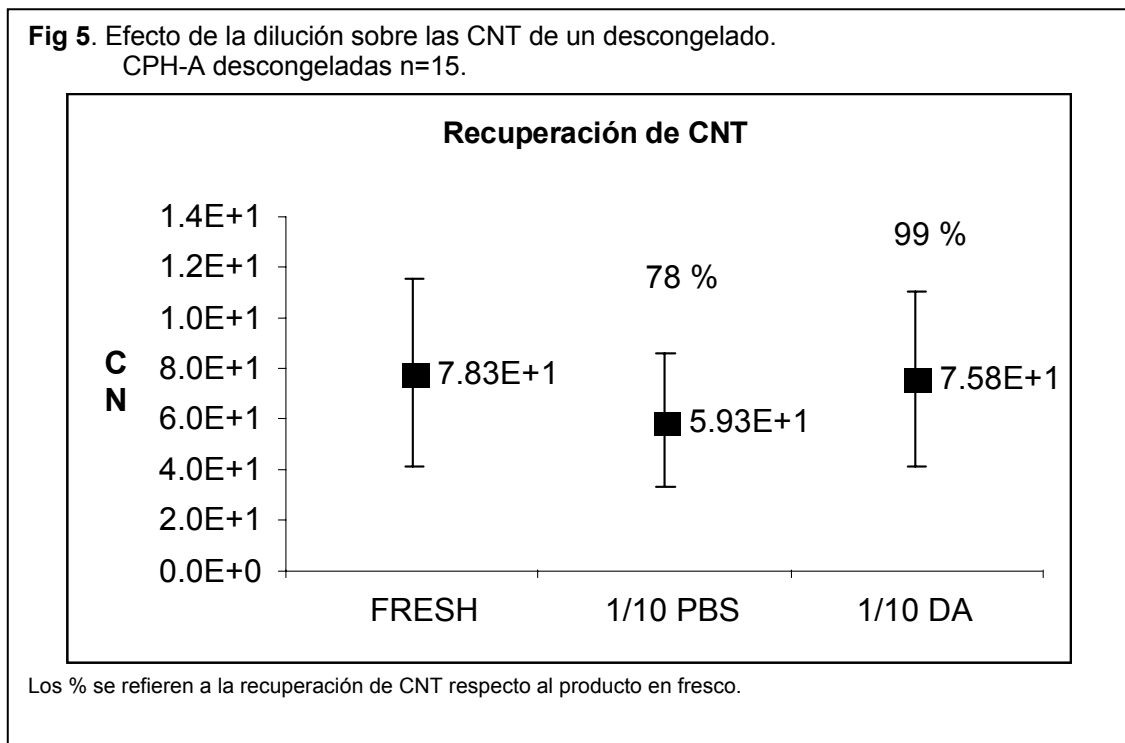
Fig 4. Viabilidad de muestras descongeladas. Solución Dextr-Alb. SCU descongelado n=10.



II.1.4- Recuperación de CNT en CPH-A descongelada.

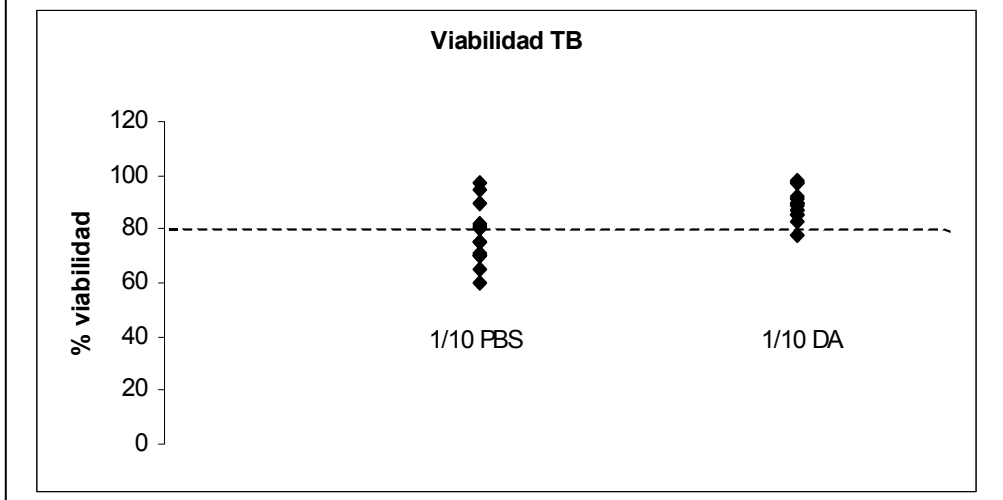
Los resultados obtenidos al diluir 1/10 muestras de SCU descongelado se confirmaron con CPH-A descongeladas. Un total de 15 productos fueron descongelados y diluidos 1/10 en PBS y en solución Dextrano-Albúmina. El recuento total, la viabilidad por TB y la recuperación respecto al producto recogido, antes de su congelación, fueron determinadas para las CNT.

El recuento de CNT de los productos de CPH-A antes de la congelación fue de $7.83 \times 10^{10} \pm 3.7 \times 10^{10}$. Después de descongelar y diluir las muestras, el recuento de CNT fue de $7.58 \times 10^{10} \pm 3.5 \times 10^{10}$ y $5.93 \times 10^{10} \pm 2.6 \times 10^{10}$ para las muestras diluidas 1/10 en solución Dextrano-Albúmina o en PBS. La recuperación de CNT fue, en media, del $78 \pm 15\%$ y del $99 \pm 16\%$ para estos grupos de estudio y fue estadísticamente significativa entre grupos ($p = 0.001$) (Fig 5).



La viabilidad de las muestras (Fig.6) varió de un $78 \pm 11\%$ para las diluidas en PBS a un $89 \pm 6\%$ para las muestras diluidas en solución Dextrano-Albúmina ($p = 0.001$). Así, La recuperación de CNT vivas respecto al producto inicial, antes de la congelación, fue del $61 \pm 15\%$ y del $88 \pm 14\%$ para las muestras diluidas en PBS y solución Dextrano-Albúmina ($p = 0.001$) respectivamente.

Fig 6. Viabilidad de muestras descongeladas.
Aféresis descongeladas n=15.



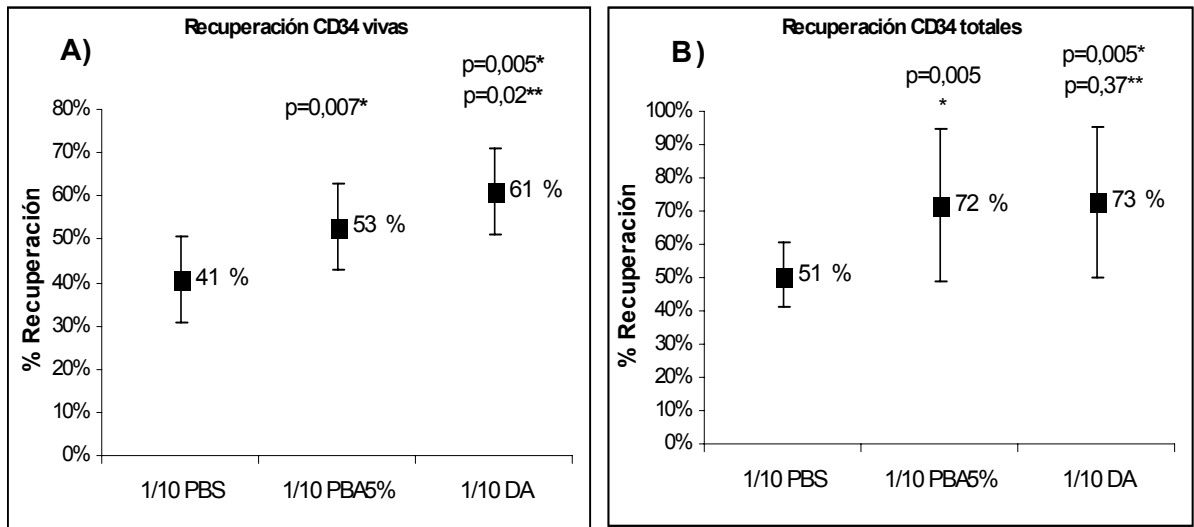
II.1.5- Recuento y viabilidad de células CD34+ en SCU descongelada.

Una vez observado el efecto del cambio brusco de osmolaridad (dilución 1/10) sobre muestras descongeladas en cuanto a viabilidad y recuento con un contador automático y tinción TB, experimentamos el efecto que esta manipulación tiene en los resultados de CMF. En estos experimentos, la viabilidad de las poblaciones celulares estudiadas se calculó mediante tinción con 7 aminoactinomicina D (7AAD).

Al igual que en el caso de las CNT, el recuento de células CD34+ en un descongelado se vio alterado dependiendo del medio de dilución empleado para la determinación citométrica. El contenido proteico / macromolécula en el medio de dilución de la muestra fue directamente proporcional a la recuperación de células vivas en el descongelado. Al diluir la muestra descongelada (1/10), la recuperación de células CD34+ vivas fue $41 \pm 12\%$, $53 \pm 13\%$ y $61 \pm 17\%$ cuando se utilizó PBS, PBA 5% y Dextrano Albúmina como medio de dilución (Fig 7). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en todos los casos y mostraron una diferencia de hasta el 20% de recuperación de células vivas por el simple hecho de diluir en una solución u otra (Fig 8).

No pudimos relacionar la pérdida de recuperación celular con una disminución de viabilidad (10%-20% medida por tinción 7AAD) de las células CD34+ ya que esta no fue estadísticamente significativa entre muestras (Fig.8).

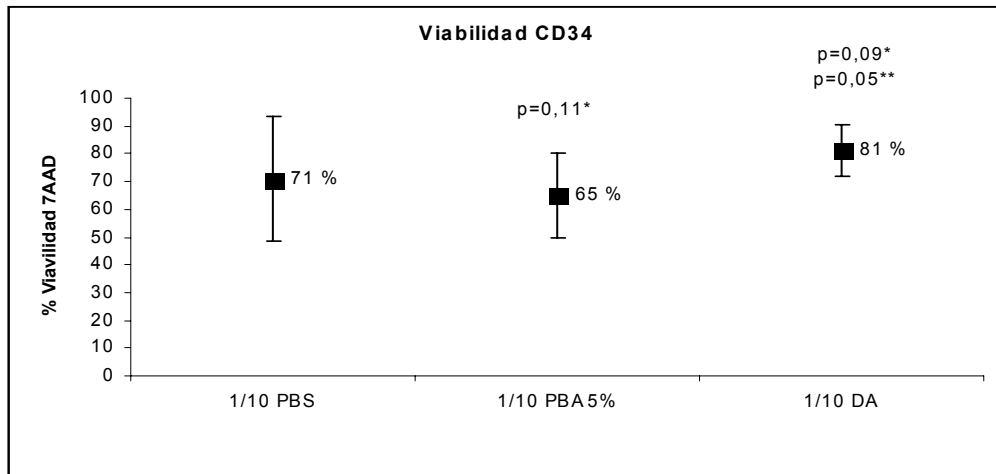
Fig 7. Efecto de la dilución de un descongelado en la recuperación de células CD34+. SCU descongelada n=10.



*p test de Wilcoxon vs 1/10PBS. ** p test de Wilcoxon vs 1/10PBA5%.
 PBS, Solución salina. PBA5%, PBS al 5% v/v de HSA. DA, solución Dextrano Albúmina. p de test Wilcoxon.

La recuperación de células CD34+ totales, esto es células vivas más células muertas, fue la misma en las muestras diluidas con PBA5% y con solución Dextrano Albúmina, indicando que la técnica citométrica empleada no interfiere en los resultados de recuperación (Fig 7B). Sin embargo, las muestras diluidas directamente en PBS mostraron una pérdida celular (20%) relacionada directamente con la manipulación de dilución.

Fig 8. Efecto de la dilución de un descongelado en la viabilidad (7AAD) de células CD34+. SCU descongelado n=10.



*p test de Wilcoxon vs 1/10PBS. ** p test de Wilcoxon vs 1/10PBA5%.
 PBS, Solución salina. PBA5%, PBS al 5% v/v de HSA. DA, solución Dextrano Albúmina. p de test Wilcoxon.

El número total de células CD34+ antes de la preservación y aquellas recuperadas en cada grupo experimental se muestran en la siguiente Tabla (Tabla 3).

Tabla 3. Recuento de células CD34+ totales.
SCU descongelado n=10.

	PRECONGELACIÓN	POSTDESCONGELACIÓN		
		1/ 10 PBS	1/ 10 PBS 5%	1/ 10 Dextrano-Albúmina
Media	5,01E+06	2,67E+06	3,40E+06	3,29E+06
Mediana	3,89E+06	2,02E+06	2,68E+06	2,54E+06
Max.	1,18E+07	8,41E+06	9,47E+06	9,38E+06
Min.	1,12E+06	4,38E+05	9,33E+05	1,43E+06
SD	3,47E+06	2,28E+06	2,52E+06	2,35E+06

II.1.6- Recuento y viabilidad de células CD3+ en SCU descongelada.

Aunque en el caso de las células CD3+ no pudimos calcular las recuperaciones celulares respecto al producto en fresco, no se determina esta población en los protocolos rutinarios de criopreservación, los datos de recuento total y de células CD3+ vivas fueron similares entre los grupos de estudio, a los obtenidos con células CD34+ según la solución de dilución empleada.

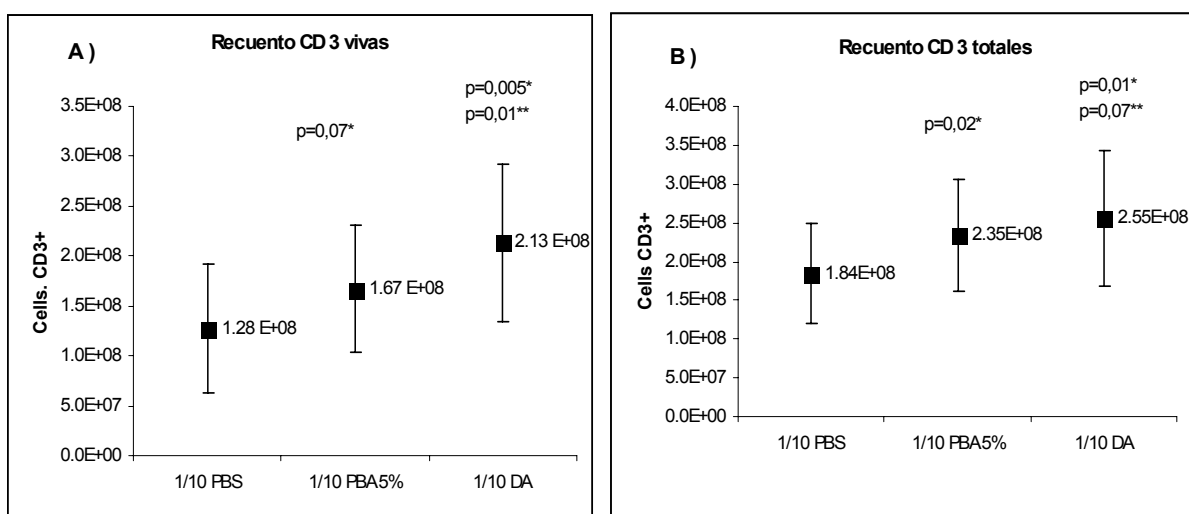
El número total de células CD3+ en el descongelado fue similar, en media, entre las muestras diluidas con PBA5% o con Dextrano Albúmina, 2.55×10^8 y 2.35×10^8 respectivamente ($p = 0.07$), mientras que en las muestras diluidas en PBS se recuperó un 28% menos de células CD3+ totales, 1.84×10^8 (Tabla 4). Este resultado fue estadísticamente significativo al comparar este grupo de estudio con las muestras diluidas en PBA5% y en Dextrano Albúmina, $p = 0.02$ y $p = 0.01$ respectivamente e ilustra el alcance que puede tener el choque osmótico sobre las muestras descongeladas (Fig 9).

El recuento de células vivas experimentó para el conjunto de CD3+ diferencias importantes. En este sentido, la diferencia en el recuento de células CD3+ vivas entre muestras diluidas en PBA5% o en Dextrano Albúmina fue del 20% ($p = 0.01$) y del 20% y 40% entre las muestras diluidas en PBS y las diluidas en PBA5% y Dextrano Albúmina respectivamente. Estas diferencias fueron el doble que las observadas con el conjunto de células CD34+. Las diferencias de viabilidad entre muestras explicarían estos datos.

La viabilidad media de las muestras diluidas en Dextrano Albúmina fue de un $79 \pm 9\%$ mientras que las observadas en las muestras diluidas en PBA5% y PBS fueron de $56 \pm 14\%$ y $48 \pm 18\%$ respectivamente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en todos los casos y tuvieron un peso específico importante en las diferencias de recuento entre grupos de estudio (Fig 10).

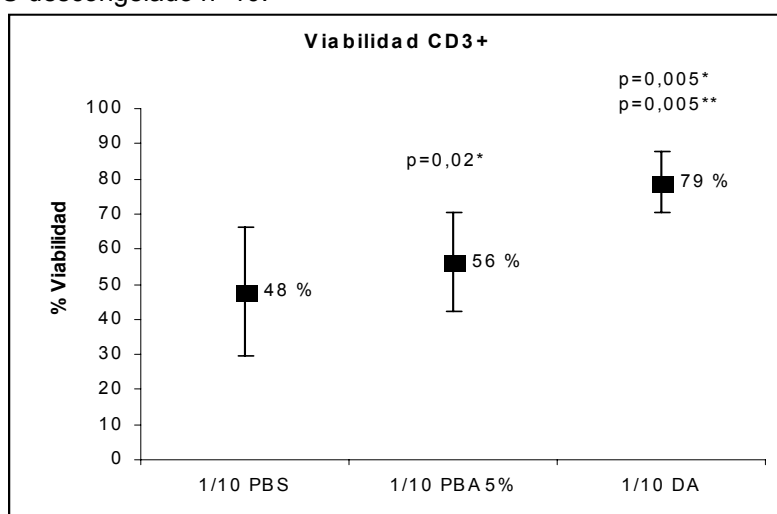
La distribución de viabilidades de las células CD3+ medidas por 7AAD siguió un patrón similar a las observadas con tinción TB. En la Fig 11 se muestra para cada uno de los grupos de estudio la distribución de valores de viabilidad. Observamos que las muestras del grupo de aféresis diluidas en solución Dextr-Alb se encuentran alrededor del 80% de viabilidad mientras que las mismas muestras diluidas en las salino o PBA5% llegan a alcanzar valores de viabilidad menores del 50%.

Fig 9. Efecto de la dilución de un descongelado en la recuperación de células CD3+. SCU descongelado n=10.



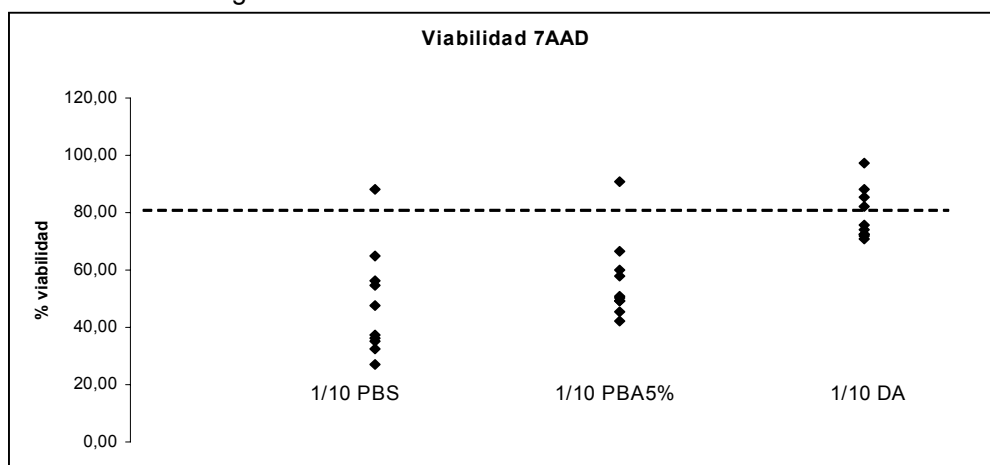
*p test de Wilcoxon vs 1/10PBS. ** p test de Wilcoxon vs 1/10PBA5%.
PBS, Solución salina. PBA5%, PBS al 5% v/v de HSA. DA, solución Dextrano Albúmina. p de test Wilcoxon.

Fig 10. Efecto de la dilución de un descongelado en la viabilidad (7AAD) de células CD3+. SCU descongelado n=10.



*p test de Wilcoxon vs 1/10PBS. ** p test de Wilcoxon vs 1/10PBA5%.
PBS, Solución salina. PBA5%, PBS al 5% v/v de HSA. DA, solución Dextrano Albúmina. p de test Wilcoxon.

Fig 11. Viabilidad de las células CD3+.
SCU descongelado n=10.



El número total de células CD3+ recuperadas en cada grupo experimental se muestran en la siguiente Tabla (Tabla 4).

Tabla 4. Recuento de células CD3+ totales.
SCU descongelado n=10.

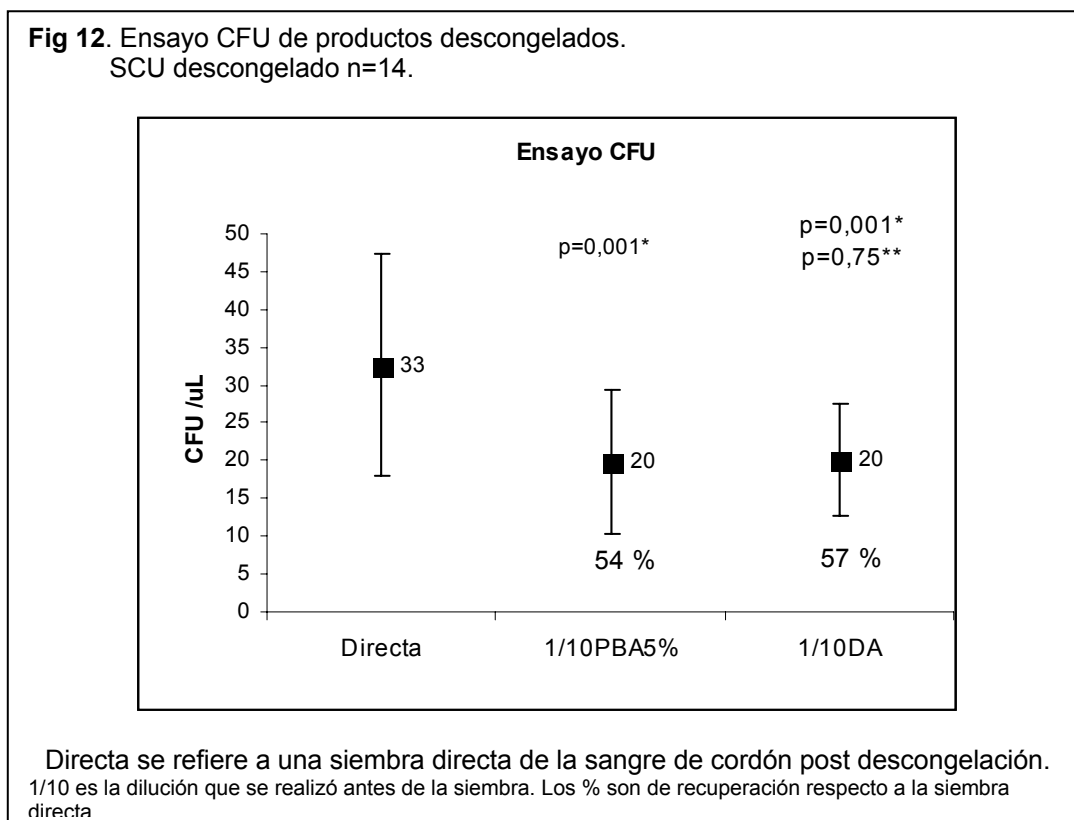
	1/ 10 PBS	1/ 10 PBS 5%	1/ 10 Dextrano-Albúmina
Media	1,84E+08	2,35E+08	2,55E+08
Mediana	1,97E+08	2,06E+08	2,08E+08
Max.	2,93E+08	3,48E+08	3,89E+08
Min.	8,56E+07	1,19E+08	1,58E+08
SD	6,45E+07	7,21E+07	8,77E+07

II.1.7- Recuperación de colonias clonogénicas en SCU descongelada

En esta serie de experimentos valoramos el efecto que la dilución de un descongelado tiene sobre la actividad funcional *in vitro* de las CPH de SCU. Para ello se utilizó la técnica de cultivo clonogénico o ensayo CFU para muestras descongeladas y diluidas 1/10 en PBA5% y en solución Dextrano-Albúmina.

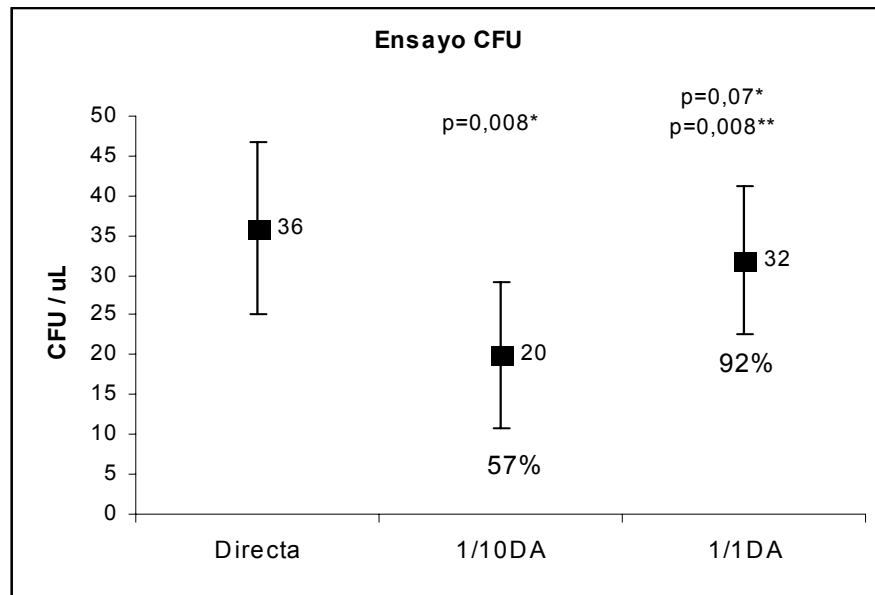
Debido a que no disponemos de los resultados de cultivo clonogénico de las muestras precongelación, comparamos los resultados obtenidos después de la dilución con los obtenidos mediante la siembra de la mismas muestras pero sin ningún tipo de manipulación, esto es, se sembró el mismo número total de células que en el caso de los grupos de estudio pero directamente después de su descongelación, sin dilución.

El contenido medio de CFU por microlitro de producto sembrado (CFU / uL) en la SCU descongelada sin manipular fue de 33 ± 15 CFU / uL mientras que para las muestras diluidas en PBS5% o en solución Dextrano-Albúmina fue de 20 ± 10 CFU/uL y 20 ± 10 CFU/uL respectivamente. Estos valores representan una recuperación de colonias del $54 \pm 19\%$ y del $57 \pm 11\%$ para los mismos grupos de estudio (Fig. 12)



La pérdida de capacidad clonogénica de las muestras diluidas fue similar independientemente de la solución de dilución utilizada, 46% y 43% para las soluciones PBA5% y Dextr-Alb respectivamente. Estas diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas ($p=0.75$, test de Wilcoxon para muestras relacionadas) pero si lo fueron respecto a la muestra sembrada directamente post descongelación, sin manipular ($p=0.001$, test de Wilcoxon para muestras relacionadas).

Puesto que la dilución (1/10) de las muestras en Dextr-Alb no mostró una ventaja significativa en la recuperación de colonias post descongelación, decidimos ensayar una dilución 1/2 (vol:vol) de muestras descongeladas en esta solución y comparar la recuperación clonogénica con una dilución 1/10 de las mismas muestra. Una vez más y como control interno, se sembraron esas mismas muestras en paralelo pero sin manipulación previa a la siembra. Estos experimentos se realizaron para determinar el efecto de la extensión de la dilución (1:10 vs 1:1) en la recuperación de colonias (Fig. 13).

Fig 13. Ensayo CFU de productos descongelados. SCU descongelado n=10.

Directa se refiere a una siembra directa de la sangre de cordón post descongelación. 1/10 es la dilución que se realizó antes de la siembra. Los % son de recuperación respecto a la siembra directa.

Las muestras sembradas directamente post descongelación mostraron 34 ± 11 CFU / uL mientras que las muestras diluidas 1/10 y 1/2 en Dextr-Alb rindieron 20 ± 9 CFU / uL y 31 ± 9 CFU / uL respectivamente. Así, reproduciendo los datos de siembra obtenidos anteriormente, la muestra diluida 1/10 perdió un 43% de la capacidad clonogénica mientras que la muestra diluida 1/2 perdió tan solo un 8% de las colonias determinadas en la siembra directa. La pérdida de capacidad clonogénica de la muestra diluida 1/10 respecto a la muestra sembrada directamente fue estadísticamente significativa ($p=0.008$, test de Wilcoxon para muestras relacionadas) mientras que la pérdida de capacidad clonogénica en la muestra diluida 1/2 (8%) no fue estadísticamente significativa cuando se comparó con los resultados de siembra de muestras no manipuladas ($p=0.07$, test de Wilcoxon para muestras relacionadas).

II.2- Prevención del choque osmótico postdescongelación mediante la aplicación de una etapa de equilibrio osmótico previa a la infusión.

Tras evidenciar el efecto que el choque osmótico tiene sobre un descongelado en cuanto a recuento, viabilidad y capacidad clonogénica, nos propusimos desarrollar y validar una técnica de manipulación para productos hematopoyéticos descongelados capaz de preservar el producto frente a las manipulaciones rutinarias durante la cuantificación y calificación del injerto. Estas manipulaciones incluyen normalmente diluciones para el recuento de CNT en el contador automático y para el cálculo de viabilidad por tinción con TB.

En el caso de la determinación citométrica de los productos hematopoyéticos, es importante destacar el paso de lisis de eritrocitos que acompaña al protocolo de incubación con anticuerpos monoclonales. En este sentido, la dilución en estos tampones de lisis (habitualmente 1/10 – 1/20) puede provocar un cambio osmótico brusco en el medio extracelular del producto hematopoyético descongelado que, tal y como hemos visto en el apartado anterior, afecta a la calidad del injerto.

El protocolo de manipulación de descongelados se basa en el protocolo de manipulación de SCU desarrollado en el NY Cord Blood Centre y que ha demostrado mejores recuperaciones celulares post descongelación así como la preservación de la capacidad clonogénica de las muestras criopreservadas. Este protocolo consiste, básicamente, en permitir un paso de equilibrio osmótico de las células descongeladas mediante su dilución directa volumen a volumen (dilución 1/2) en un tampón hiperosmolar que contiene Albúmina y Dextrano 40, es decir, moléculas capaces de asociar agua libre y por tanto controlar la entrada masiva de agua en la célula en respuesta a un cambio osmótico repentino en el medio extracelular. Este paso de equilibrio se extiende por espacio de cinco minutos y se realiza a 4°C.

II.2.1- La etapa de equilibrio confiere estabilidad frente a un cambio brusco de osmolaridad.

En esta serie de experimentos utilizamos alícuotas de CPH-A criopreservadas a las que, después de su descongelación, se sometió a un choque osmótico mediante dilución (1/10) en PBS sin proteína. Ensayamos dos grupos de estudio: **el grupo control**, en el que se determinó directamente el recuento de células CD34+ y su viabilidad antes y después del choque osmótico y **el grupo de equilibrio**, en el que después de la descongelación las muestras fueron diluidas volumen a volumen en solución Dextr-Alb y mantenidas a 4°C durante 5 minutos y en el que posteriormente se determinaron el recuento de células CD34+ y su viabilidad antes y después del choque osmótico.

El protocolo de adquisición / análisis de las muestras de ambos grupos de estudio se basó en el doble marcaje positivo de anticuerpos monoclonales anti CD45 y CD34. Las muestras fueron asimismo teñidas con 7AAD para valorar la viabilidad de las células de interés.

II.2.1.1- Recuento de células CD34+ en CPH-A descongeladas.

El recuento precongelación de los productos utilizados se resumen en la siguiente tabla (Tabla 5).

Tabla 5. CPH-A utilizadas. Datos precongelación.			
Descripción de los productos de Sangre Periférica Movilizada utilizados. n=10			
	Mediana	Mínimo	Máximo
CNT	50.9 x 10 ⁹	11.5 x 10 ⁹	114 x 10 ⁹
CD45 (fsc / ssc)	55.7 x 10 ⁹	9.82 x 10 ⁹	137 x 10 ⁹
CD34 (CD45+ CD34+)	86.6 x 10 ⁶	28.6 x 10 ⁶	736 x 10 ⁶

La mediana de volumen recogido en el proceso de leucoaféresis de las muestras utilizadas en estos experimentos fue de 255 mL (137-596) con una concentración media de 22.1x10⁶ CN/mL. El volumen de congelación fue de 200mL (140-280) después del proceso de reducción de volumen y toma de muestras para control de esterilidad y tubos control.

Después de someter las muestras descongeladas a una dilución (1/10) en PBS, observamos una pérdida del 32% ± 36% (p=0.02) en el recuento de células CD45+ CD34+ vivas cuando comparamos con el recuento de estas células en la muestras descongeladas sin manipular (Tabla 6, Control vs Control 1/10). La viabilidad de las células CD34+ disminuyó

hasta valores medios de $84\% \pm 15\%$ y $68\% \pm 13\%$ en los grupos control y el grupo expuesto a dilución en PBS ($p=0.02$).

El recuento de células CD45+ CD34+ totales (vivas y muertas) rindió una recuperación celular entre grupos de un $81\% \pm 30\%$ pero que no fue estadísticamente significativa ($p=0.08$).

Tabla 6. Efecto de un cambio osmótico brusco sobre una muestra descongelada.

Células CD45+ / CD34+ / 7AAD- post descongelación

ID	CONTROL		CONTROL 1/10		Δ
	CD34 vivas	% 7AAD-	CD34 vivas	% 7AAD-	
APH001	1,68E+07	94%	6,44E+06	74%	38%
APH002	2,52E+07	99%	1,82E+07	54%	72%
APH003	2,59E+07	88%	1,02E+07	63%	39%
APH004	8,95E+07	95%	3,79E+07	44%	42%
APH005	3,36E+08	98%	1,50E+08	71%	45%
APH006	8,55E+07	96%	4,19E+07	92%	49%
APH007	2,92E+07	60%	4,44E+07	74%	152%
APH008	4,12E+07	69%	4,08E+07	66%	99%
APH009	3,92E+07	71%	2,82E+07	69%	72%
APH010	1,60E+07	70%	1,16E+07	70%	73%
media	7,05E+07	84%	3,89E+07	68%	68%
mediana	3,42E+07	91%	3,31E+07	70%	60%
max	3,36E+08	99%	1,50E+08	92%	152%
min	1,60E+07	60%	6,44E+06	44%	38%

Δ ; recuperación celular.

Control se refiere a una muestra descongelada y analizada. Control 1/10 se refiere a las mismas muestras que control pero que fueron analizadas tras una dilución 1/10 en PBS post descongelación.

El efecto del cambio brusco de osmolaridad de la muestra descongelada por dilución (1/10) en PBS tuvo un efecto radicalmente distinto para las muestras que fueron equilibradas en solución Dextr-Alb tras la descongelación (estas muestras fueron las mismas que las utilizadas para valorar el efecto del cambio brusco de osmolaridad en muestras descongeladas pero sin un paso de equilibrio).

Las muestras que siguieron una etapa de equilibrio osmótico tras su descongelación no modificaron sus valores de viabilidad celular ni los recuentos de células CD45+ CD34+ después de someterlas a un cambio de osmolaridad por dilución en PBS. Los valores de viabilidad en estas muestras fueron $88\% \pm 7\%$ y $87\% \pm 7\%$ en las muestras equilibradas y las muestras equilibradas y diluidas en PBS respectivamente (Tabla 7).

El recuento de las células CD45+ CD34+ vivas rindió una recuperación celular (post dilución en PBS) del $98\% \pm 19\%$, indicando una diferencia mínima de un 2% después del choque osmótico, que no fue estadísticamente significativa ($p=0.8$) (Tabla 7).

El recuento de células CD45+ CD34+ totales (vivas y muertas) fue prácticamente el mismo tras la dilución en PBS en la muestras descongeladas y equilibradas previamente en Dextr-Alb, se recuperó un $101\% \pm 21\%$ para estas células tras las manipulaciones indicadas ($p=0.9$).

Tabla 7. Efecto de un cambio osmótico brusco sobre una muestra descongelada y equilibrada osmóticamente.

Células CD45+ / CD34+ / 7AAD- post descongelación					
ID	EQUILIBRIO		EQUILIBRIO 1/10		Δ
	CD34 vivas	% 7AAD-	CD34 vivas	% 7AAD-	
APH001	2,80E+07	94%	2,24E+07	80%	80%
APH002	3,16E+07	78%	2,66E+07	78%	84%
APH003	2,87E+07	78%	2,15E+07	85%	75%
APH004	9,24E+07	82%	1,17E+08	77%	127%
APH005	4,39E+08	86%	4,48E+08	86%	102%
APH006	8,54E+07	98%	9,14E+07	98%	107%
APH007	6,52E+07	92%	6,91E+07	95%	106%
APH008	9,72E+07	93%	8,85E+07	88%	91%
APH009	4,44E+07	88%	3,51E+07	90%	79%
APH010	2,96E+07	92%	3,82E+07	95%	129%
media	9,42E+07	88%	9,58E+07	87%	98%
mediana	5,48E+07	90%	5,36E+07	87%	97%
max	4,39E+08	98%	4,48E+08	98%	129%
min	2,80E+07	78%	2,15E+07	77%	75%

Δ ; recuperación celular.

Equilibrio se refiere a una muestra descongelada, diluida 1/2 en solución Dextr-Alb y analizada. Equilibrio 1/10 se refiere a las mismas muestras que control pero que fueron analizadas tras una dilución 1/10 en PBS post descongelación.

Cuando comparamos los resultados de recuento de células CD45+ CD34+ totales (vivas y muertas) entre grupos, muestras analizadas directamente postdescongelación y muestras equilibradas en solución Dextr-Alb postdescongelación observamos una diferencia del $23\% \pm 17\%$ ($p=0.01$) favoreciendo el recuento del grupo en el que hubo una etapa de equilibrio antes del análisis citométrico. La viabilidad entre grupos no fue estadísticamente significativa ($p=0.4$), por lo que la diferencia en el recuento está posiblemente influenciada por una pérdida celular debida a un mecanismo de lisis celular y no simplemente a una disminución en la viabilidad.

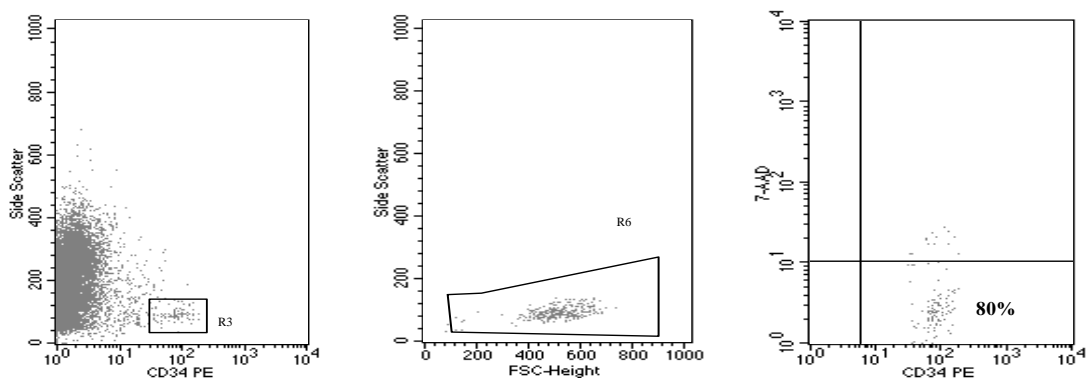
Estos datos abren un nuevo interrogante sobre la manipulación de las muestras descongeladas **¿la propia técnica de determinación citométrica puede estar influyendo en los recuentos celulares post descongelación?**. En este sentido, la solución de lisis de glóbulos rojos podría provocar un choque osmótico sobre la muestra descongelada que puede ser prevenido o cuanto menos amortiguado por el paso de equilibrio osmótico en solución Dextrano-albúmina.

II.2.1.2- Viabilidad de células CD34+ en CPH-A descongeladas.

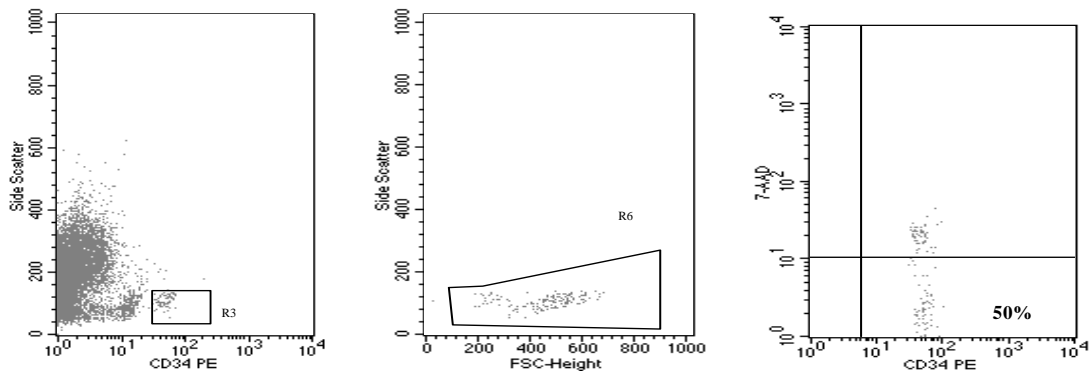
A continuación mostramos algunos histogramas de la determinación citométrica de los experimentos relacionados en esta sección (II.2) y del efecto que la dilución en PBS tuvo sobre la viabilidad de las células CD45+ CD34+ medida por tinción con 7AAD. Los histogramas de células CD45+ CD34+ vivas pertenecen al protocolo de determinación citométrica de CPH.

Fig 14. Efecto del cambio brusco de osmolaridad tras descongelación en el grupo control.

A) CONTROL.

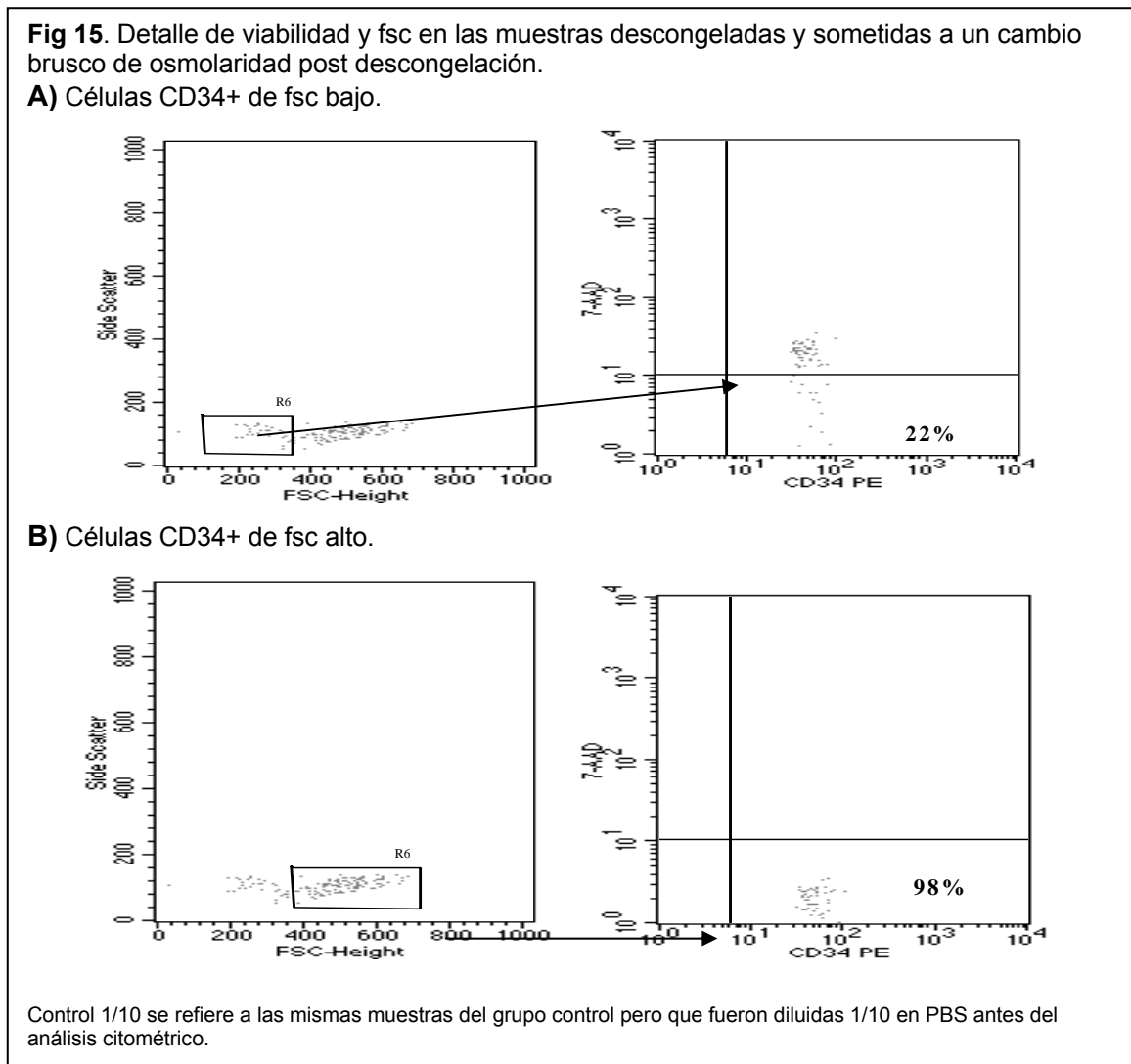


B) CONTROL 1/10.



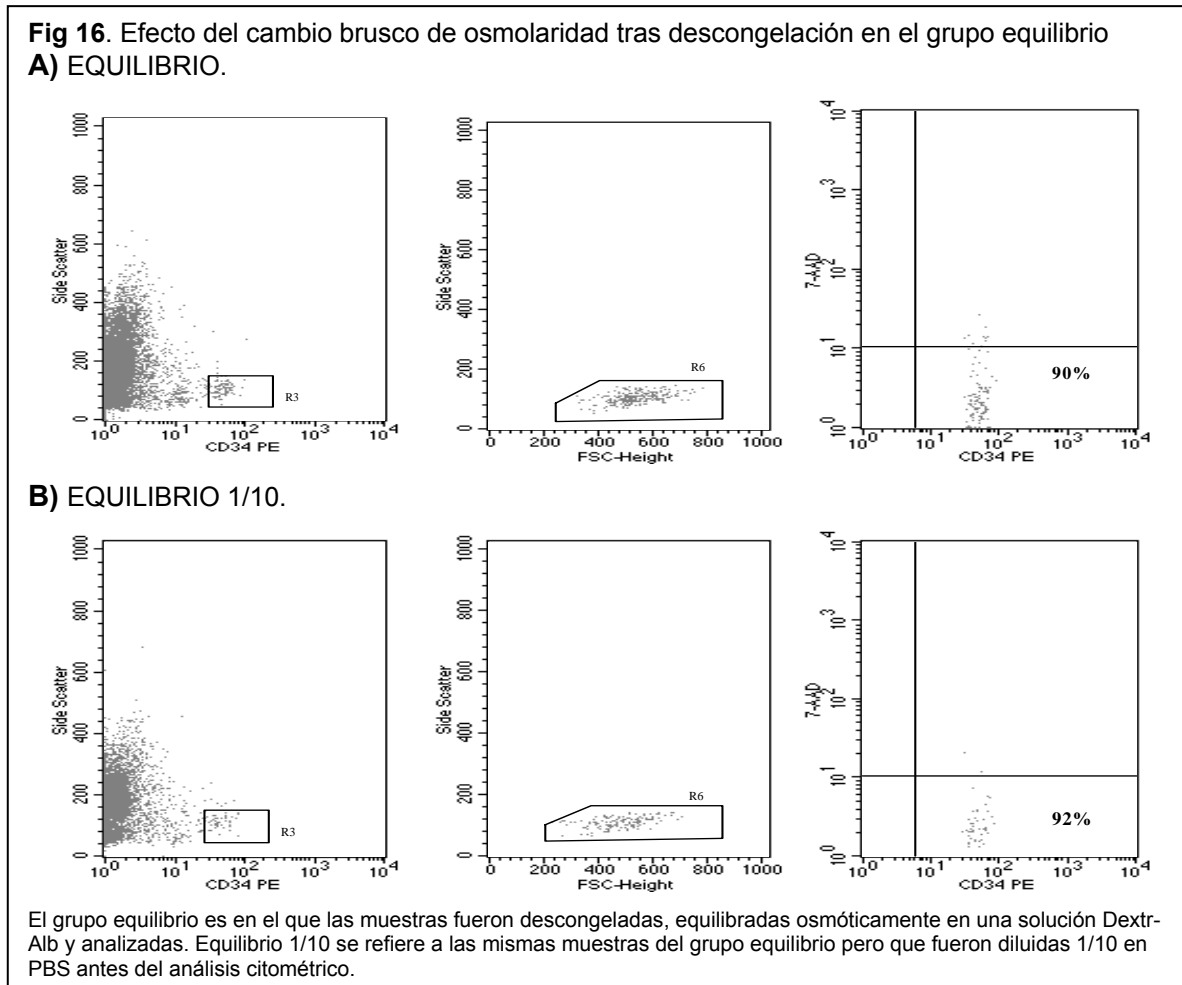
El grupo control es en el que las muestras fueron descongeladas y analizadas directamente. Control 1/10 se refiere a las mismas muestras del grupo control pero que fueron diluidas 1/10 en PBS antes del análisis citométrico.

En la Fig 14 observamos la disminución de viabilidad que tiene lugar tras el cambio brusco de osmolaridad del medio extracelular en muestras descongeladas. Es de destacar que las muestras que padecieron un choque osmótico mostraron dos tipos de células CD34+ según su tamaño, una de alto fsc (mayor tamaño) y otra de bajo fsc (menor tamaño). Estas poblaciones están relacionadas con la viabilidad medida por 7AAD de forma que la población con mayor tamaño está compuesta principalmente con células vivas mientras que las células con un tamaño menor (fsc bajo) lo están con células muertas (Fig 15). Las muestras que fueron analizadas directamente tras la descongelación (sin dilución en PBS, Fig 14,A) mostraron una sola población de células CD34+ para fsc (tamaño).



En el grupo de células CD34+ de menor tamaño (fsc bajo) de esta muestra (Fig 15) observamos que el 78% de los eventos que lo forman son positivos para 7AAD mientras que el 98% de los eventos que forman parte del grupo de CD34+ de mayor tamaño son células negativas para este marcador de viabilidad. La viabilidad global de la muestra representada fue del 50% mientras que en el global de las muestras estudiadas para este grupo de equilibrio fue del 68%.

Tal y como hemos mostrado en la Tabla 7, el efecto de la dilución 1/10 en las muestras equilibradas osmóticamente postdescongelación no afectó ni al recuento ni a la viabilidad de las muestras de este grupo experimental (Fig 16).



II.2.2- Introducción de la etapa de equilibrio en la determinación citométrica de células descongeladas.

II.2.2.1- Recuento de células CD3+ en SCU descongelada.

En esta serie de experimentos valoramos el **efecto que la etapa de lisis de eritrocitos tiene en los resultados de CMF** (no hubo choque osmótico por dilución), centrándonos en la población de linfocitos CD3+ de SCU. La elección de una población celular como la linfocitaria, con un porcentaje mucho más alto que las células progenitoras, permite valorar más objetivamente los cambios que tienen lugar sobre las características celulares que se pueden estudiar mediante CMF.

Después de la descongelación, las muestras fueron alicuotadas para formar los dos grupos de estudio según el protocolo de análisis citométrico utilizado. La determinación citométrica del primer grupo se realizó directamente, es decir, que las muestras de este grupo siguieron el protocolo “clásico”, como el que se aplica a una muestra en fresco, eso es marcaje, lisis y adquisición. Este grupo fue denominado **grupo control**. El **grupo experimental**, que denominamos grupo equilibrio, siguió el mismo proceso pero con un paso previo de equilibrio osmótico de 5 minutos a 4°C en la solución de Dextrano Albúmina descrita por Rubinstein.

Los productos de SCU que se utilizaron en estos experimentos (Tabla 8) fueron descartados del inventario del banco por falta de documentación, bajo contenido en células progenitoras y/o nucleadas o por microbiologías positivas. Estas muestras fueron almacenadas en un congelador de -80°C antes de su descongelación. El banco de SCU utiliza algunas unidades a investigación siguiendo criterios de mejora del inventario y por el interés de almacenar unidades con el máximo número de progenitores hematopoyéticos.

Tabla 8. Unidades de SCU utilizadas. Datos precongelación.

Descripción de los productos de Sangre de Cordón umbilical (UCB) utilizados. N=10

	Mediana	Mínimo	Máximo
CNT	1.22 x 10 ⁹	1.7 x 10 ⁹	9.6 x 10 ⁹
CD45 (fsc / ssc)	8.48 x 10 ⁸	6.17 x 10 ⁸	1.37 x 10 ⁹
CD3 (CD45+ CD3+)	1.76 x 10 ⁸	1.24 x 10 ⁸	2.53 x 10 ⁸
CD34 (CD45+ CD34+)	1.55 x 10 ⁶	7.36 x 10 ⁵	2.76 x 10 ⁶

El paso de equilibrio osmótico de 5 minutos en Dextrano Albúmina resultó en un recuento de células CD3+ vivas un $56\% \pm 14\%$ ($p=0.005$) mayor que cuando se sometió a las células descongeladas a un protocolo clásico de citometría (Tabla 9).

La viabilidad de las células CD3+ varió del $90\% \pm 5\%$ en el grupo de equilibrio al $40\% \pm 11\%$ en el grupo control ($p=0.005$). Esta enorme diferencia en viabilidad nos indica el alcance que puede llegar a tener un choque osmótico sobre la integridad de las membranas de las células descongeladas (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de un protocolo de citometría clásico sobre los linfocitos vivos en los grupos control y equilibrio de SCU.

Efecto del choque osmótico sobre las células CD45+ / CD3+ / 7AAD-.					
ID	CONTROL		EQUILIBRIO		Δ
	CD3 vivas	% 7AAD-	CD3 vivas	% 7AAD-	
UCB001	5.71E+07	40	1.53E+08	90	63%
UCB002	7.11E+07	48	1.90E+08	88	63%
UCB003	3.35E+07	33	1.08E+08	84	69%
UCB004	1.07E+08	46	2.38E+08	94	55%
UCB005	3.93E+07	23	1.48E+08	84	73%
UCB006	4.00E+07	34	1.13E+08	94	64%
UCB007	1.00E+08	59	1.38E+08	95	27%
UCB008	7.71E+07	38	1.55E+08	96	50%
UCB009	6.07E+07	50	9.83E+07	88	38%
UCB010	7.32E+07	31	1.77E+08	85	59%
media	6.6E+07	40	1.5E+08	90	56%
mediana	6.6E+07	39	1.5E+08	89	61%
max	1.1E+08	59	2.4E+08	96	73%
min	1.4E+07	23	9.8E+07	84	27%

Δ ; pérdida celular. Los valores negativos indican que el recuento fue menor en el grupo de equilibrio que en el grupo control.

Control se refiere a una muestra descongelada y analizada Equilibrio se refiere a una muestra descongelada, diluida 1/2 en solución Dextr-Alb y analizada

La técnica citométrica empleada no interfiere en los resultados de recuento celular. El número total de células CD3+ (vivas y muertas) fue prácticamente el mismo en los grupos de estudio (Tabla 10). Los recuentos celulares mantuvieron un 98% de identidad entre los grupos experimentales, la diferencia de recuento de células CD45+ CD3+ totales (vivas y muertas) no fue estadísticamente significativa ($p=0.62$). Estos resultados sugieren que el protocolo clásico de citometría para el recuento celular de células hematopoyéticas post descongelado afectó, fundamentalmente, a la viabilidad celular de las muestras estudiadas.

Los recuentos de células CD45+ CD3+ totales de las muestras en los dos grupos de estudio se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 10. Efecto de un protocolo de citometría clásico sobre los linfocitos totales en los grupos control y equilibrio

Efecto del choque osmótico sobre las células CD45+ / CD3+.

ID	CONTROL	EQUILIBRIO	Δ
	CD3 total	CD3 total	
UCB001	1.38E+08	1.69E+08	18%
UCB002	1.49E+08	2.14E+08	31%
UCB003	1.02E+08	1.27E+08	20%
UCB004	2.33E+08	2.54E+08	8%
UCB005	1.71E+08	1.76E+08	3%
UCB006	1.17E+08	1.20E+08	2%
UCB007	1.70E+08	1.45E+08	-17%
UCB008	2.04E+08	1.62E+08	-26%
UCB009	1.22E+08	1.12E+08	-10%
UCB010	2.35E+08	2.09E+08	-13%
media	1.6E+08	1.7E+08	2%
mediana	1.6E+08	1.7E+08	3%
max	2.4E+08	2.5E+08	31%
min	1.0E+08	1.1E+08	-26%

Δ ; pérdida celular. Los valores negativos indican que el recuento fue menor en el grupo de equilibrio que en el grupo control.

Control se refiere a una muestra descongelada y analizada Equilibrio se refiere a una muestra descongelada, diluida 1/2 en solución Dextr-Alb y analizada

II.2.2.2- Recuento de células CD3+ en CPH-A descongeladas.

Los productos de aféresis utilizados en estos experimentos fueron descartados para su utilización clínica por remisión de la enfermedad o por "éxito" del paciente. Son productos conservados en fase vapor de un tanque de nitrógeno líquido por un periodo medio de dos años. Los datos celulares de estos productos antes de su criopreservación se muestran a continuación (Tabla 11).

Tabla 11. CPH-A utilizadas. Datos pre congelación.

Descripción de los productos de Sangre Periférica Movilizada utilizados. N=10			
	Mediana	Mínimo	Máximo
CNT	13.0 x 10 ⁹	10.0 x 10 ⁹	31.1 x 10 ⁹
CD45 (fsc / ssc)	12.5 x 10 ⁹	8.76 x 10 ⁹	30.0 x 10 ⁹
CD3 (CD45+ CD3+)	27.3 x 10 ⁸	1.70 x 10 ⁸	120 x 10 ⁸
CD34 (CD45+ CD34+)	35.5 x 10 ⁶	11.5 x 10 ⁶	97.0 x 10 ⁶

Los recuentos de células CD45+ CD3+ totales de las muestras en los dos grupos de estudio se presentan en la siguiente tabla (Tabla 12).

Tabla 12. Efecto de un protocolo de citometría clásico sobre los linfocitos vivos en los grupos control y equilibrio de CPH-A.

Efecto del choque osmótico sobre las células CD45+ / CD3+ / 7AAD-.					
ID	CONTROL		EQUILIBRIO		Δ
	CD3 vivas	% 7AAD-	CD3 vivas	% 7AAD-	
APH011	2.18E+09	25	3.09E+09	45	29%
APH012	2.84E+09	67	3.36E+09	83	15%
APH013	1.09E+09	15	2.13E+09	55	49%
APH014	9.91E+08	61	1.71E+09	71	42%
APH015	4.78E+08	39	1.02E+09	79	53%
APH016	7.96E+09	53	7.28E+09	64	-9%
APH017	1.57E+09	35	2.85E+09	69	45%
APH018	4.22E+08	62	6.08E+08	89	31%
APH019	1.19E+09	71	1.14E+09	89	-4%
APH020	1.21E+08	82	1.49E+08	98	18%
media	1.26E+09	51	2.33E+09	74	27%
mediana	1.14E+09	57	1.92E+09	75	30%
max	7.96E+09	82	7.28E+09	98	53%
min	1.21E+08	15	1.49E+08	45	-9%

Δ; pérdida celular. Los valores negativos indican que el recuento fue menor en el grupo de equilibrio que en el grupo control.

Control se refiere a una muestra descongelada y analizada Equilibrio se refiere a una muestra descongelada, diluida 1/2 en solución Dextr-Alb y analizada

Observamos una pérdida del $27\% \pm 22\%$ de células CD3+ vivas favoreciendo al grupo experimental de equilibrio osmótico ($p=0.04$) (Tabla 12). Esta diferencia es equivalente a la observada en los valores de viabilidad de las mismas muestras entre grupos experimentales. En este caso, la viabilidad disminuyó del $74\% \pm 17\%$ en el grupo que se permitió un equilibrio osmótico previo a la determinación citométrica a un $51\% \pm 22\%$ ($p=0.005$) en el que se determinó la citometría directamente después de la descongelación.

La identidad del recuento de células CD3+ entre grupos de estudio fue del 95% ($p=0.5$), indicando que también en este tipo de muestras (CPH-A), tal y como sucedía con la SCU, la técnica de análisis citométrico no interfiere en el recuento celular total entre grupos (Tabla 13).

Tabla 13. Efecto de un protocolo de citometría clásico sobre los linfocitos totales en los grupos control y equilibrio

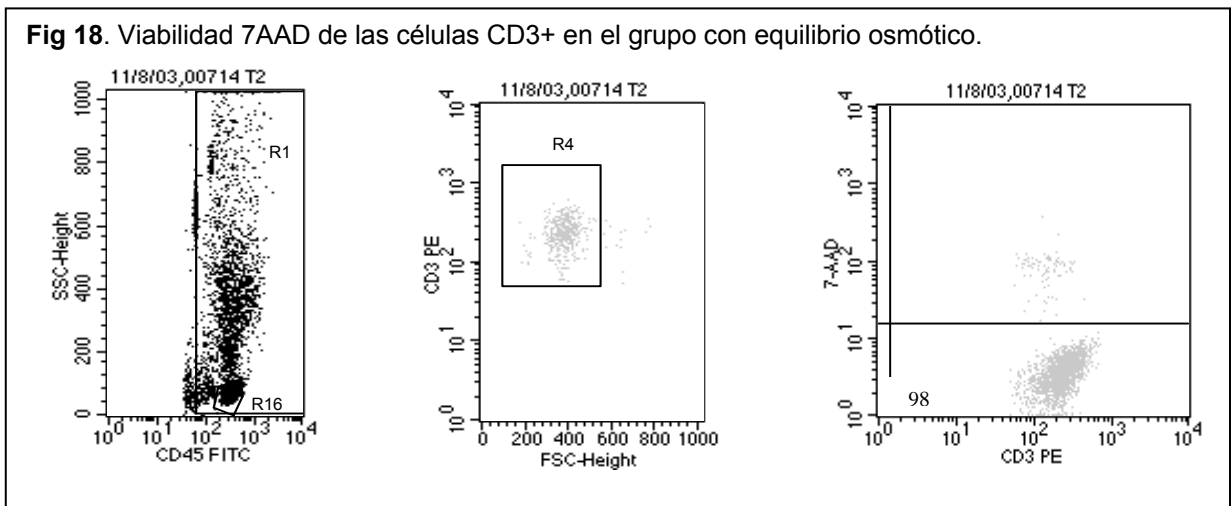
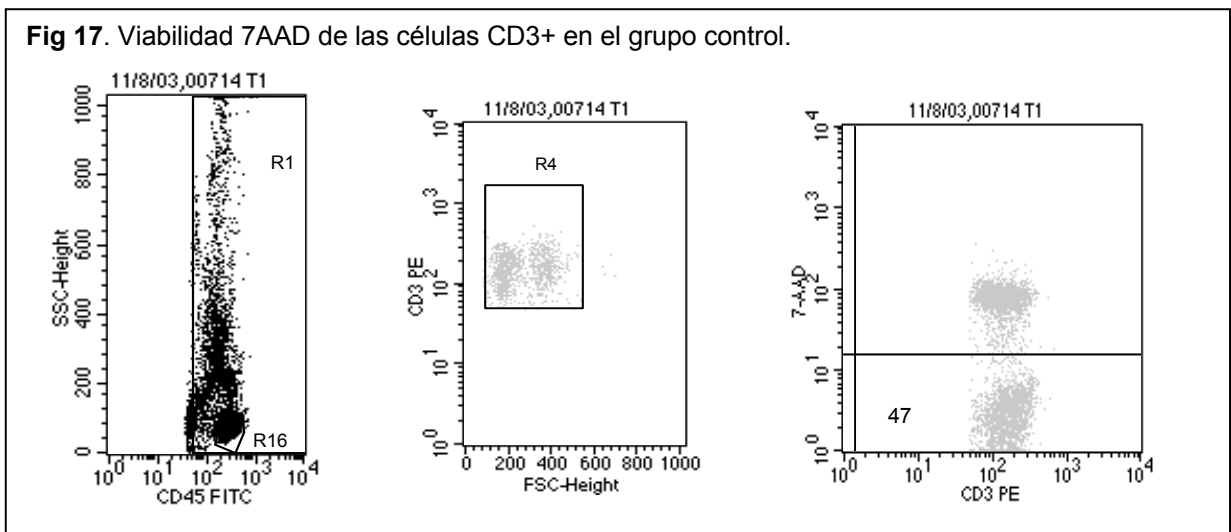
Efecto del choque osmótico sobre las células CD45+ / CD3+.			
	CONTROL	EQUILIBRIO	
ID	CD3 total	CD3 total	Δ
APH011	8.77E+09	6.91E+09	-27%
APH012	4.23E+09	4.07E+09	-4%
APH013	7.34E+09	6.05E+09	-21%
APH014	1.62E+09	2.40E+09	32%
APH015	1.24E+09	1.30E+09	5%
APH016	1.49E+10	1.13E+10	-32%
APH017	4.50E+09	4.81E+09	6%
APH018	6.80E+08	6.85E+08	1%
APH019	1.67E+09	1.43E+09	-17%
APH020	1.38E+08	1.52E+08	9%
media	3.00E+09	3.91E+09	-5%
mediana	2.95E+09	3.23E+09	-2%
max	1.49E+10	1.13E+10	32%
min	1.38E+08	1.52E+08	-32%

Δ ; pérdida celular. Los valores negativos indican que el recuento fue menor en el grupo de equilibrio que en el grupo control.

Control se refiere a una muestra descongelada y analizada Equilibrio se refiere a una muestra descongelada, diluida 1/2 en solución Dextr-Alb y analizada

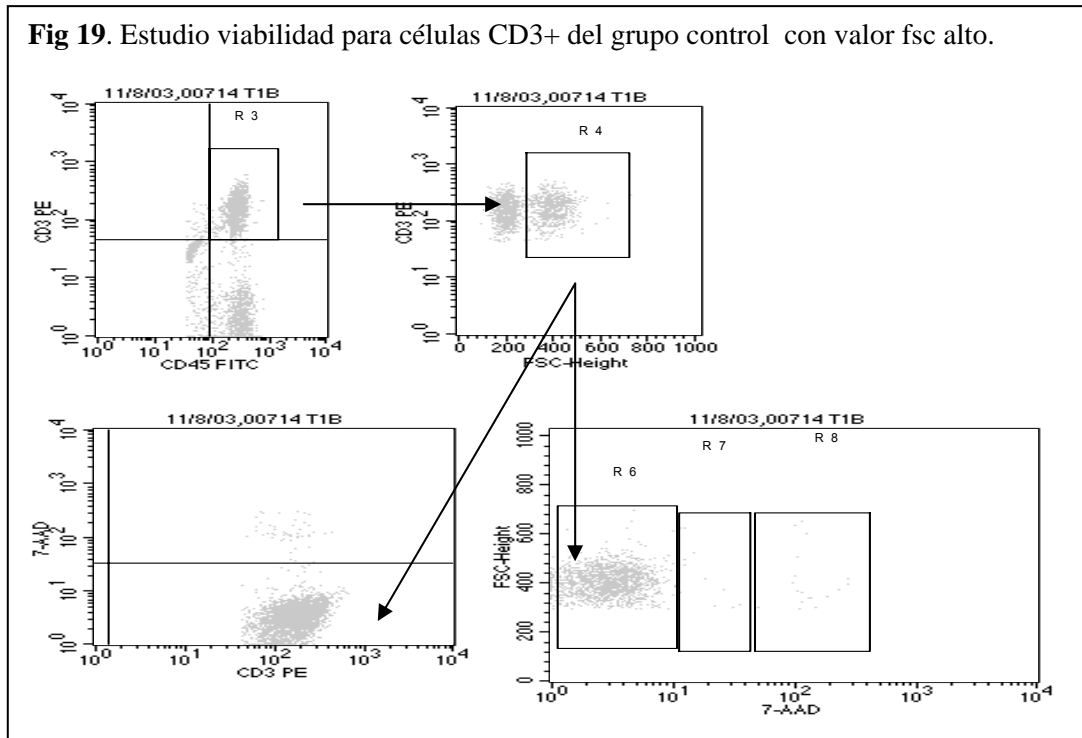
II.2.2.3- Viabilidad de células CD3+ en SCU descongelada.

Las Figuras 17 y 18 muestran la viabilidad medida por 7AAD de las células CD3+ en una muestra representativa de SCU para los dos grupos experimentales, grupo control y grupo con equilibrio osmótico previo a la determinación citométrica. Aunque en las muestras de CPH-A descongeladas la diferencia de viabilidades fue menor entre grupos experimentales que en el caso de SCU (Tabla 9 vs Tabla 12), estas muestras mostraron un perfil equivalente al observado en estas figuras.

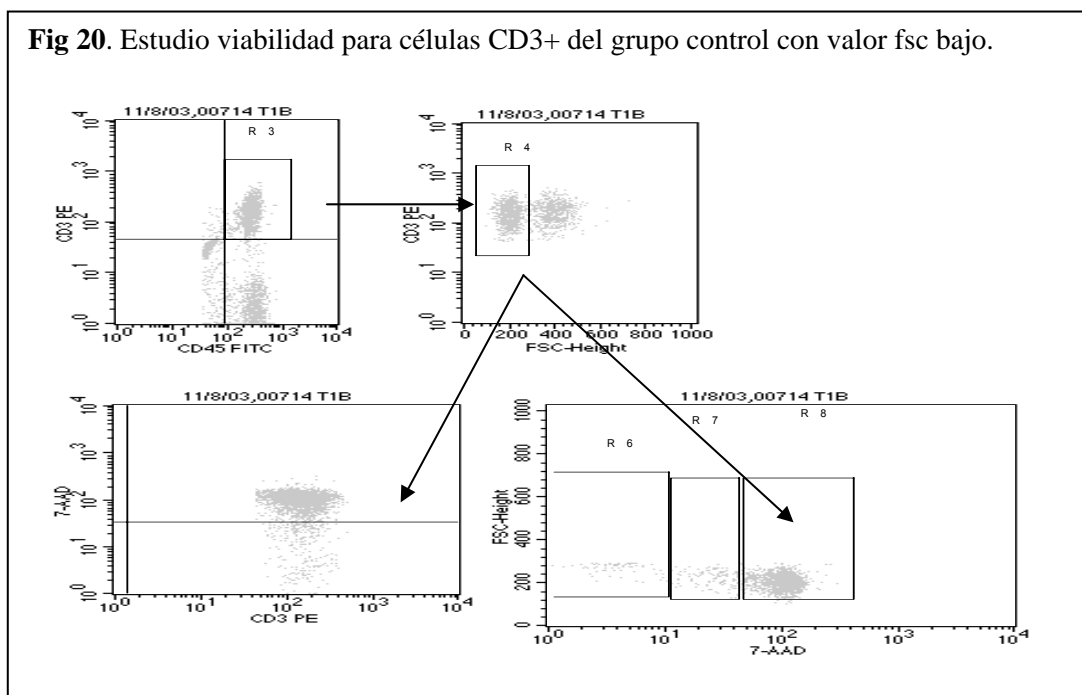


La pérdida de tamaño de las células CD3+, tal y como observamos anteriormente (II.2.1.2), está directamente relacionado con su viabilidad. Es muy interesante la pérdida de tamaño celular (fsc) de los linfocitos (CD45+/CD3+) en las muestras del grupo control (Fig 17). Este cambio no se dio en las muestras del grupo de equilibrio, que mostraron los eventos analizados como linfocitos agrupados en un solo tamaño celular (Fig. 18), este tamaño coincidió en todos los casos con el grupo de mayor viabilidad observado en las muestras del

grupo control. Un análisis más detallado de estas poblaciones mostró la relación entre la pérdida de tamaño celular y la viabilidad de las muestras (Fig 19, 20).

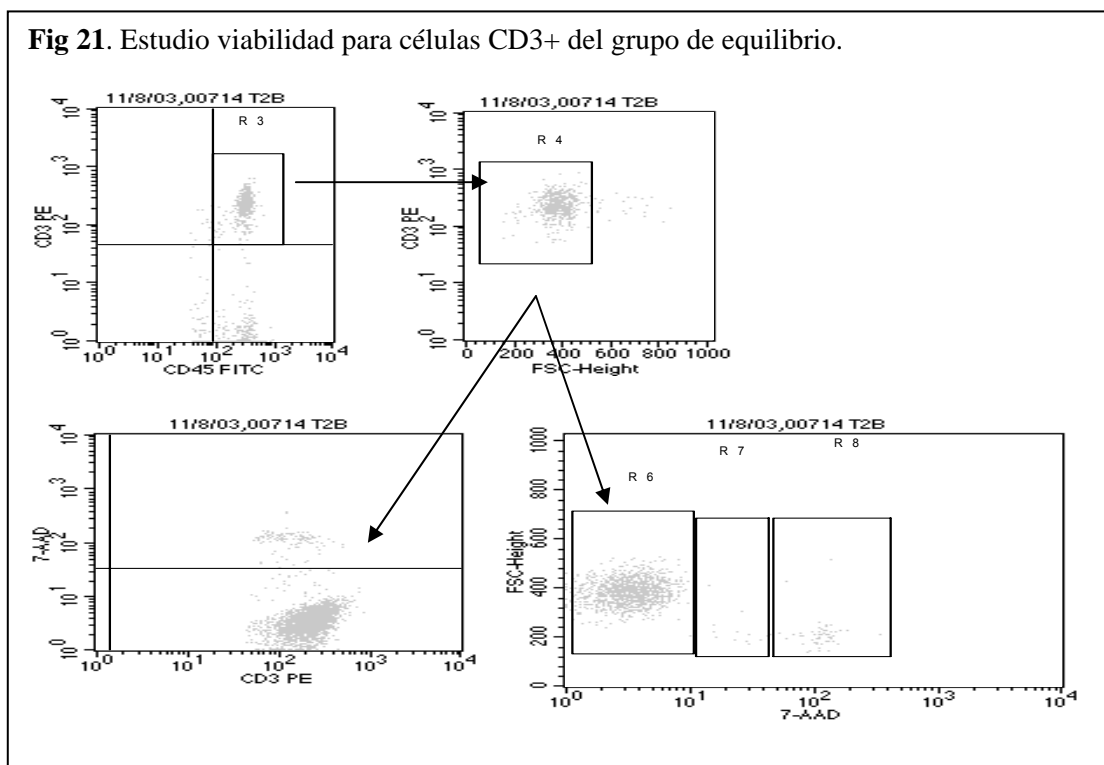


Las células CD3+ de mayor tamaño en el grupo control (valores altos de fsc) se correspondieron mayoritariamente con células negativas para 7AAD, es decir, células vivas (Fig 19). Las células CD3+ de menor tamaño en el grupo control (valores bajos de fsc) se correspondieron mayoritariamente con células positivas para 7AAD, es decir, con células muertas (Fig 20).



Clásicamente, el marcaje con 7AAD para una tipo celular determinado muestra tres tipos de poblaciones representadas según la intensidad de marcaje y el tamaño celular. Podemos observar este tipo de análisis en el histograma de fsc/7AAD de las figuras 19, 20 y 21. La población que no marca para 7AAD (células vivas, región R6 del histograma fsc/7AAD), la que es positiva para 7AAD (células necróticas, región R8 del histograma fsc/7AAD) y las células con un marcaje intermedio (células en apoptosis, región R7 del histograma fsc/7AAD). Para las muestras de SCU y de CPH-A estudiadas en los dos grupos experimentales, más del 95% de las células muertas habrían pasado por un proceso de necrosis, posiblemente debido a lisis celular causada por la entrada masiva de agua en la célula, y no por uno de apoptosis o muerte inducida.

Tal y como se ha comentado anteriormente, el grupo experimental que siguió un paso previo de equilibrio osmótico antes de la determinación citométrica muestra una población de CD3+ agrupada en un solo tamaño celular (fsc) (Fig 21). Tal y como sucedía con las muestras del grupo control, los linfocitos positivos para 7AAD se situaban mayoritariamente en valores de alta intensidad para este marcador y solo un porcentaje mínimo (< 2%) se situaban en la región R7 del histograma fsc/7AAD (apoptosis).



En estas muestras, grupo de equilibrio, se observa claramente como las células muertas (positivas para 7AAD) pierden tamaño respecto a las que se mantienen negativas para el marcaje con 7AAD.(Fig 21).

III

Aplicación clínica de la prevención del choque osmótico sobre productos hematopoyéticos descongelados mediante estabilización osmótica.

III.1- Aplicación a una técnica de citometría de flujo para la determinación de la calidad de un producto hematopoyético descongelado

Tal y como hemos observado en el apartado anterior con la población de linfocitos de SCU y CPH-A descongeladas, un protocolo de determinación citométrica clásico afecta, debido al cambio brusco de osmolaridad producido por la dilución de la muestra en solución de lisis, tanto al recuento como a la viabilidad de las muestras. La introducción de un paso de equilibrio osmótico de cinco minutos en solución Dextr-Alb tras la descongelación tiene como resultado una estabilización osmótica de la muestra.

En esta serie de experimentos validamos el protocolo de análisis citométrico de células CD34+ en muestras descongeladas después del paso de equilibrio osmótico y comparamos los resultados con los obtenidos mediante el análisis citométrico clásico, sin equilibrio osmótico previo. Las diferencias de recuento y viabilidad fueron comparadas con el recuento de células del producto en fresco para valorar la recuperación celular después de la criopreservación e ilustrar así las diferencias entre métodos de análisis. Asimismo, se calcularon la reproducibilidad y el coeficiente de variación del método de análisis propuesto para definir la idoneidad de la técnica para su utilización en el laboratorio de terapia celular.

El protocolo de adquisición / análisis de las muestras para los dos métodos de determinación citométrica se basó en el doble marcaje positivo de anticuerpos monoclonales anti CD45 y CD34. Las muestras fueron asimismo teñidas con 7AAD para valorar la viabilidad de las células de interés.

III.1.1- Validación de la técnica citométrica.

El protocolo de adquisición y análisis al que se refiere esta sección es el mismo que el utilizado para el análisis de células CD34+ pero con un paso previo de equilibrio osmótico de la muestra en solución Dextr-Alb mediante la dilución 1:1 vol/vol de la muestra, durante cinco minutos a 4°C.

III.1.1.1- Reproducibilidad de la técnica.

La Reproducibilidad es una medida de precisión y se refiere al grado de concordancia entre dos resultados individuales obtenidos con el mismo método sobre una materia idéntica sometida a un ensayo en condiciones diferentes.

La Reproducibilidad del método de adquisición y análisis se determinó de forma cualitativa descongelando alícuotas de sangre de cordón umbilical (n=10) y de leucoaféresis criopreservadas (n=10), marcando por separado con anticuerpos monoclonales anti CD45+ y CD34+ y 7AAD dos alícuotas de cada una de las muestras utilizadas y comparando los resultados del análisis citométrico para el recuento de CD34 totales, viabilidad por 7AAD y recuento de CD45 totales.

Los resultados obtenidos (n=20) se muestran a continuación:

Tabla 14. Reproducibilidad de la técnica citométrica propuesta.

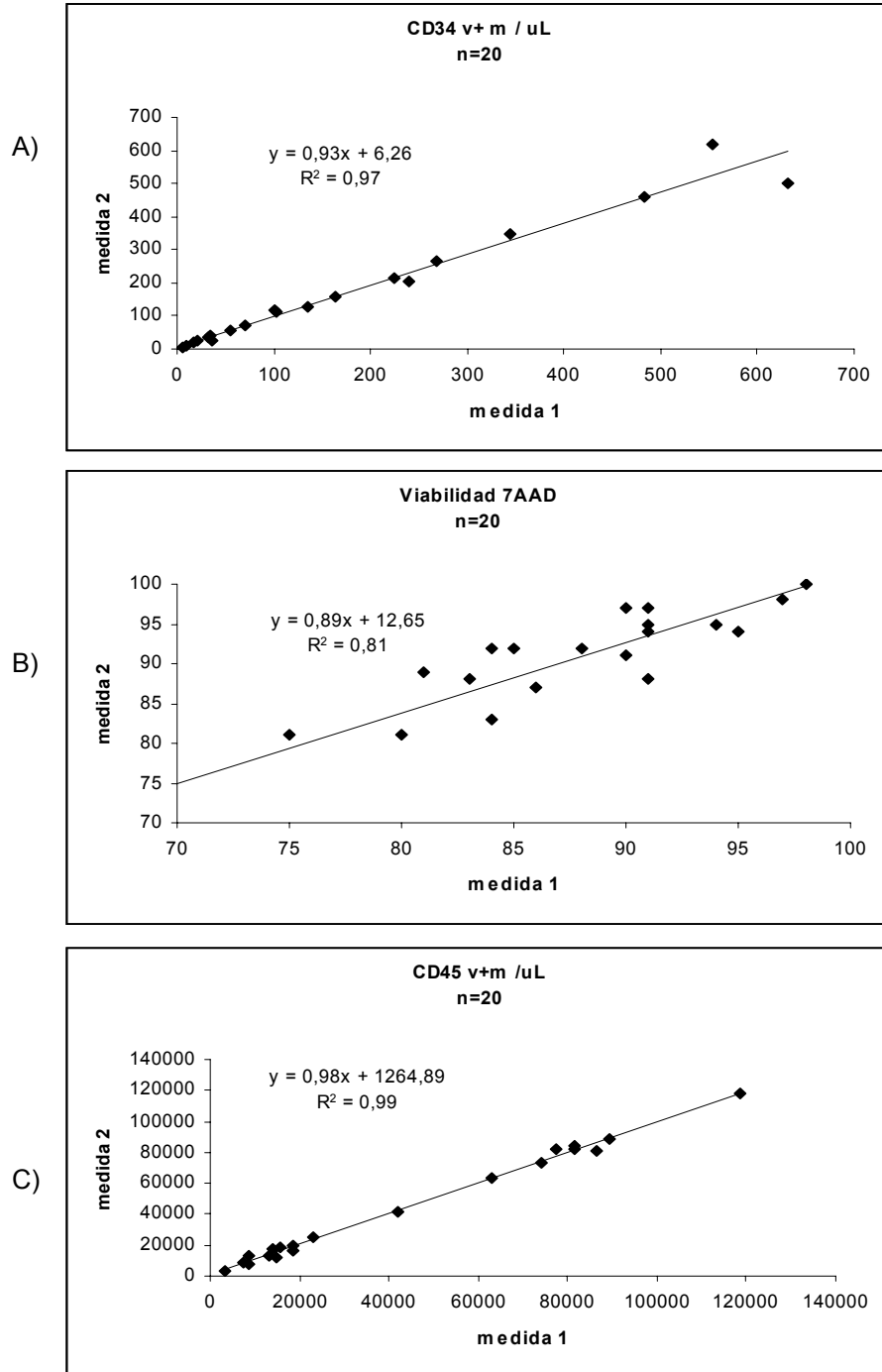
	Medida 1		Medida 2		R*
	min	max	min	max	
CD34 / uL	6	631	5.8	620	0.98
%Viabilidad 7AAD	69	98	70	100	0.90
CD45 / uL	3195	118757	3328	117766	0.99

R*; coeficiente de correlación de Pearson. n=20=10 UCB + 10 Leucoaféresis. Medida1,2 ;recuentos de alícuotas de la misma muestra marcadas por separado

Así, para el recuento de progenitores CD34+ el coeficiente de correlación de Pearson fue del un 0.98 mientras que para la viabilidad de los progenitores y el recuento de células CD45+ fue de un 0.9 y 0.99 respectivamente (Tabla 14).

Gráficamente,

Fig 22. Reproducibilidad del método de citometría de productos hematopoyéticos descongelados para el recuento de células CD34+ (A), Viabilidad 7AAD de las células CD34+ (B) y recuento de células CD45+ (C).



Representados un total de 20 determinaciones, 10 UCB y 10 Leucoaféresis. Medida1,2 ;recuentos de alícuotas de la misma muestra marcadas por separado

III.1.1.2- Coeficiente de variación de la técnica.

La Repetibilidad es el grado de concordancia entre resultados sucesivos obtenidos con el mismo método sobre una materia idéntica sometida al ensayo y en las mismas condiciones.

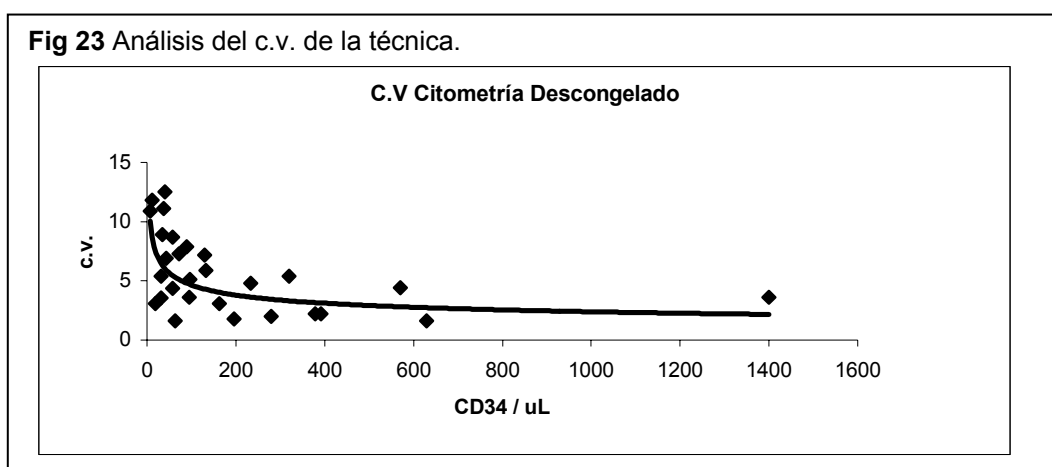
Para cualificar el grado de repetitividad del método citométrico se realizaron tres medidas sucesivas en un intervalo corto de tiempo de una alícuota marcada con anticuerpos anti CD45+, CD34+ y 7AAD de cada una de las muestras analizadas. Se analizaron un total de 28 muestras descongeladas, 15 muestras de sangre de cordón umbilical y 13 leucoaféresis y se determinó el coeficiente de variación (CV) para el recuento de células CD34+, viabilidad de las células progenitoras y recuento de células CD45+. CV fue calculado mediante el cociente entre la desviación estándar de tres recuentos consecutivos de una misma muestra y la media de las mismas medidas (Tabla 15).

Los resultados obtenidos (n=28) se muestran a continuación:

	Medida 1		Medida 2		Medida 3		CV*
	min	max	min	max	min	max	
CD34 / μL	17	1566	21	1336	27	1415	5.8
%Viabilidad 7AAD	35	100	30	100	51	100	5.5
CD45 / μL	31892	118757	31386	117766	31927	113976	3.8

CV*; media del coeficiente de variación (%) para n=28. n=28=15UCB + 13Leucoaféresis. Medida1,2,3 ;recuentos sucesivos de la misma muestra.

Si representamos gráficamente los resultados de CV versus la media del recuento de las tres medidas consecutivas para cada muestra analizada;



Para cada uno de los parámetros analizados, el coeficiente de variación de la técnica varió según el número total de eventos adquiridos. Tal y como es de esperar, se observó que cuanto mayor fue el recuento celular, menor fue el CV de la técnica (Tabla 16).

Tabla 16. C.V. de la técnica citométrica según el número de eventos adquiridos.

CD34 / μL	n	Valor Medio	CV
17-50	7	36	7,2
50-100	7	74	5,7
100-300	8	182	5,5
300-1400	6	900	4,9
CD45/uL	n	Valor Medio	CV
30000-50000	15	37562	4,3
50000-120000	13	85000	2,6

Valor medio; media aritmética de tres recuentos sucesivos en cada rango.

n: número de muestras en cada rango.

III.1.2- Influencia del tiempo de equilibrio en la técnica citométrica.

La elección de un tiempo de equilibrio osmótico de 5 minutos post descongelación se basó en los resultados mejorados de recuperación clonogénica reportados por Rubinstein¹³⁹ al aplicar esta técnica. Sin embargo, debido a que la función de este tiempo de equilibrio disminuir la osmolaridad del medio extracelular de forma controlada, alargar este tiempo de equilibrio podría tener un efecto beneficioso sobre la viabilidad y recuento celular. Para evaluar esta posibilidad se decidió ensayar el método citométrico propuesto para dos tiempos de equilibrio osmótico previos, cinco y diez minutos.

El periodo de equilibrio osmótico post descongelación se realizó por dilución 1:1 vol/vol de la muestra analizada en solución Dextr-Alb preenfriada a 4°C. El protocolo de adquisición / análisis de las muestras de ambos grupos de estudio se basó en el doble marcaje positivo de anticuerpos monoclonales anti CD45 y CD34. Se analizaron un total de 30 muestras post descongelación, 15 de SCU15 de CPH-A.

Los resultados de recuento de células CD34+ totales en SCU para los dos tiempos de equilibrio osmótico previo a la determinación citométrica se muestran en Tabla 1.

El recuento celular para los dos tiempos de estudio (5,10 minutos de equilibrio) no varió significativamente ($p=0.593$. Test de Wilcoxon para muestras relacionadas) y la mediana de recuentos de CPH tras 15 ensayos fue del 4% (Tabla17, dentro del CV de la propia técnica (ver 3.1.1.2). La viabilidad de las células CD34+ fue del $88\% \pm 7$ y $89\% \pm 9$ para los tiempos de equilibrio de cinco y diez minutos respectivamente ($p=0.84$. Test de Wilcoxon para muestras relacionadas).

La determinación citométrica directa del descongelado, sin tiempo previo de equilibrio, rindió un 30% menos en el recuento de progenitores cuando comparamos los resultados con un paso de equilibrio osmótico de cinco ($p=0.001$. Test de Wilcoxon para muestras relacionadas) y diez minutos ($p=0.003$. Test de Wilcoxon para muestras relacionadas).

Tabla 17. Efecto del tiempo de equilibrio en solución Dextr-Alb sobre el recuento de células CD34+ en muestras de SCU postdescongelación

Dilución 1:1 en solución Dextr-Alb.					
ID	EQUILIBRIO 5 min.		EQUILIBRIO 10 min.		Dif.
	CD34 /uL	CD34 total	CD34 /uL	CD34 total	
UCB1	43	1,08E+06	39	9,75E+05	110%
UCB2	84	2,10E+06	75	1,88E+06	112%
UCB3	26	6,50E+05	27	6,75E+05	96%
UCB4	100	2,50E+06	119	2,98E+06	84%
UCB5	37	9,25E+05	28	7,00E+05	132%
UCB6	32	8,00E+05	35	8,75E+05	91%
UCB7	55	1,38E+06	57	1,43E+06	96%
UCB8	75	1,88E+06	82	2,05E+06	91%
UCB9	30	7,50E+05	33	8,38E+05	90%
UCB10	70	1,75E+06	73	1,83E+06	96%
UCB11	35	8,75E+05	39	9,75E+05	90%
UCB12	10	2,50E+05	10	2,50E+05	100%
UCB13	37	9,25E+05	28	7,00E+05	132%
UCB14	36	9,00E+05	40	1,00E+06	90%
UCB15	21	5,25E+05	23	5,75E+05	91%
media	46	1,15E+06	47	1,18E+06	100%
mediana	37	9,25E+05	39	9,75E+05	96%
max	100	2,50E+06	119	2,98E+06	132%
min	10	2,50E+05	10	2,50E+05	84%

Dif; (CD34 total 5 min/ CD34 total 10 min) x 100.

El recuento celular de las muestras de CPH-A según el tiempo de equilibrio osmótico previo a su análisis citométrico fue similar al observado en muestras de SCU y se muestra en Tabla 18.

El recuento celular para los dos tiempos de estudio (5,10 minutos de equilibrio) no varió significativamente ($p=0.280$. Test de Wilcoxon para muestras relacionadas) y la mediana de recuentos de CPH fue prácticamente el mismo, tan solo un 1% entre protocolos (Tabla 18). La viabilidad de los progenitores CD34+ fue del $90\% \pm 6$ y $91\% \pm 6$ para los tiempos de equilibrio de cinco y diez minutos respectivamente y la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.10$. Test de Wilcoxon para muestras relacionadas).

La determinación citométrica directa de las CPH-A descongeladas, sin tiempo previo de equilibrio, rindió un 20% menos en el recuento de CPH cuando comparamos los resultados con un paso de equilibrio osmótico de cinco ($p=0.003$. Test de Wilcoxon para muestras relacionadas) y diez minutos ($p=0.01$. Test de Wilcoxon para muestras relacionadas).

Tabla 18. Efecto del tiempo de equilibrio en solución Dextr-Alb sobre el recuento de células CD34+ en muestras de CPH-A postdescongelación

Dilución 1:1 en solución Dextr-Alb.					
ID	EQUILIBRIO 5 min.		EQUILIBRIO 10 min.		Dif.
	CD34 /uL	CD34 total	CD34 /uL	CD34 total	
APH1	102	2,86E+07	110	3,08E+07	93%
APH2	135	3,78E+07	126	3,53E+07	107%
APH3	225	3,15E+07	213	2,98E+07	106%
APH4	483	1,16E+08	462	1,11E+08	105%
APH5	2403	4,81E+08	2032	4,06E+08	118%
APH6	631	8,83E+07	501	7,01E+07	126%
APH7	344	6,88E+07	350	7,00E+07	98%
APH8	553	1,11E+08	620	1,24E+08	89%
APH9	269	5,38E+07	266	5,32E+07	101%
APH10	163	3,26E+07	160	3,20E+07	102%
APH11	424	8,48E+07	480	9,60E+07	88%
APH12	504	1,01E+08	479	9,58E+07	105%
APH13	257	5,14E+07	259	5,18E+07	99%
APH14	272	5,44E+07	278	5,56E+07	98%
APH15	1336	2,67E+08	1318	2,64E+08	101%
media	540	1,07E+08	510	1,02E+08	102%
mediana	344	6,88E+07	350	7,00E+07	101%
max	2403	4,81E+08	2032	4,06E+08	126%
min	102	2,86E+07	110	2,98E+07	88%

Dif; (CD34 total 5 min/ CD34 total 10 min) x 100.

Así, alargar el tiempo de equilibrio osmótico de productos hematopoyéticos descongelados en solución Dextr-Alb a diez minutos no proporciona más estabilidad osmótica frente al cambio brusco de osmolaridad que representa la etapa de lisis utilizada dentro de los protocolos de CMF.

III.1.3- Recuperación celular mediante la técnica citométrica propuesta.

Comparamos la recuperación de células CD34+ respecto a productos en fresco comparando el protocolo citométrico con un paso de equilibrio osmótico en solución Dextr-Alb de cinco minutos y el mismo protocolo pero sin paso previo de equilibrio osmótico.

El protocolo de adquisición / análisis de las muestras para los dos métodos de determinación citométrica consistió en el doble marcaje positivo de anticuerpos monoclonales anti CD45 y CD34. Las muestras fueron al mismo tiempo teñidas con 7AAD para valorar la viabilidad de las células de interés.

Se analizaron un total de 35 muestras de productos hematopoyéticos descongelados, 18 muestras de SCU (Tabla 19) y 17 muestras de CPH-A (Tabla 20). Los valores de recuento de células progenitoras antes de la congelación (producto en fresco) y después de la descongelación con el método de análisis directo (sin tiempo de equilibrio previo) y con el que incluye un paso de equilibrio osmótico se muestran a continuación;

	PRECONGELACIÓN		POSTDESCONGELACIÓN		
	CD34 total x10 ⁶	Directo		Equilibrio 5 min.	
		CD34 total x10 ⁶	% Rec.	CD34 total x10 ⁶	% Rec.
Media	1,24	0.82	65	1,04	85
Mediana	1,00	0.61	64	0.81	87
Máximo	3,00	2,35	84	2,40	98
Mínimo	0.5	0.28	48	0.41	69

Directo: análisis citométrico del descongelado sin equilibrio osmótico previo.

La técnica de CMF aplicada directamente al descongelado rindió una recuperación de progenitores hematopoyéticos CD34+ de SCU un 20% menor (ver Tabla 19) que cuando utilizamos un paso de equilibrio osmótico previo al análisis citométrico. La viabilidad de estas células sufrió un descenso similar al obtenido en el recuento. Así, la viabilidad media de las células CD34+ fue de 50% ± 16% y 75% ± 8% en los grupos sin y con paso de equilibrio osmótico respectivamente.

Tabla 20. Recuperación celular en CPH-A n=17

	PRECONGELACIÓN	POSTDESCONGELACIÓN			
	CD34 total x10 ⁸	Directo		Equilibrio 5 min.	
		CD34 total x10 ⁸	% Rec.	CD34 total x10 ⁸	% Rec.
Media	3,52	2,18	58	3,02	83
Mediana	1,00	0.50	58	0.7	88
Máximo	18.7	12.9	79	17.4	108
Mínimo	0.29	0.18	45	0.31	50

Directo: análisis citométrico del descongelado sin equilibrio osmótico previo.

Los productos de CPH-A se comportaron de forma similar a los de SCU frente a la determinación por CMF (Tabla 19 vs Tabla 20). Observamos una pérdida del 20% de las células CD34+ totales cuando el análisis del descongelado se realizó sin un paso de equilibrio osmótico previo. La viabilidad de las células progenitoras descongeladas varió del 79% ± 16% cuando analizamos las muestras sin equilibrio osmótico previo al 90% ± 5% cuando sí se equilibraron las muestras en solución Dextr-Alb (Tabla 20).

Estos resultados no implican una pérdida celular ni de capacidad terapéutica del producto descongelado sino de la alícuota utilizada para la determinación citométrica, evidenciando que el paso de equilibrio osmótico permite un análisis mejorado de los productos hematopoyéticos descongelados.

III.2- Aplicación a las técnicas de preparación de productos hematopoyéticos descongelados para uso clínico.

Una vez evidenciado el efecto del choque osmótico sobre productos hematopoyéticos descongelados se evaluaron preclínicamente dos sistemas automáticos para el procesado de CPH-A y de SCU post descongelación. Estos sistemas permiten obtener un producto hematopoyético osmóticamente estable, la osmolaridad del producto obtenido es similar a la del plasma, sin pérdidas celulares significativas y de una forma segura y reproducible. Los protocolos de lavado utilizados en esta evaluación preclínica incluyeron un paso de equilibrio osmótico del descongelado en solución Dextr-Alb y transcurrieron en todo momento en un sistema cerrado y con soluciones validadas para uso clínico.

Asimismo, en este apartado se muestran las implicaciones biológicas de la presencia del crioprotector a lo largo del tiempo en el injerto hematopoyético descongelado y la exclusión de mecanismos de apoptosis durante el proceso de equilibrio y lavado.

Los resultados de este trabajo se presentan en forma de manuscritos originales de investigación aceptados para su publicación.

III.2.1- Estabilización osmótica de SCU descongelada mediante la automatización del lavado de DMSO post descongelación.

Manuscrito nº 2.

Luciano Rodríguez, Carmen Azqueta, Stefano Azzalin, Joan García, Sergi Querol.

“Washing of cord blood grafts after thawing: high cell recovery using an automated and closed system”. Vox Sanguinis (2004) .87. 165-172.

ORIGINAL PAPER

Vox Sanguinis (2004) 87, 165–172
 © 2004 Blackwell Publishing

Washing of cord blood grafts after thawing: high cell recovery using an automated and closed system*

L. Rodríguez,¹ C. Azqueta,¹ S. Azzalin,² J. García¹ & S. Querol¹

¹Barcelona Cord Blood Bank, Transfusion Center and Tissue Bank, Hospital Duran i Reynals, Barcelona, Spain

²Biosafe SA, Birsins, Switzerland

Vox Sanguinis

Background and Objectives Cord blood (CB) progenitor cells are an alternative source of haematopoietic stem cells for bone marrow reconstitution. The critical importance of cell dose in the clinical outcome has motivated the need to develop techniques aimed at reducing cell losses and increasing reproducibility. This aim of this study was to evaluate an automated CB washing protocol of thawed cord blood units using the Sepax device.

Materials and Methods After an initial 1 : 1 dilution using a dextran/albumin-containing buffer, the cells were washed in order to obtain a final product ready for transplantation. The automatic method was compared with the conventional manual washing procedure. Blood samples were taken after thawing and after washing. The processing time, viability and mean recovery of nucleated cells (TNC) and progenitors were determined.

Results The automatic procedure resulted in a median recovery of 93% CD34⁺ cells and 89% TNC; no significant differences were observed between methods. In addition, median viability, as assessed by annexin V and 7-aminoactinomycin D (7-AAD), was 98% and 94%, respectively, within CD34⁺ cells.

Conclusions The automatic washing method described is as effective as the manual method in terms of viability and progenitor cells recovery, but faster and easier for the operators to perform. Overall, our data suggest that the automatic method is safe and suitable for the routine washing of thawed CB grafts in the clinic.

Key words: banking, cell washing, cord blood, thawing, transplantation.

Received: 3 March 2004,
 revised 25 June 2004,
 accepted 1 July 2004

Introduction

It is now accepted that cord blood (CB) progenitor cell transplant is an effective source of haematopoietic stem cells for bone marrow reconstitution when using suitable units. In this respect, the critical importance of the cell dose in transplant

outcome has motivated cord blood banks (CBB) to define progressively higher cut-offs for unit acceptance as well as to develop new techniques aimed at reducing cell losses. In this regard, CBB efforts have been aimed at improving processing protocols for volume reduction of stored units, both to minimize cell losses and to make the unrelated cord blood banking more feasible. Moreover, CBB should participate in the improvement and/or development of new technology in order to minimize risks during the manipulation of CB grafts.

In our CBB, similarly to others, we have introduced an automated CB processing system for volume reduction using the cell separator device [1], Sepax® S-100, showing acceptable recovery efficiencies for total nucleated cells (TNC), mononuclear cells (MNCs) and CD34⁺ cells, short processing

Correspondence: Sergi Querol, Barcelona Cord Blood Bank, Transfusion Center and Tissue Bank, Hospital Duran i Reynals, Autovia de Castelldefels, Km 2,7 08907 Barcelona, Spain.

E-mail: squerol@irots

*This work forms part of the Medicine Department PhD program of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB, Bellaterra, Spain)

times and clinical safety, without microbial contamination, in a closed kit and using a traceable protocol.

Cryopreserved CB units are thawed, and cryoprotectant is usually removed before clinical use. To achieve this, several techniques have been proposed, aiming at maintaining cell viability and functionality. At present, the more widespread technique used is that introduced by Rubinstein *et al.* [2], based on a manual two-step washing method which reduces dimethylsulphoxide (DMSO) content and minimizes osmotic shock to the cells.

Although this technique is widely used in CB transplantation, its manual approach results in unpredictable cell losses, and cell clumping is not infrequent [3,4]. Some authors have also proposed direct infusion without washing as an alternative, but clinical outcomes are limited and published biological data suggest advantages of washed cells in terms of clonogenic activity and viability [2]. Also, direct infusion of the thawed cells at the bedside could produce complications related to DMSO toxicity as well as lysed cells and micro-aggregate exposure after infusion [3,5,6]. To minimize these risks and to facilitate interlaboratory reproducibility of the washing results, we propose an automated washing procedure using the Sepax® S-100 device, which shows a good recovery of nucleated and progenitor cells.

The washing process is performed automatically and uses an initial 1 : 1 dilution with a hyperosmolar buffer containing dextran and albumin, and may be one step towards full CB banking automation. Furthermore, dissemination of this good manufacturing practice (GMP)-based technique could improve reproduction of results among different laboratories, favouring standardization of the washing procedure in transplant centres.

Materials and methods

Study design

Twenty, volume-reduced umbilical cord blood units, cryopreserved for transplantation in the Bioarchive system, were thawed and immediately processed either by the automated system, Sepax® S-100 (using a new software for CB washing), or manually washed; both methods are based on the New York Blood centre dilution and washing principle [2]. Samples were taken just after thawing and after washing, for cell analysis, sterility tests, clonogenic cultures and cell count. The processing time, the mean recovery of total nucleated cells (TNC), specific subsets and progenitors, as well as their viability and induction of apoptosis, were determined in order to assess the yield and efficiency of the automatic method for clinical application.

CB collection

Placental umbilical CB was collected at several maternity wards within the Barcelona Cord Blood Bank programme.

After obtaining informed consent, and before placenta delivery, the CB was drained by gravity from the umbilical vein and collected in a blood collection bag (MacoPharma, Tourcoin, France) containing 29 ml of citrate-phosphate-dextrose (CPD). The collected blood was stored at 4 °C and processed in the CBB within 40 h of collection.

Processing and cryopreservation

CB units were processed for volume reduction following a modified approach of the automated procedure described previously [1], consisting of a double buffy-coat collection after addition of hydroxyethylstarch (HES; Grifols, Barcelona, Spain) using the Sepax® S-100 device (umbilical cord blood (UCB)-HES protocol). The final volume of the processed CB units was 25 ml after the addition of DMSO (10% final concentration), in a Pall freezing container compatible with the ThermoGenesis BioArchive system. Using this method, the mean recovery \pm standard deviation (SD) of TNC was $82 \pm 11\%$, with 80% red blood cell (RBC) depletion. The process takes a mean of 29 ± 3 min to perform.

Cryopreservation was performed using a programmed freezing rate in the Bioarchive device (BioArchive, ThermoGenesis, CA) at a starting temperature of 10 °C, with a cooling rate of 10 °C/min until a temperature of -3 °C is reached, maximum rate up to -13 °C and then cooled at -2 °C/min until -50 °C (mean cooling rate of -3 °C/min) is reached, and then stored in the liquid nitrogen phase of the same device.

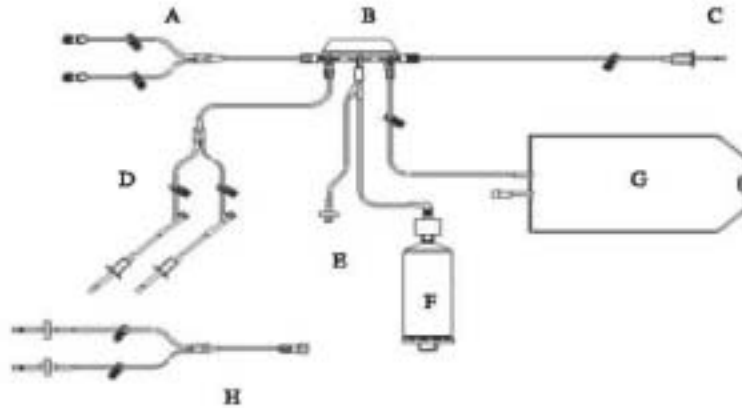
Thawing and washing procedures

Manual washing

The CB bags were thawed in a 37 °C waterbath and weighed. A thawing kit adapted for the Pall freezing container and compatible with the ThermoGenesis BioArchive system was used (Stem Cell Transplant System; Pall Medsep, Portsmouth, UK). Samples were taken for laboratory analysis, and blood was slowly diluted 1 : 1 in a prechilled buffer, similar to that described by Rubinstein *et al.* (Dextran-40 at 7.5%, human albumin at 5% in saline) [2]. After 5 min of agitation to reach equilibrium, the blood was diluted, adding sequentially 60 ml of the same buffer twice. The final dilution of the thawed blood was approximately 1 : 6. Once diluted, the blood was centrifuged at 450 *g* in a bench-top centrifuge for 30 min at 10 °C. Then the cells were isolated, extracting supernatant by using the Fenwall plasma extractor. The complete process takes a median of 70 min.

Automatic washing

The CB bags stored in liquid nitrogen were thawed by immersion in a preheated 37 °C waterbath. Once thawed, the CB bags were weighed, samples were taken for laboratory analysis and the bag was then connected to the prototype kit



A: Double input line with female luer lock connectors and clamps. **B:** Stopcock manifold. **C:** Washing solution input with spike and clamp. **D:** Double exit line with spike, injection site and clamps. **E:** Line pressure monitor laer with microbial filter. **F:** 220 ml separation chamber. **G:** 1000 ml waste product bag with clamp on tubing. **H:** 1 connection with double spike, male luer lock and clamps.

Fig. 1 Washing kit of the Sepax system.

designed for UCB cell washing (Biosafe, Eysins, Switzerland) and processed using the Sepax® S-100 (Biosafe). Briefly, the CB bag was connected to the washing kit (Fig. 1) in a sterile flow hood by using two spikes introduced in each of the two ports of the ThermoGenesis cryopreservation bag. Another port of the washing kit was connected to a prechilled buffer (7.5% saline containing Dextran-40 and 5% human albumin). The kit has two additional bags: one for the final product and a second for the waste product. The protocol allows the operator to choose the initial dilution rate (1 : 0.5 to 1 : 2). In this study, a dilution rate of 1 : 1 was chosen. After priming and transfer of buffer to the chamber, the sample was connected to the system and the desired initial dilution was performed. The product remained in equilibrium for 5 min while agitated. The washing was then started by adding, to the diluted cells, sufficient dextran/albumin solution (= 170 ml) to fill the chamber. The final blood dilution was = 1 : 9. Then, a centrifugation step is performed to remove the supernatant. The procedure can be repeated once more for an extensive washing but in this assay only one washing cycle was performed. For cell collection, the system dilutes the residual pellets (= 10 ml) and extracts the content to the final bag, then automatically raises the chamber twice for an optimal recovery. The minimum final volume used was 50 ml.

Laboratory analysis

Automatic cell count

Counting of TNC, RBC and platelets were performed for each sample by using an automatic cell counter that detects and

measures changes in electrical resistance (impedance) when a particle in a conductive liquid passes through the device (Coulter Corp., Miami, FL).

Flow cytometry

The samples taken just before and after washing were incubated for 30 min at 4 °C in the dark with anti-human phycoerythrin (PE)-labelled monoclonal antibodies (mAbs) against CD34, CD3, CD14, CD15, CD19 combined with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled CD45 at a saturating concentration (Pharmingen Pharmaceutical, Franklin Lakes, NJ). After incubation, the samples were lysed in ammonium chloride for 10 min, and 30 µl of commercially available fluorescent microbeads were added and gently mixed as an internal standard before acquisition, according to the manufacturer's instructions (Perfect-Count; Cytognos, Salamanca, Spain) [8] to evaluate their absolute count using cytometric single-platform analysis [9]. The cell subsets were then analysed by their fluorescence profile, and forward and side-scatter (FSC/SSC) characteristics, on a Becton-Dickinson FACScalibur flow cytometer with the BD software, *cellquest* (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ). The samples were also incubated with 7-aminoactinomycin D (7-AAD), for 5 min, for assay of cell viability/permeability and with Syto 16/Glycophorin A to quantify the erythroblasts after the cell washing procedure [10]. Mean ± SD and median (range) recoveries were calculated for all the analysed cell subsets by using the formula:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{[(\text{absolute cell count postwash}) + (\text{absolute cell count post thaw})] \times 100}{\text{absolute cell count post thaw}}$$

For the viability calculations, the patterns of CD45 fluorescence and FSC/SSC were used for all subsets analysed, except CD34 cells where CD45/CD34 fluorescence characteristics were used.

For all the recovery data presented here, a density of 1 g/ml was used when volume values were necessary for calculations.

Apoptosis assay

In order to evaluate the influence of the automated process on the induction of apoptosis on the cells of interest, samples obtained just before and after the washing process were incubated separately with FITC-annexin V (Bender MedSystems, Vienna, Austria) combined with CD34 and CD45 antibodies. The cells (5×10^5) were incubated for 15 min with FITC-labelled annexin V, as described in the manufacturer's instructions. Then they were washed in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% bovine serum albumin (BSA), and the cell subsets were analysed by their fluorescence and FSC/SSC characteristics using the CELLQUEST software (Becton Dickinson) on a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). As an internal control, a subset of 'living' lymphocytes was taken as a threshold for viability. For the calculation of apoptotic cells, the patterns of CD45 fluorescence and FSC/SSC were used for all subsets analysed, except CD34 cells where CD45/CD34 fluorescence characteristics were used.

Clonogenic assay

Progenitor cell assays were performed in duplicate, just before and after washing with the methylcellulose-based H4434 medium (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Briefly, 5×10^4 cells were seeded directly onto methylcellulose, mixed gently and then plated onto Petri dishes and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Granulocyte-macrophage colony-forming units (CFU-GM), BFU-E (Burst-Forming Units-Erythroid) and CFU-mix colonies were identified and counted using standard criteria after 2 weeks in culture [11]. For CFU counting, only colonies with more than 50 cells were enumerated. The CFU total, defined as the total count of colonies, regardless of their lineage, was used for analysing the recovery of colonies.

Sterility tests

Sterility assessment was performed just before and after the washing process by placing 1 ml of the samples in blood culture Bact/alert FN and FA flasks (Biomérieux, Inc., Durham, NC) for aerobic and anaerobic conditions of culture in order to determine fungal and/or microbial contamination. Blood culture flasks were incubated at 37 °C for 2 weeks and monitored daily.

Osmolarity quantification

Sample osmolarity was measured by depression of freezing point, before and after washing, in a Roebing 1313 auto-

matic osmometer (Hermann Roebing Messtechnik, Berlin, Germany). The samples were centrifuged for 5 min at 450 g, in order to obtain cell-free solutions and diluted 1 : 10 in distilled water before osmometric determinations were carried out.

DMSO quantification

The DMSO content of the samples was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC), following a previously reported method [12]. Hence, we first stated that the calibration plot of DMSO peak area vs. DMSO concentration was linear and that samples had only one peak of DMSO. Samples were then centrifuged for 5 min at 450 g, in order to obtain cell-free solutions and diluted, as required, to obtain the DMSO content falling within the linear range of the calibration plot. Samples taken just after thawing were diluted 1 : 1000 in 10% v/v methanol, while samples taken just after washing were diluted 1 : 10. The HPLC apparatus consisted of a Beckman System Gold HPLC (Beckman, San Ramon, CA) with a multiple solvent-delivery system coupled to a Beckman-168 variable wavelength detector (Beckman). The column used was an Ultrasphere ODS2 C18 (5 µm) measuring 4.6 × 25 cm. The mobile phase contained 10% v/v methanol in high-purity deionized water, 20 µl of each sample was injected, the flow rate was 1.0 ml/min and the detector was set at 214 nm. Under these conditions, the DMSO peak eluted after 3 min.

Statistical analysis

The non-parametric Mann-Whitney *U*-test for independent samples was used to compare manual and automatic washing results. Mean, SD, and medians and ranges were used for descriptive analysis.

Results

As shown in the results of Table 1, no significant differences were observed in terms of cell recovery when manual and automated washing methods were compared. In our experience, the manual method takes a median of 70 min (range: 65–90 min) to perform, and only RBC recovery is significantly different. The automated washing using the Sepax® S-100 protocol takes a median of 28.1 min (range: 26–30 min) to perform and has resulted, as for the manual washing procedure, in an absence of microbiological contamination during the process after the 10 washing procedures. The median volume of the units before processing was 24.2 ml (range: 20–26 ml) and the median final volume was 59.7 ml (range: 52–117 ml). Comparable values were obtained with the manually washed units (data not shown).

Tables 2 and 3 show, respectively, the cell content and the relevant recovery data of UCB units before and after the

Table 1 Results from automatic and manual washing processes: percentage recoveries are compared

	Biosafe automatic washing (n = 10)			Rubinstein manual washing (n = 10)			P-value
	Mean ± SD	Median	Range	Mean ± SD	Median	Range	
TNC × 10 ⁷	89 ± 4	89	83–95	94 ± 5	94	84–101	NS
CD34 × 10 ⁶	94 ± 4	93	87–104	92 ± 3	92	88–97	NS
CFU total	96 ± 12	97	84–110	95 ± 7	94	85–100	NS
RBC × 10 ¹⁰	50 ± 11	47	32–70	29 ± 4	30	34–44	0.01
PLT × 10 ¹⁰	44 ± 14	42	23–69	45 ± 7	44	35–54	NS

CFU, colony-forming units; NS, not significant; PLT, platelets; RBC, red blood cells; TNC, total nucleated cells.

Table 2 Umbilical cord blood (UCB) units content before and after the automatic washing process

	Post-thaw			Postwash		
	Mean ± SD	Median	Range	Mean ± SD	Median	Range
TNC × 10 ⁸	1.28 ± 0.26	1.2	0.97–1.72	1.14 ± 0.22	1.05	0.90–1.52
CD34 × 10 ⁶	1.73 ± 0.76	1.5	0.73–2.7	1.61 ± 0.69	1.5	0.65–2.5
CD3 × 10 ⁶	1.82 ± 0.52	1.8	1.2–2.5	1.63 ± 0.47	1.5	1.1–2.5
CD14 × 10 ⁷	7.76 ± 2.2	7.1	4.6–12	6.57 ± 1.84	6.1	4.5–10
CD15 × 10 ⁶	3.22 ± 1.6	3.4	1.2–6.7	3.29 ± 1.71	2.8	0.97–6.2
CD19 × 10 ⁷ n = 6	6.45 ± 2.4	6.1	3.6–7.7	5.07 ± 1.4	4.9	3.2–6.8
Gly A × 10 ⁷ n = 6	1.8 ± 1.6	1.4	0.36–7.7	0.81 ± 0.9	0.57	0.23–2.3

The mean, standard deviation (SD) and median values are shown of cell subsets post-thaw and postwash, n = 10.

TNC, total nucleated cells.

Table 3 Relevant data after automatic washing from 10 thawed and washed cord blood units

CODE	Post-thaw			Postwash			Recovery		
	TNC × 10 ⁸	CD34 × 10 ⁶	CFU total × 10 ⁶	TNC × 10 ⁸	CD34 × 10 ⁶	CFU total × 10 ⁶	% TNC	% CD34	% CFU total
01055	1.26	2.25	1.73	1.05	2.26	1.05	83	100	107
00159	0.97	1.65	0.47	0.89	1.72	0.47	92	104	100
00497	1.72	2.76	1.18	1.52	2.49	0.99	88	90	84
00514	0.99	0.74	0.33	0.90	0.65	0.30	91	88	84
00714	1.28	1.46	1.01	1.17	1.30	0.86	91	89	85
00837	1.69	1.16	0.38	1.43	1.11	0.26	85	96	96
01908	1.14	0.80	0.98	1.01	0.77	0.96	89	96	98
01912	1.14	1.20	1.44	1.02	1.21	1.70	89	93	118
01921	1.40	2.53	3.20	1.34	2.34	2.73	95	93	85
01853	1.18	2.62	1.41	1.06	2.28	1.47	89	87	104
Mean ± SD	1.28 ± 0.26	1.73 ± 0.76	1.35 ± 0.84	1.14 ± 0.22	1.61 ± 0.69	1.13 ± 0.81	89 ± 4	94 ± 4	96 ± 12
Median	1.22	1.55	1.01	1.05	1.51	0.96	89	93	97
Range	0.97–1.72	0.80–2.76	0.38–3.20	0.90–1.52	0.77–2.49	0.30–2.73	83–95	87–104	84–118

CFU, colony-forming units; SD, standard deviation; TNC, total nucleated cells.

	Post-thaw			Postwash		
	Mean \pm SD	Median	Range	Mean \pm SD	Median	Range
CD45	76 \pm 6	76	68-80	79 \pm 10	77	66-94
CD34	97 \pm 4	98	89-100	99 \pm 1	99	97-100
Monocytes	94 \pm 3	95	88-98	96 \pm 2	97	89-98
Lymphocytes	98 \pm 2	99	93-99	99 \pm 0.5	99	98-100
Neutrophils	65 \pm 16	62	49-89	71 \pm 17	72	47-92

Table 4 Apoptosis assays results after 10 automatic washing processes

The annexin V-negative population is expressed as a percentage of each population. SD, standard deviation.

automatic washing process. Note that after washing more than 50% of the thawed RBC and platelets were eliminated. After 10 UCB automated washing procedures, the median recovery of TNCs, CD34⁺ cells and MNCs was 89% (range: 83-95), 93% (range: 87-104) and 94% (range: 87-104), respectively. Similarly, the median recovery of CD45⁺ cells was 99% (range: 68-129). Considering specific subsets, such as CD3, CD14 and CD19, a lower recovery was obtained: 91.7% (range: 81-100), 94.9% (range: 75-97) and 85.4% (range: 60-90), respectively (Table 2). Non-specific measured cell losses were, on average, $2 \pm 0.5\%$. For fresh units (pre-freeze), the median recovery of TNC was 86% (range: 74-88) for the automatic washing procedure and 89% (range: 84-104) for the manual washing procedure.

Regarding the apoptosis assessment obtained by annexin V analysis, the thawing and washing processes do not seem to trigger programmed death of the cell populations of clinical interest (Table 4). Only the neutrophilic population, defined by bright CD45 fluorescence and a high FSC/SSC characteristic, is clearly affected after thawing and washing, as shown by the low annexin V values obtained.

The cell viability, as measured by 7-AAD staining, was found to be conserved after thawing and washing by both methods of washing considered here. When using the automated washing method, median values of 94.5% viability (range: 72-98) for the CD34 cell subset, 90.6% (range: 84-96) for the CD3⁺ lymphocytes and 90% (range: 76-95) for the CD14⁺ monocyte subset were obtained. Similarly, the neutrophil subset showed a reduced 7-AAD viability of 5.3% (range: 2.3-10), indicating severe damage of this population. This is responsible for the low viability value, of 38% (range: 30-53), observed when the overall CD45 population is considered in viability calculations. Similar results were obtained when manual washing was considered.

The good viability observed in the CD34⁺ population was in agreement with the results obtained on CFU recovery after automatic washing. A median recovery of 97% (range: 84-118%) of total CFUs was achieved. Total CFUs of 1×10^9 after thawing and of 0.96×10^9 after washing were calculated.

Finally, the median osmolarity of the grafts was 3020 mOsm/l (range: 2780-3760) (observed when the overall CD45 population is considered for viability calculations) after thawing. After washing, the same CB units had a median osmolarity of 310 mOsm/l (range: 180-620), which represents a median reduction of 88% (range: 80-95) in osmolarity values after washing. Consistently, the median DMSO content, as calculated by HPLC, was 118 g/l (range: 110-105) after thawing and 4 g/l (range: 3-10) after washing. This finding clearly suggests an important depletion of DMSO in the final product.

Discussion

Clinical use of CB units follows an international approach, where units from CBB around the world are shipped to wherever they are required. In this context, the automation of CB processing could help to standardize the wide range of laboratory techniques used by different CBB and transplant units, and could facilitate safe and reproducible procedures. In this regard, we report here the automation of the last step for preparing UCB grafts for transplantation, basically according to the Rubinstein principle for thawing and washing [2].

After an initial retrospective study, comparing the manual and the automated washing methods, we observed no significant differences in cell recoveries among methods. Our results clearly indicate that both techniques are also equivalent in terms of total CFU recovery, and that the processing time is reduced by a factor of 2 when using the automated washing process. With Sepax we obtained acceptable recoveries for all the cell subsets of clinical interest. Our data, of CD45⁺ cells, resulted in a wider range of values than those of TNCs, possibly because of the higher variability when using FSC/SSC parameters in the cytometric gating for analysis. Nevertheless, such results have been obtained in a reproducible manner, without either bacterial or fungal contamination, or evidence of triggered apoptosis. This suggests that the process is safe for maintaining cell functionality and effective for clinical routine. In agreement with the data published

by Xiao *et al.* [13], we have also obtained better results of viability, and practically an absence of apoptosis in the CD34⁺ cell subset, compared with those obtained in the overall MNC subset. Indeed, our samples were in the range of 7-AAD staining in which no clonogenic losses are expected, as confirmed by our clonogenic culture recovery data.

According to *ex vivo* experiments [2] and UCB transplant outcomes [14], the washing of DMSO from thawed UCB units has been proposed to improve both viability of thawed cells and time of neutrophil engraftment after transplant. Nevertheless, in two recent publications based on retrospective clinical results [15,16] it has been reported that washing out DMSO in thawed UCB units does not result in an accelerated engraftment. Before accepting these results as conclusive, we should take into account the fact that CB transplantation in adult patients is being considered and that the CD34⁺/kg dose infused in both studies was suboptimal regarding the dose thresholds (1.7×10^7 nucleated cells/kg) recommended by Wagner *et al.* [17]. Indeed, in the study reported by McCarthy *et al.* [16], although the CD34⁺/kg dose was similar in both study groups, the dose of nucleated cells/kg was lower, by almost 50%, in the volume-reduced group than in the unmanipulated UCB (1.4×10^7 nucleated cells/kg vs. 3.3×10^7 nucleated cells/kg). Whether or not the infusion of these levels of TNCs affected the transplant outcomes is unknown. In addition, the authors [15,16] also argue that because the number of HSC is the major limitation for using UCB in adult patients, graft manipulations resulting in HSC loss or affecting HSC viability should be avoided, including those for washing. Takahashi *et al.* [15] also discuss the inconvenience of transplant centres using non-validated machines to perform washing. In this respect, because the automated method described here does not lead to significant losses affecting transplant HSC dose per kg of recipient, and because the washing process would be effectively standardized, both considerations mentioned above might be overcome.

As an alternative to cell washing, direct infusion after thawing at the bedside is commonly used in transplantation of mobilized progenitor cells. However, infusion-related complications associated with direct infusion of cryoprotectant and lysed cells have been reported. Transplant-related complications ranged from slight nausea, vomiting and hypotension [5,6,18], to severe renal failure and cardiovascular complications [18,19]. Graft washing after thawing almost eliminates DMSO and cell lysis products and could prevent those undesirable effects mainly in paediatric patients who are more susceptible to such transplant-related toxicities owing to the greater ratio of the DMSO dose infused per kg and because they are currently the main UCB transplant recipients.

Additionally, the washing process after thawing could be considered as a standard technique in CBB if current experimental applications, such as combined transplantation of

two CB units from different donors, becomes a successful therapy in clinical trials, because of the associated additional toxicity when two CB units are transplanted.

Although the viability of cells in the presence of high osmolarity solutions is time dependent and decreases rapidly, the direct infusion at the bedside, just after thawing, results in safe engraftment, possibly because of the rapid dilution of the high osmolarity solution in the bloodstream. In this respect we should consider that transplant centre logistics cannot accurately avoid delays in the time from thawing to transplant, and consequently graft viability could be affected. Routine washing of UCB units after thawing could thus facilitate the infusion settings. In addition, other applications could benefit from the automated washing of CB, such as the preparation of cells for expansion, culture or further manipulations.

In summary, we present here the evaluation of an automated process for CB washing after thawing with a hyperosmolar buffer. By using this method, cell recoveries and progenitor cell viability were consistently high enough to consider such a technique as safe and suitable for clinical use. Moreover, an important reduction in the DMSO content was observed after washing by using two different techniques of analysis, osmolarity calculation and cryoprotectant content determination by HPLC.

References

- Zingsem J, Strasser E, Weisbach V, Zimmermann R, Ringwald J, Goecke T, Beckmann MW, Eckstein R: Cord blood processing with an automated and functionally closed system. *Transfusion* 2003; 43: 806-13
- Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, Taylor PE, Stevens CE: Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10119-22
- Beaujean F, Hartmann O, Kuentz M, Le Forestier C, Divue M, Duedari N: A simple, efficient washing procedure for cryopreserved human hematopoietic stem cells prior to reinfusion. *Bone Marrow Transplant* 1991; 8: 291-94
- Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, Boyse EA: Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3828-32
- Alessandrino P, Bernasconi P, Caldera D, Colombo A, Bonfichi M, Malcovati L, Klerry C, Martinelli G, Mafoocchi M, Pagnucco G, Varenini M, Perotti C, Bernasconi C: Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 533-7
- Davis JD, Rowley SD, Braine HG, Plantados S, Santos GW: Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. *Blood* 1990; 75: 781-86

- 7 Strunceck DE, Fautsch SK, Lasky LC, Hurd DD, Ramsay NK, McCullough J: Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow. *Transfusion* 1991; 31: 521-6
- 8 Menendez P, Redondo O, Rodríguez A, Lopez-Berges MC, Ercilla G, Lopez A, Duran A, Almeida J, Perez-Simon JA, San Miguel JF, Gratama JW, Oefao A: Comparison between a lyse-and-then-wash method and a lyse-non-wash technique for the enumeration of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Cytometry* 1998; 34: 264-71
- 9 Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR: Single platform flow cytometric absolute CD34⁺ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *Cytometry* 1998; 34: 61-70
- 10 Fornas O, Domingo JC, Marin P, Petriz J: Flow cytometric-based isolation of nucleated erythroid cells during maturation: an approach to cell surface antigen studies. *Cytometry* 2002; 50: 305-12
- 11 Capmany G, Querol S, Cancelas JA, Garcia J: Short-term, serum-free, static culture of cord blood-derived CD34⁺ cells effects of FLT3-L and MIP-1alpha on *in vitro* expansion of hematopoietic progenitor cells. *Haematologica* 1999; 84: 675-82
- 12 Carpenter JF, Dawson PE: Quantitation of dimethyl sulfoxide in solutions and tissues by high-performance liquid chromatography. *Cryobiology* 1991; 28: 310-5
- 13 Xiao M, Dooley DC: Assessment of cell viability and apoptosis in human umbilical cord blood following storage. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; 12: 115-22
- 14 Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, Ciocci G, Carrier C, Stevens CE, Rubinstein P: Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 1996; 335: 157-66
- 15 Nagamura-Inoue T, Shiroya M, Sugo M, Cui Y, Takahashi A, Tomita S, Zheng Y, Takada K, Kodo H, Asano S, Takahashi TA: Wash-out of DMSO does not improve the speed of engraftment of cord blood transplantation: follow-up of 46 adult patients with units shipped from a single cord blood bank. *Transfusion* 2003; 43: 1385-95
- 16 Hahn T, Bumworasate U, George MC, Bir AS, Chitratanalab W, Alam AR, Bambach B, Baer MR, Slack JL, Wetzler M, Becker JL, McCarthy PL Jr: Use of nonvolume-reduced (unmanipulated after thawing) umbilical cord blood stem cells for allogeneic transplantation results in safe engraftment. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 145-50
- 17 Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, Goldman A, Kersey J, Krivit W, MacMillan ML, Orchard PJ, Peters C, Welsdorf DJ, Ramsay NK, Davies SM: Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002; 100: 1611-8
- 18 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
- 19 Lopez-Jimenez J, Cervero C, Munoz A, Hernandez-Madrid A, Fernandez Pineda J, Garcia Larana J, Moro C, Maldonado M, Perez Oteyza J, Otheo E: Cardiovascular toxicities related to the infusion of cryopreserved grafts: results of a controlled study. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13: 789-93

III.2.2- Estabilización osmótica de CPH-A descongelada mediante la automatización del lavado de DMSO post descongelación.

Manuscrito nº 3.

Luciano Rodríguez, Beatriz Velasco, Joan García, Gregorio Ángel Martín-Henao.
“Evaluation of an automated cell processing device to reduce the dimethyl sulfoxide from hemopoietic grafts after thawing. Transfusion 2005.

Documento de aceptación del artículo en Transfusión.

31-Jan-2005

Dear Mr. Rodriguez:

Thank you for sending the revised version of your manuscript entitled, "EVALUATION OF AN AUTOMATED CELL PROCESSING DEVICE TO REDUCE THE DIMETHYL SULFOXIDE FROM HEMOPOIETIC GRAFTS AFTER THAWING."

I am pleased to inform you that it has been accepted for publication in Transfusion.

The journal's current production schedule should result in publication of the article within the next six to eight months. Please note that minor editorial changes may be made in accepted material to ensure consistency of style with the journal.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Transfusion, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Edward L. Snyder, M.D.
Associate Editor, Transfusion
edward.snyder@yale.edu, allison.britting@ynhh.org

EVALUATION OF AN AUTOMATED CELL PROCESSING DEVICE TO REDUCE THE DIMETHYL SULFOXIDE FROM HEMOPOIETIC GRAFTS AFTER THAWING.

Luciano Rodríguez¹, Beatriz Velasco², Joan García¹, Gregorio Ángel Martín-Henao¹.

1-Transfusion Center and Tissue Bank. Cell Therapy Unit. Hospital Duran i Reynals. Barcelona. Spain.

2- Baxter Healthcare, Spain.

Address to:

GA Martin-Henao, MD, PhD
Transfusion Center and Tissue Bank
Cell Therapy Unit
Hospital Duran i Reynals
Av. Castelldefels, km 2.7
L'Hospitalet de Llobregat,
08907 Barcelona, Spain
Telf : 93-260.74.08
Fax: 93-260.73.10
e-mail: gmartinh@iro.es

Short running head: Automated washing of thawed hemopoietic progenitor cells aphaeresis.

Acknowledgment: This work forms part of the Medicine Department PhD program of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), and has been partially supported by a grant from Baxter Healthcare, Spain

ABSTRACT

BACKGROUND: The direct infusion of thawed hematopoietic progenitor cells is associated to transfusion related side effects which are thought to be dose dependent to the infused dimethylsulfoxide (DMSO). Both the effectiveness of a fully automated cell processing device to washing out DMSO and the effects of DMSO elimination over the recovered cells were evaluated.

STUDY DESIGN AND METHODS: Twenty cryopreserved peripheral blood hemopoietic progenitor cells bags (HPC-A) were thawed and processed for washing with an automated cell processing device. Viability, colony forming units (CFU) and absolute count of recovered cells were evaluated by flow cytometry immediately after washing as well as at different times after washing and compared with a sample taken just after thawing (control) but maintained at 4°C. DMSO content was measured by HPLC and the osmolarity with an osmometer.

RESULTS: Median (range) recovery (%) of viable total nucleated cells, viable CD34+ cells and CFU colonies was 89 (74-115), 103 (62-126) and 91 (46-196) respectively in the washing group. Recovery of viable CD3 + cells was 97 (42-131), and CD14 + cells was 82 (54-119). Percentage of DMSO elimination and osmolarity reduction were 98 (96-99) and 90 (86-95), respectively. Moreover, elimination of the cryoprotectant improved CFU count, viability and cell recoveries along the time when compared with the control group.

CONCLUSION: Washing-out DMSO in thawed HPC-A by using this approach is safe and efficient in terms of recovery and viability of nucleated and progenitor cells. Additionally, the removal degree of DMSO is very high and therefore might ameliorate the transfusion related side effects.

Key words: Washing, thawed HPC-A, DMSO, Cytomate.

INTRODUCTION

Transplantation of hemopoietic progenitor cells (HPC) from peripheral blood (HPC aphaeresis; HPC-A) is a commonly used treatment for haemopoiesis reconstitution following high-dose chemotherapy. Autologous HPCs transplantation involves transfusion of post-thawed cells while allogenic transplantation is performed with fresh or, less frequently, cryopreserved HPCs.

Freezing process requires the addition of cryoprotectants to prevent cell injury from low temperature effects ¹. In this regard dimethylsulfoxide (DMSO), the most commonly used penetrating cryoprotectant, is added up to 10% v/v to reduce intracellular ice formation and solution effects ² during freezing. At time of infusion, HPCs are thawed and usually infused without manipulation. Consequently, cells, DMSO and lysis products enter into the patient's blood ^{1,3}. It is well documented that during infusion and /or in the following hours can occur several complications ranging from minor (nauseas and vomiting, cough, flushing, rash, chest tightness, chills, abdominal pain and hypotension ⁴⁻⁶) to severe (renal failures and cardiovascular ^{7,8} as well as neurological complications ⁹). These transfusion related complications are mainly attributed to DMSO content but also to the infused cell debris and released intracellular products.

To minimize these complications, cryopreservation of grafts highly concentrated on nucleated cells (NC) ¹⁰, the use of less DMSO in the preservation solution ^{11,12}, mixture of cryoprotectants ¹³, fractionated infusion ¹⁴ and CD34+ cell selection techniques ¹⁵ have been proposed. However, all these techniques may only reduce in a low extend the final content of cryoprotectant and lysis products.

HPCs washing after thawing has been also proposed to remove DMSO and debris before transfusion ^{16,17} by applying centrifugation techniques, either manual or semi-automatic ^{16,18}. Again, these techniques result in variable and some times poor elimination of DMSO and released lysis products ¹⁸⁻²¹. Indeed, sub-optimal HPC-A washing might result in loss of progenitor cells compromising the engraftment potential.

Recently a new bench top, fully automated cell processing device, (Cytomate®, Baxter Oncology, Chicago, IL) consisting in an user-programmable, closed system with a spinning membrane designed for concentration and washing of blood samples has been made available.

This study was designed to evaluate the feasibility and efficacy of this device on the washing of HPC-A products regarding to its potential on DMSO reduction and recovery of viable nucleated and progenitor cells. Additionally, the effects of this procedure on cell viability and recovery along the time were investigated.

MATERIALS AND METHODS

Study design

A total of 15 experiments were performed including 10 procedures processing one and 5 processing two HPC-A bags, which are the most common format employed in cell processing laboratories. The inclusion criteria for this study were products excluded for transplantation (patients relapse or death) and fully characterized, including total NCs, CD34 cell number and clonogenic assays data before cryopreservation. Two sets of experiments were carried out: first, one HPC-A bag (N=10) was washed after thawing and the evolution of the cell populations were monitored after thawing, after washing and 1, 2, 4 and 24 hours after washing. Second, two HPC-A bags (N=5) were sequentially washed after thawing and the same testing strategy was applied. In every case an aliquot (30 ml) of the thawed aphaeresis was maintained in a bag (Lifecell, Baxter) at 4°C without washing and served as a control. At every point of study, viability, total NC count, clonogenic assay, absolute cell count by flow cytometric analysis, Osmolarity and DMSO quantification were assessed in the washed and the unwashed-control products. Sterility tests were also performed just before and after wash.

Processing and cryopreservation

HPC-A from patients with various hematological malignances mobilized with chemotherapy and/or recombinant human granulocyte-colony-stimulating factor (rHuG-GSF) were used. HPC-A were processed according to standard validated methods¹⁰. Briefly, HPC-A was centrifuged at 400 g for 15 min to remove plasma and adjust volume, chilled to 4°C and then mixed with 4°C pre-chilled cryopreservation solution consisting in Ca²⁺- and Mg²⁺ free-phosphate-buffered saline (PBS), human serum albumin (HAS) and DMSO to obtain a final concentration of 10% DMSO (vol/vol) and 2% HSA (vol/vol). Then, cells were cryopreserved in a controlled cooling rate freezer up to -120°C (rate of 1°C/min up to -40°C, 2°C/min up to -60°C and 10°C/min up to -120°C) and stored in liquid nitrogen.

Thawing and Washing procedures

HPC-A bags were thawed by immersion in a 37 °C water bath. Immediately after thawing an aliquot was obtained, as a control of the experiments, and kept at 4° C. The remaining product was connected to the Cytomate device for processing. This machine is a user-definable, computer-controlled system that ensures cell washing and concentration. The sterile and single-use disposable set consists in a spinning membrane connected to a filtered wash bag, a waste bag and several spikes to connect buffers and product bags. Washing program parameters were; an initial 1:1 dilution of the HPC-A at 10 ml/min with a cold PBS buffer containing 5% Dextran 40, 5% HSA and 5% sodium-citrate followed by 5 minutes at 4°C in continuous agitation. After this period washing procedure starts with a pre-cooled PBS buffer containing 2.5% HSA and 5% sodium citrate. Washing proceeds in a continuous cycling of cell concentration-wash steps through the spinning membrane. The “residual fold reduction” parameter which defines the efficiency of the procedure was set at 50.

Automatic cell count and viability

Nucleated cell count was assessed for each sample by using the automatic cell counter ACT-diff® (Coulter, Miami, USA). Each sample was tested for viability by using the Trypan Blue dye-exclusion method (0.4% solution; Sigma Chemicals, St. Louis, MO) at every time point of study.

Flow cytometric assay.

Samples (1mL) drawn just before and after the washing process were incubated for cytometric absolute count with anti-human fluorescein-isothiocyanate (FITC) conjugated CD45 monoclonal antibody (MoAb) (Pharmingen Pharmaceutical, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Double staining was performed by using one anti human phycoerythrin (PE) conjugated CD34, CD3, CD14 or CD15 on each tube (Becton Dickinson, Pharmingen Pharmaceutical, Franklin Lakes, NJ) in PBS containing 1% albumin and 0.1% sodium azide during 30 minutes at 4°C in the dark. After this, samples were lysed in ammonium chloride during 10 minutes and 20 µL of commercially available fluorescent microbeads²² were added and mixed with the sample just before acquisition for single platform determination according to manufacturer's instructions (Perfect-Count, Cytognos, Salamanca, Spain). Absolute cell counts were measured and analyzed in a FACScalibur flow cytometer using Cellquest software. Cell viability was measured staining the samples with the vital dye 7-aminoactinomycin D (7-AAD) as proposed by the ISHAGE guidelines.²³

Median (range) recoveries were calculated for all the analyzed cell subsets by using the formula:
% Recovery = ((absolute cell count post wash) / absolute cell count post thaw) x 100.

Clonogenic assay

Progenitor cell assays were performed at every time point of study with the commercially available methylcellulose-based H4431 medium supplemented with rHu stem cell factor, interleukin 3, granulocyte-monocyte-CSF, and rHu-erythropoietin (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Briefly, 10⁵ cells were seeded directly from the samples on the methylcellulose-based medium, gently mixed and then plated on petri dishes. Cultures were incubated at 37°C and in 5-percent CO₂. Assays were run in triplicate. Colony-forming units-granulocyte-macrophage (CFU-GM), burst-forming units-erythroid (BFU-E), and CFU-Mixed (CFU-Mix) colonies were identified and counted according to standard criteria²⁴ after 14 days of culture.

Osmolarity quantification.

Samples osmolarity (mOsm/l) was measured by depression of freezing point in a Roebling 1313 automatic osmometer (Hermann Roebling Messtechnik, Berlin, Germany). Before osmometric determination samples were centrifuged for 5 minutes at 12000 rpm in order to obtain cells free solutions and were diluted 1/10 in distilled water, after that the samples were analyzed.

DMSO quantification.

DMSO content of the samples was determined by HPLC following a reported method ²⁵. Previous experiments were performed to confirm that calibration plot of DMSO peak area versus DMSO concentration was linear and samples had only one peak of DMSO. Samples were centrifuged for 5 minutes at 12000 rpm in order to obtain cells free solutions and diluted as needed to obtain DMSO contents falling within the linear range of the calibration plot. Samples taken just after thawing were diluted at 1/1000 in 10% v/v methanol while samples taken just after washing were diluted 1/10. The HPLC device employed was a Beckman System Gold HPLC (Beckman, San Ramon, CA) with multiple solvent delivery systems coupled to a Beckman-168 variable wavelength detector (Beckman, San Ramon, CA). The column used was an Ultrasphere ODS2 C₁₈ (5µm) measuring 4.6x25cm. The mobile phase contained 10% v/v methanol in high-purity deionized water, 20µl of each sample were injected, flow rate was set to 1.0 ml/min and the detector was set at 214 nm. With these conditions, DMSO peak eluted after 3 minutes.

STATISTICAL ANALYSIS

Data are shown as medians and ranges unless otherwise indicated. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon's rank test and comparing continuous variables. P value <0.05 was considered as significant. Statistical analyses were performed using SPSS 9.0 software (SPSS 9.0, SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

CELL RECOVERIES AFTER WASHING.

Data from fifteen washing procedures performed with a total of 20 HPC-A bags are shown in Table 1. Median (range) of total nucleated cells (TNCs) loaded into the Cytomate device for washing was 8.7×10^9 (0.8-21.6). The median volume was 82 ml (72-123) and 245 ml (184-257) in the one-bag and two-bags experiments respectively. Viability of NCs measured by 7AAD staining was 75% (73-89) after thawing. After washing, viability was 73% (60-91) in the control group and 87% (71-93) ($p=0.04$) for the washed cells. Cell viability calculated from TB staining showed similar results for both groups of study (data not shown)

Immediately after washing there were not statistical differences in the recovery of viable NCs, CD3+ cells, CD14+ cells and CD15+ cells between the washing and the control group. CD34+ cells loss was negligible in both groups. Percentage of viable CD34+ cells (CD34+/7AAD-) was 90% (25-99) after thawing and 95% (75-99) and 92% (61-99) in the washing and control groups respectively. Lose of CFU-GM or total CFU was around 10% in both groups. Final volumes obtained were 109 ml (91-134) in the one-bag experiments and 206 ml (183-230) in the two bags experiments.

The washing method described here takes, approximately, 30 minutes per bag.

CELL RECOVERIES AT SEVERAL TIME POINTS AFTER WASHING

In a set of ten experiments the state of cells at different times after washing was assessed and compared to the control, un-manipulated sample (see Figure 1).

One hour after washing, recovery of viable CD34+ cells ($p=0.04$) and CFU-GM ($p=0.02$) significantly decreased in the control group when compared to the washing group. This difference was observed in both CD34+ cells and CFU-GM at 2 hours ($p=0.04$), 4 hours ($p=0.02$ and $p=0.04$) and 24 hours ($p=0.02$) after washing. Similar figure was observed for total CFU along the time between the washing and control group. In addition, viability of CD34+ cells measured by 7-AAD was higher in the washing than in the control group at 1 hour (96% vs 87%, $p=0.03$), although there was not statistical difference at 2 hours (94% vs 87%, $p=0.06$), 4 hours (97% vs 95%, $p=0.2$) and 24 hours (96% vs 95%, $p=0.06$) after washing. Viability of TNC (CD45+/7-AAD- events) was higher in the washing than in the control group at 1 hour (79% vs 74%, $p=0.04$), 2 hours (82% vs 68%, $p=0.04$), 4 hours (82% vs 78%, $p=0.04$) and 24 hours (87% vs 65%, $p=0.008$).

DMSO REDUCTION AFTER WASHING

Median quantity of DMSO after thawing was 130 g/L (97-171), equivalent to 12%v/v (9-14). After washing, DMSO content dropped to 2 g/L (0.5-4) or 0.2 %v/v (0.05-0.21) as measured by HPLC, that represents a median DMSO reduction of 98% (96 - 99.7). Consistently, osmolarity of the same cell

suspensions had a median value of 3000 mOsm/L (1545-3000) after thawing and 302mOsm/L (227-402) after washing, resulting in a median osmolarity reduction of 90% (84-91).

DISCUSSION

Direct infusion of thawed cells is commonly used in the setting of HPC therapy for hematopoietic reconstitution. However, such a method implies infusion of DMSO and cell lysis products into the patient's blood and might be in part responsible for the transfusion related complications observed in many patients^[4-8]. Some of these complications are thought to be derived from DMSO induced histamine release, while others could be directly related to the amount of DMSO transfused⁶. In order to improve patient comfort and safety at time of infusion, we evaluated the Cytomate system, (Baxter Oncology, Chicago, IL) to obtain grafts with minimized DMSO and cell lysis products content.

In this study, we demonstrate that this approach is feasible and allows the HPC-A washing without major problems during processing as well as a highly effective DMSO reduction. A reproducible 98% elimination of DMSO was determined by HPLC. This chromatographic technique was previously used in tissue samples²⁵ and has been adapted in our laboratory for DMSO quantification in thawed HPC-A. Accordingly, final osmolarity of the washed cells suspension was reduced to 300 mOsm per L, close to plasma. Moreover, removal of cryoprotectant by this technique was associated to an irrelevant loose of HPCs.

Other investigators have used different strategies to wash DMSO from HPC-A. Del Mastro *et al*¹⁷ reported a direct manual centrifugation method keeping the cells in saline solution containing deoxyribonuclease. They did not observe any side effects related to transfusion of thawed and washed HPCs. Unfortunately; they did not give data about HPCs recovery nor DMSO reduction. Syme *et al*²⁶ have recently reported results from series of HPC-A washed by using a manual centrifugation method. They reported a median NC lose of 15% but with a CD34+ cells loose of 29%, which is slightly higher when compared to our results. These differences might be due to the different processing protocol used but also to the analysis methods as they use a double platform cytometry instead of the single platform used in this work.

Two different groups²⁷⁻²⁸ have recently reported their results of washing out DMSO from HPC-A and cord blood by using the automated Cytomate device in a series of preclinical experiments. They also reported a very high elimination of DMSO, more than 98%. Moreover, Calmes *et al*²⁷ reported a median viable CD34+ cell, CFU-GM and CD3+ T-cells recoveries of 66%, 63% and 77% in HPC-A products, similar to those results obtained by Perotti *et al*²⁸ in cord blood but lower than those obtained in our study. These differences in cell recoveries among works could have been influenced by the quality of the grafts after thawing. In this regard mean viability of CD34+ cells after thawing was 66% as reported by Calmes and 86% in our work. Also, Perotti *et al*²⁸ reported a NC viability after thawing below 70%.

Additionally, Calmes *et al*²⁷ performed a simultaneous washing of bags instead of the sequential strategy followed in this work. In fact, we tested in previous experiments the washing of cells pooled from two thawed HPC-A bags but cell aggregates and clumps occurred during manipulation resulting in a progenitor cells loss up to 50% including CFUs (data not shown). Moreover, we introduced immediately after thawing and dilution, an equilibrium step of 5 minutes using a hiperosmotic buffer as described by Rubinstein *et al*²⁹ for cord blood. The rationale of such a step is the control of the osmotic gradient suffered by cells by adding a buffer with high content in macromolecules and protein which associate free water. In this regard, osmotic shock might also be affecting thawed cells when directly enter in the blood and change their osmotic environment. This situation could be prevented by applying the automatic washing described here as shown by osmolarity values obtained after washing. In fact, additional experiments introducing washed and unwashed cells into an isotonic environment (n=10, data not shown) showed that thawed samples directly diluted in phosphate buffer saline suffered a loss of 25% ± 21% of total CD34 + cells as well as a reduction of 15% in viability as measured by 7AAD staining. In contrast washed cells from the same samples showed a 99% ± 21% of recovery without significant changes in viability after the same manipulation.

Whether washing-out DMSO after thawing affects the speed of engraftment is not clear. Recently, Syme *et al*²⁶ compared the time to hemopoietic engraftment in a series of 35 patients with breast cancer autotransplanted with HPC-A DMSO-washed comparing with a control group of 21 patients autotransplanted with HPC-A containing DMSO. They did not find differences in hemopoietic recovery between groups but at time of infusion, the washed group had higher number of CD34+ cells and CFU-GM than the group containing DMSO. Nevertheless, the authors noted a significant lower incidence of infusion related side effects in the DMSO-washed group.

Although automatic and easy handling, the washing protocol described here was time consuming compared to direct infusion after thawing. However, if washing out of DMSO and cell debris is translated in lesser transfusion related reactions and reduced workload over the nurse staff, this technique might be considered for routine thawed cells processing.

Another interesting question is whether DMSO is toxic for the cells at different times after thawing. Based on cell viability studies with bone marrow, Branch *et al*³⁰ found not toxicity of DMSO over CFU-GM up to two hours at 4°C. In contrast, Douay *et al*³¹ reported a loss of CFU-GM of 85% when BM-HPCs were kept in DMSO at 4°C for a period of 120 min. Additionally, Humpe *et al*³² have reported a significant reduction of the clonogenic potential of HPC-A in the presence of DMSO with loss of CFU-GM up to 40% only 30 min after thawing. Our results also suggest a real negative effect of DMSO translated into a loss of HPCs around 50% within 90 min after thawing. In this context, we observed a rapid reduction of viable CD34+ cells and CFU-GM, with less than 50% of recovery in the control group compared to 70%

in the washed arm two hours after washing. The same behavior was observed at every time of study after washing affecting counts of CD3 and CD14 + cells which were lower in the group with DMSO. Such differences in cell counts increased proportionally with time and favored in each case the group where DMSO was washed out.

Taken together, our results suggest that un-manipulated grafts should be infused as soon as possible after thawing and that it should be recommendable not to exceed the deadline of one hour. Additionally, if a time delay from thawing to infusion is expected, it should be recommendable to wash-out DMSO in order to obtain better cell recoveries and viability. Moreover, washing HPC-A after thawing could be performed under laboratory-controlled conditions rather than at the bedside improving synchronization among cell processing laboratories and the clinical staff. Finally, HPC-A wash with this automated device allows the user to define the final volume of the product and thus, large volume of cryopreserved HPC-A could be reduced to a suitable volume for infusion

In conclusion, thawed HPC-A washing by using this fully automated cell processing device and the described protocol is highly effective and reproducible on reducing the DMSO content with a negligible loss of viable HPCs. Moreover, the washed HPC-A products remain more stable along the time than those containing DMSO. A further step will be a pilot clinical study in order to assess the clinical safety and efficacy of this approach.

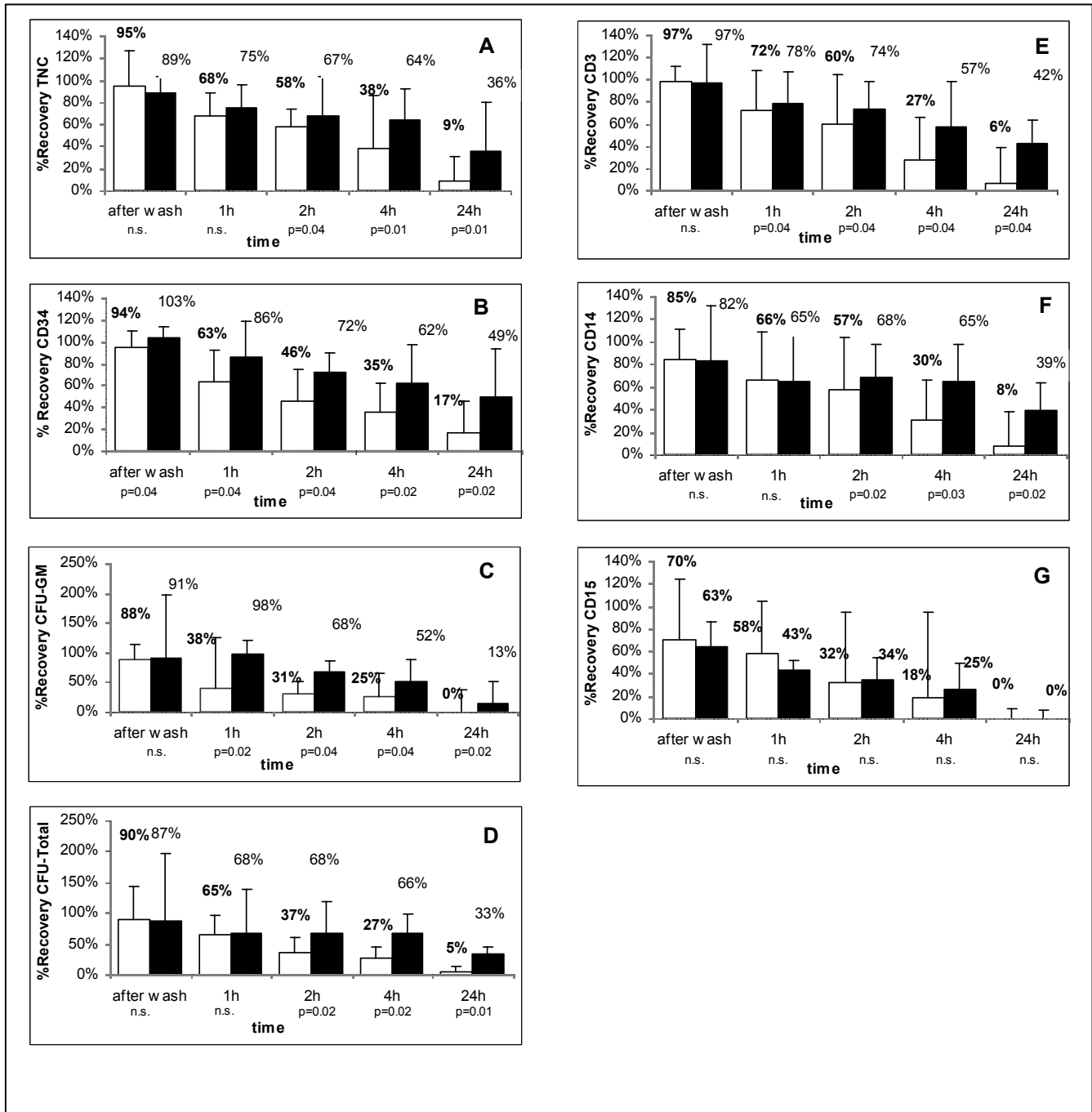
TABLE 1. Results of the washing procedure

	After thawing		Control				After washing				p**
	Content		Content		Recovery (%)		Content		Recovery (%)		
	Median	Range	Median	Range	Median	Range	Median	Range	Median	Range	
*TNCs (10 ⁹)	8.7	(0.8-21.6)	8.6	(0.7-19.4)	95	(61-127)	8.4	(0.7-21.2)	89	(74-115)	0.9
CD34 (10 ⁶)	17.3	(10.7-64)	17.5	(7.5-65.7)	94	(75-110)	18.2	(7-66.5)	103	(62-126)	0.04
CD3 (10 ⁸)	42	(0.2-590)	44	(0.2-530)	97	(61-112)	36	(0.1-620)	97	(42-131)	0.09
CD14 (10 ⁸)	24	(0.02-41)	19.1	(0.02-40)	85	(61-104)	17	(0.02-42)	82	(54-119)	0.7
CD15 (10 ⁸)	1.7	(0.03-12.4)	1.4	(0.02-13)	70	(9-124)	0.11	(0.02-15)	63	(24-121)	0.17
#CFU-GM (10 ⁶)	3.3	(0.8-23.1)	2.8	(0.8-18.2)	88	(21-142)	3.5	(0.95-25)	91	(46-196)	0.2
Osmolarity (mOsm/L)	3000	(1545-3000)	3000	(1545-3000)	-		302	(227-402)	10	(5-14)	0.001
DMSO (g/L)	130	(97-171)	130	(91-171)	-		2	(0.5-4)	2	(1-4)	0.002

*TCNs, Total nuclear cells. #CFU-GM, Colony-forming units-granulocyte-macrophage.

**p value from Wilcoxon rank test statistic comparing recovery values from control and washing groups.

FIGURE 1. Samples evolution after thawing with or without washing. Recoveries of viable nucleated cells (NC) (A), CD34+ cells (B), colony-forming units-granulocyte-macrophage (CFU-GM) (C), total colony-forming units (D), CD3+ cells (E), CD14+ cells (F) and CD15+ cells (G) are shown in washed (black boxes) and unwashed (white boxes) groups, immediately after washing and at 1 hour, 2 hours, 4 hours and 24 hour after washing.



1. Rowley SD. Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques. *J Hematother* 1992;1(3):233-50.
2. Rowley SD, Anderson GL. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 1993;11(5):389-93.
3. Kessinger A, Schmit-Pokorny K, Smith D, Armitage J. Cryopreservation and infusion of autologous peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1990;5 Suppl 1(25-7).
4. Stroncek DF, Fautsch SK, Lasky LC, et al. Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow. *Transfusion* 1991;31(6):521-6.
5. Davis JM, Rowley SD, Braine HG, et al. Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. *Blood* 1990;75(3):781-6.
6. Alessandrino P, Bernasconi P, Caldera D, et al. Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases. *Bone Marrow Transplant* 1999;23(6):533-7.
7. Keung YK, Lau S, Elkayam U, et al. Cardiac arrhythmia after infusion of cryopreserved stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1994;14(3):363-7.
8. Lopez-Jimenez J, Cervero C, Munoz A, et al. Cardiovascular toxicities related to the infusion of cryopreserved grafts: results of a controlled study. *Bone Marrow Transplant* 1994;13(6):789-93.
9. Higman MA, Port JD, Beauchamp NJ, Jr., Chen AR. Reversible leukoencephalopathy associated with re-infusion of DMSO preserved stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2000;26(7):797-800.
10. Cabezudo E, Dalmasas C, Ruz M, et al. Leukapheresis components may be cryopreserved at high cell concentrations without additional loss of HPC function. *Transfusion* 2000;40(10):1223-7.
11. Abrahamsen JF, Bakken AM, Bruserud O. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5-percent rather than 10-percent DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34+ cells. *Transfusion* 2002;42(12):1573-80.
12. Bakken AM, Bruserud O, Abrahamsen JF. No differences in colony formation of peripheral blood stem cells frozen with 5% or 10% dimethyl sulfoxide. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12(3):351-8.
13. Rowley SD, Feng Z, Chen L, et al. A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch. *Bone Marrow Transplant* 2003;31(11):1043-51.
14. Martino M, Morabito F, Messina G, et al. Fractionated infusions of cryopreserved stem cells may prevent DMSO-induced major cardiac complications in graft recipients. *Haematologica* 1996;81(1):59-61.
15. Shpall EJ, LeMaistre CF, Holland K, et al. A prospective randomized trial of buffy coat versus CD34-selected autologous bone marrow support in high-risk breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *Blood* 1997;90(11):4313-20.
16. Ayello J, Hesdorffer C, Reiss RF. A semiautomated technique for volume reduction of stem cell suspensions for autotransplantation. *J Hematother* 1995;4(6):545-9.
17. Del Mastro L, Venturini M, Viscoli C, et al. Intensified chemotherapy supported by DMSO-free peripheral blood progenitor cells in breast cancer patients. *Ann Oncol* 2001;12(4):505-8.
18. Beaujean F, Hartmann O, Kuentz M, et al. A simple, efficient washing procedure for cryopreserved human hematopoietic stem cells prior to reinfusion. *Bone Marrow Transplant* 1991;8(4):291-4.

19. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(10):3828-32.
20. Stewart AK, Vescio R, Schiller G, et al. Purging of autologous peripheral-blood stem cells using CD34 selection does not improve overall or progression-free survival after high-dose chemotherapy for multiple myeloma: results of a multicenter randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2001;19(17):3771-9.
21. Yanovich S, Mitsky P, Cornetta K, et al. Transplantation of CD34+ peripheral blood cells selected using a fully automated immunomagnetic system in patients with high-risk breast cancer: results of a prospective randomized multicenter clinical trial. *Bone Marrow Transplant* 2000;25(11):1165-74.
22. Menendez P, Redondo O, Rodriguez A, et al. Comparison between a lyse-and-then-wash method and a lyse-non-wash technique for the enumeration of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Cytometry* 1998;34(6):264-71.
23. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, et al. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Cytometry* 1998;34(2):61-70.
24. Capmany G, Querol S, Cancelas JA, Garcia J. Short-term, serum-free, static culture of cord blood-derived CD34+ cells: effects of FLT3-L and MIP-1alpha on in vitro expansion of hematopoietic progenitor cells. *Haematologica* 1999;84(8):675-82.
25. Carpenter JF, Dawson PE. Quantitation of dimethyl sulfoxide in solutions and tissues by high-performance liquid chromatography. *Cryobiology* 1991;28(3):210-5.
26. Syme R, Bewick M, Stewart D, et al. The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: on hematologic recovery, side effects, and toxicity. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10(2):135-41.
27. Calmels B, Houze P, Hengesse JC, et al. Preclinical evaluation of an automated closed fluid management device: Cytomate(TM), for washing out DMSO from hematopoietic stem cell grafts after thawing. *Bone Marrow Transplant* 2003;31(9):823-8.
28. Perotti C, Del Fante, C, Salvaneschi, L et al. A new automated cell washer device for thawed cord blood units. *Transfusion* 2004;44(9):900-6.
29. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(22):10119-22.
30. Branch DR, Calderwood S, Cecutti MA, et al. Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity. *Transfusion* 1994;34(10):887-90.
31. Douay L, Gorin NC, David R, 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(4):360-6.
32. Humpe A VK, Riggert J. DMSO significantly reduces the proliferative potential of peripheral blood stem cells after cryopreservation. *Bone Marrow Transplant* 2000;25(S257).

RESUMEN DE RESULTADOS

RESUMEN DE RESULTADOS:

1- Evidencia de pérdida celular tras descongelación y dilución isotónica. Efecto de la aplicación directa de los protocolos de citometría de flujo sobre el descongelado.

1.1- Recuperación celular tras dilución directa del descongelado en PBS.

La recuperación celular (CNT) y la viabilidad (TB, 7AAD) de productos de SCU y CPH-A descongelados disminuyen cuando diluimos las muestras en medio isotónico antes del recuento celular. Esta pérdida es sensiblemente mayor cuando utilizamos la CMF como método de análisis. En las condiciones descritas, los resultados de recuperación de CNT vivas calculados con valores de contador automático se sitúan en el 60% mientras que la recuperación de células CD34+ vivas están en torno del 45%.

Estos valores, muy por debajo de lo esperado, sugieren que la pérdida celular podría haber sido debida al cambio brusco de osmolaridad durante la dilución fisiológica del descongelado pero no podemos descartar el hecho de que los procesos de congelación y descongelación pudiesen haber influido en esta disminución.

1.2- Efecto de la dilución en PBS sobre el recuento y viabilidad celular.

Cuando ensayamos el efecto del retorno a condiciones fisiológicas sobre productos de CPH-A descongeladas por CMF evitando la pérdida celular mediada por los procesos de congelación y descongelación, las recuperaciones celulares en estos experimentos se calcularon a partir de los recuentos del producto descongelado, observamos una reducción del recuento (40%) y de viabilidad celular (20%) tanto en células CD45+ como en células CD34+. Estos resultados fueron similares a los obtenidos anteriormente (1.1) y pudimos relacionarlos directamente con el cambio brusco de osmolaridad sobre las muestras descongeladas.

1.3- Pérdida celular en el control de calidad por citometría de flujo.

Los resultados mostrados en 1.1 y 1.2 fueron reproducidos en unidades de SCU descongeladas cuando se analizaron por CMF (**Manuscrito nº 1**), siendo la disminución de viabilidad el factor principal en la limitada recuperación celular respecto al producto congelado. Es de destacar que en estos ensayos no hubo una dilución isotónica antes de los análisis, sugiriendo que la propia técnica citométrica podría estar mediando un efecto de choque osmótico. La utilización de soluciones de lisis en los protocolos de CMF podría ser una fuente de choque osmótico en muestras descongeladas. De ser así, actuaría como un artefacto experimental en los análisis celulares post descongelación.

2- Prevención del choque osmótico sobre células descongeladas.

2.1- Prevención del choque osmótico postdescongelación mediante la adición de proteína y macromoléculas a los medios de dilución.

El choque osmótico resulta en una reducción de viabilidad por un mecanismo en el que se supera la resistencia mecánica de la membrana celular debido a la entrada masiva de agua en la célula en respuesta a un cambio brusco de osmolaridad. En este sentido, si la pérdida celular observada en los puntos anteriores (1.1, 1.2, 1.3) es debida a un mecanismo de choque osmótico, esta pérdida puede prevenirse mediante la adición a los medios de dilución del descongelado de moléculas con alta capacidad de hidratación (Albúmina, Dextrano) que regulen el flujo de agua hacia el interior de las células en el momento en el que se produce el cambio brusco de osmolaridad.

Observamos un aumento de la recuperación media de CNT del 20% al diluir el descongelado en medios isotónicos con un 5% de Albúmina y/o Dextrano respecto a las recuperaciones observadas cuando el medio de dilución no contenía estas moléculas. La viabilidad de las muestras se comportó de manera similar aumentando una media del 10% en las muestras diluidas en medio con proteína y/o Dextrano. Estos resultados se reprodujeron en muestra de SCU y CPH-A descongeladas.

Cuando se utilizó la CMF como método de análisis de muestras descongeladas sometidas a dilución en medios isotónicos, observamos que para las células CD3+ y CD34+ de SCU, el recuento celular total aumentó sobre un 20% cuando utilizamos proteína y/o Albúmina en los medios de dilución. De nuevo la disminución de viabilidad fue la principal causa de disminución de recuperación celular.

Por último, cuando ensayamos el efecto de la dilución directa del descongelado sobre la recuperación de colonias clonogénicas observamos que la dilución en medios con proteína no fue suficiente para prevenir la pérdida de colonias respecto a la misma muestra sembrada directamente, sin mediación de choque osmótico. Posteriormente, cuando ensayamos el efecto de la extensión de la dilución en la recuperación de colonias observamos que mientras que una dilución en 10 volúmenes del descongelado resultaba en una pérdida de capacidad clonogénica (40%), la dilución en 1 volumen de la misma muestra recuperaba casi la totalidad (92%) de la capacidad clonogénica de la muestra, sugiriendo que el cambio paulatino de osmolaridad de la muestra descongelada es un método eficaz para la prevención del choque osmótico.

2.2- Prevención del choque osmótico postdescongelación mediante la aplicación de una etapa de equilibrio osmótico.

La introducción de una etapa de equilibrio osmótico previene el efecto del choque osmótico sobre CPH-A descongeladas. Así, mientras que una dilución 1/10 de las muestras descongeladas en medio isotónico redujo el recuento (30% - 40%) y la viabilidad (15%), cuando estas muestras fueron equilibradas osmóticamente, la dilución en el mismo medio no afectó ni al recuento (98% recuperación) ni a la viabilidad (>90%).

Posteriormente ensayamos el efecto de la etapa de equilibrio osmótico sobre el paso de lisis de eritrocitos de los protocolos de CMF comparando los resultados de la técnica citométrica con o sin equilibrio antes de la adquisición de datos. La introducción de la etapa de equilibrio rindió un aumento en el recuento de células CD3+ vivas (30%- 50%) y de su viabilidad (20%-50%) poniendo en evidencia que la propia etapa de lisis de eritrocitos es una fuente de choque osmótico (ver 1.3). Estos resultados se reprodujeron para muestras de SCU y CPH-A descongeladas. En consecuencia, propusimos y validamos una técnica de CMF que no se viese afectada por el choque osmótico asociado a la etapa de lisis de eritrocitos.

3- Aplicación clínica de la prevención del choque osmótico sobre productos hematopoyéticos descongelados mediante la estabilización osmótica.

3.1- Aplicación a una técnica de citometría de flujo para la determinación de calidad de un producto hematopoyético descongelado.

La técnica citométrica propuesta para la determinación de células descongeladas se basa en la introducción de una etapa de equilibrio osmótico antes del marcaje y adquisición de la muestra. Esta técnica rindió una alta correlación ($R=0.98$) para la determinación de células CD45+ y CD34+ y un c.v del 5% cuando las muestras analizadas tenían de 100 a 300 eventos CD34+ por microlitro. La etapa de equilibrio osmótico del protocolo propuesto se fijó en 5 minutos reproduciendo experiencias anteriores en SCU pero la extensión de esta etapa hasta los 10 minutos no tuvo ningún efecto en los resultados de recuento ni de viabilidad de las muestras. Por último, y reproduciendo resultados anteriores (2.2) la aplicación de esta técnica frente a una técnica clásica de citometría, sin etapa de equilibrio, rindió un 20%-30% más de recuperación de CPH vivas respecto al producto congelado, dando consistencia a la hipótesis de que la etapa de lisis de eritrocitos es la mediadora del choque osmótico durante la determinación citométrica del descongelado.

3.2- Aplicación a las técnicas de preparación de productos hematopoyéticos descongelados para uso clínico.

Finalmente, y como consecuencia lógica de los resultados obtenidos, validamos diferentes métodos de lavado de DMSO en productos hematopoyéticos descongelados que permitiesen obtener un producto celular para uso clínico estabilizado osmóticamente y que por tanto no resultara perjudicado por el cambio de osmolaridad que supone la introducción en plasma durante la infusión. En este sentido se validaron preclínicamente dos sistemas cerrados para el lavado automático del DMSO en productos hematopoyéticos descongelados, uno para SCU (**Manuscrito nº 2**) y el otro para CPH-A (**Manuscrito nº 3**). Los protocolos de lavado se basaron en la aplicación de una etapa de equilibrio osmótico inicial de las muestras y la recuperación de progenitores y colonias fue consistentemente del 90% con ambos sistemas. En el caso del lavado de SCU descongelado verificamos que no se produjo inducción de procesos de apoptosis, y aunque estos ensayos no se realizaron directamente en el caso de CPH-A, los resultados de viabilidad y recuperación funcional post lavado en estas muestras a lo largo del tiempo apuntan hacia el mismo sentido. Los productos resultantes del lavado celular mostraron osmolaridades plasmáticas y la eliminación del DMSO fue del 98%. Adicionalmente, el efecto de la presencia de DMSO en las muestras descongeladas a lo largo del tiempo fue evaluado en muestras pareadas de CPH-A lavadas y no lavadas post descongelación. La presencia de DMSO redujo el recuento (50%), la recuperación clonogénica (60%) y la viabilidad de los progenitores a tiempos de una a dos horas post lavado aún cuando las muestras se conservaron a 4°C. La recuperación de CPH y CFU de las mismas muestras pero en las que se había eliminado el DMSO fue del 70%. Así, la eliminación del crioprotector en productos hematopoyéticos descongelados es beneficiosa para la conservación *ex vivo* del injerto a medio-largo plazo.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN.

El 70% de los TPH realizados en España¹², los autólogos y algunos alogénicos de CPH-A así como todos aquellos que se realizan a partir de SCU, incluyen etapas de congelación, almacenamiento a temperaturas de -196°C y reconstitución del producto hematopoyético para su uso clínico. Se sabe que todos estos procesos pueden modificar el recuento y viabilidad celular y sin embargo, la dosis de células CD34+ infundidas al paciente en el momento del trasplante es, habitualmente, la de los recuentos celulares efectuados antes de la congelación. En consecuencia, la potencial pérdida celular durante la criopreservación e incluso durante manipulaciones posteriores hace que el número de CPH en el producto infundido sea en la mayoría de los casos menor que el número de células congeladas. En este sentido se ha reportado, en estudios *in vivo*, que la etapa de congelación puede reducir hasta en un 50% la capacidad de injerto de la MO de ratón¹²⁵.

Dicho de otra manera, las dosis celulares (CD34+ / kg peso receptor) en el TPH están, en cierto grado, sobrevaloradas respecto a las dosis reales infundidas al paciente. Este es un hecho asumible y asumido porque la determinación sistemática de la dosis real de células CD34+ preinfusión simplemente implicaría una modificación de valores en los ejes de las curvas, por ejemplo, de dosis CD34+-tiempo de implante. Sin embargo, el no analizar exhaustivamente el estado de las CPH antes de la infusión puede conducir a la no detección de una pérdida celular inesperada en un injerto programado para su infusión.

La implicación clínica de esta pérdida de CPH dependerá de la extensión del daño celular originado durante la criopreservación y reconstitución del producto hematopoyético y tendrá un impacto distinto según la fuente de CPH. Así, en el caso del TPH con células de CPH-A, como el número de células recogidas supera en la mayoría de trasplantes las dosis mínimas establecidas, tendría que ocurrir una pérdida celular inesperada para disminuir el potencial de implante. Sin embargo, en el caso de la SCU donde el principal factor limitante para el éxito del trasplante es la dosis celular infundida así como en aquellos inóculos de CPH-A con dosis límite, esta pérdida podría conducir a un fallo o retraso de implante de origen aparentemente desconocido.

Las técnicas de laboratorio para la calificación y cuantificación de productos hematopoyéticos antes de su criopreservación incluyen el recuento de CNT y de células CD34+ mediante el uso de contadores automáticos y CMF, así como ensayos de integridad de membrana mediante tinción con TB y 7AAD. Sin embargo, tras la descongelación del producto hematopoyético solo se realiza, habitualmente, un recuento de CNT y una tinción con TB para determinar el estado celular del injerto.

En este sentido, y tal como se muestra en los resultados experimentales obtenidos en este trabajo de Tesis, la calidad de un producto hematopoyético descongelado depende considerablemente de la técnica de QC utilizada y sobretodo, de las manipulaciones a las que se somete a las células. Así, aunque tras la dilución de un descongelado en medio isotónico se obtienen recuperaciones de CNT del 80% y viabilidades del 70% - 75% al utilizar datos del contador automático, la CMF rinde recuperaciones del orden del 45% de células CD34+ vivas. Estas diferencias pueden explicarse si se considera en detalle lo que le pasa al producto hematopoyético, a nivel celular, cuando se somete a las diferentes técnicas.

El contador automático de impedancia lisa las células antes de su recuento y cuenta esencialmente núcleos celulares, no células íntegras. Por tanto, las posibles lesiones de membrana pasan desapercibidas para esta técnica que contaría como evento celular cualquier célula lisada o con defectos en la membrana, sugiriendo que el recuento, *per se*, no es indicativo del estado celular. Sin embargo, en el caso de la CMF, una célula CD34+ lisada o que tiene zonas de discontinuidad de membrana no contaría como evento por la pérdida de tamaño, la pérdida de fluorescencia o por ser detectada como célula muerta por la tinción con 7AAD.

Como el número total de células en el descongelado no es indicativo del estado celular, acompañando a un recuento de CNT siempre se realiza una tinción con TB para obtener información sobre la viabilidad del injerto. La tinción con TB, basada en la entrada del colorante en el interior celular aprovechando la existencia de lesiones de membrana, es un reflejo del estado general de las células descongeladas pero no proporciona información del subconjunto de células CD34+. Ya se ha reportado con anterioridad que el contenido de CNT no correlaciona con el contenido de células CD34+ en un injerto ¹²⁶ y por tanto el recuento de CNT y su viabilidad no nos proporciona información sobre las CPH.

Adicionalmente, se sabe que no existe correlación entre la tinción de viabilidad, la recuperación de CNT vivas y la formación de colonias ^{127,128} debido a la baja proporción de progenitores en el conjunto de las CNT, el 0.3% en SCU y el 1.7% en CPH-A, haciendo que el recuento de CNT y la viabilidad TB sean poco informativos, también, de la capacidad clonogénica del producto ensayado.

En general, las viabilidades celulares mayores del 50% medidas por TB no correlacionan con la ratio de capacidad clonogénica antes y después de la criopreservación de los productos hematopoyéticos ¹²⁹ y solo aquellas viabilidades menores del 50% predicen una pérdida significativa de la capacidad clonogénica de los injertos *in vitro*. Adicionalmente, los ensayos de viabilidad basados en exclusión de TB son difíciles de comparar entre laboratorios por falta de estándares en la coloración de las células muertas y los resultados pueden verse afectados por el tiempo de incubación en el medio de tinción y por la presencia de eritrocitos y proteína en la muestra ¹²⁹.

Así, se podría dar la paradoja de que una unidad seleccionada para trasplante exhibiera un contenido aceptable de CNT según el recuento automático y la viabilidad TB post descongelación pero que contuviese poca capacidad clonogénica ¹²⁷ o un recuento de CD34+ sensiblemente disminuido que comprometieran la probabilidad de implante. Esta situación ya ha sido reportada con SCU ¹³⁰ y nos plantea la cuestión de que cuántas veces un control de calidad adecuado del descongelado podría haber alertado de la posibilidad de fallo de implante.

Por tanto, para obtener información real sobre el estado de las células progenitoras después de la descongelación, deberíamos determinar el recuento y viabilidad del subconjunto de células CD34+ por citometría de flujo y/o sus características funcionales mediante ensayos *in vitro* de su capacidad clonogénica (ensayos CFU, cultivos clonogénicos).

Los cultivos clonogénicos *in vitro* son largos (2 semanas) y con una variabilidad ínterlaboratorios muy grande, se han publicado recuperaciones post descongelación de CPH de SP que van del 0% hasta el 300% ^{128,131} incluso cuando se estandarizaron los medios de cultivo y las combinaciones de factores de crecimiento en estos ensayos.

Además, el cultivo clonogénico a partir del producto hematopoyético descongelado no es un control de calidad útil para la clínica del TPH debido al corto periodo que pasa, en la mayoría de casos, entre la criopreservación del producto y el momento de la infusión. No obstante este ensayo sería de utilidad a partir de las alícuotas de producto congeladas paralelamente con el producto, por lo menos en cuanto a lo que se refiere a la detección de una pérdida significativa de capacidad clonogénica durante el proceso de congelación. Adicionalmente, como en la actualidad no se realiza habitualmente este tipo de ensayos con los productos pre congelación, el cálculo de recuperación de capacidad clonogénica postdescongelación es inviable para las unidades ya congeladas. De esta manera, el recuento de colonias post descongelación serviría en estas unidades para, de forma cualitativa, saber si nuestro injerto está o no en el rango de eficiencia clonogénica ($n^{\circ}\text{CFU}/n^{\circ}\text{CD34}$) esperada.

Finalmente, la razón por la que la CMF del descongelado no ha desplazado a los ensayos de integridad de membrana en el control de calidad de los productos hematopoyéticos es, seguramente, por la dificultad técnica de la CMF en este tipo de muestras, porque no existen estudios de comparación sistemáticos entre métodos de análisis y por la discrepancia en los valores de recuperación celular que se encuentran cuando utilizamos una u otra técnica. En este sentido, en un ensayo clínico en el que se determinó el contenido de progenitores antes y después de manipular el producto descongelado se han reportado pérdidas de células CD34+ de hasta el 70%. Esta pérdida celular no se tradujo en un retraso de implante aún encontrándose los inóculos en dosis límites, sugiriendo que la técnica empleada para la determinación citométrica del descongelado podría haber infravalorado el contenido de CD34+ en esas muestras ¹³³

La optimización de las técnicas de control de calidad de descongelados permitiría establecer el impacto real de la criopreservación y reconstitución del producto hematopoyético sobre la recuperación de las CPH antes de la infusión así como la detección precoz de cualquier evento que pudiese comprometer la viabilidad y/o recuento celular. Además, el conocimiento de la dosis de células CD34+ viables en el momento de la infusión permitirá definir mejor las dosis mínimas y seguramente, debido a la sobrevaloración actual, establecería umbrales menores.

Todo producto hematopoyético criopreservado debe ser descongelado para su uso clínico, lo que implica que todo lo que suceda durante la congelación celular afectará o deberá considerarse a la hora de evaluar y/o manipular el producto descongelado.

En este sentido, es de destacar la hiperosmolaridad de las suspensiones celulares descongeladas así como el comportamiento celular en respuesta a cambios bruscos de osmolaridad. Ambas afectan el estado general del producto descongelado y son factores críticos a la hora de diseñar las técnicas de control de calidad del descongelado.

Las células descongeladas heredan una situación de hiperosmolaridad debida, principalmente, a la presencia del DMSO. Nuestros datos de osmolaridad de productos descongelados (1500-3000 mOsm/L) superaron a aquellos calculados teóricamente a partir de la concentración de crioprotector (1700 mOsm/L). Esta diferencia puede haberse debido a la existencia en los productos ensayados de altos porcentajes de células granulocíticas, más sensibles al proceso de criopreservación, que al lisarse liberan al medio su contenido aumentando la osmolaridad extracelular. Independientemente del valor exacto de osmolaridad, las células se encuentran muy lejos de las condiciones de osmolaridad óptimas, fisiológicas, en un momento (descongelación) en el que sus membranas celulares están inmersas en un cambio de fase (Temp melting) que resta fluidez y que altera aún más el reestablecimiento de un metabolismo celular normal. Además, los cambios de osmolaridad implican movimiento de solutos a través de las membranas plasmáticas dependientes de concentración (ósmosis, difusión), que pueden alterar su integridad.

La hiperosmolaridad afecta significativamente a la recuperación de CPH descongelados a partir de 60 minutos y a la capacidad clonogénica de los injertos a partir de 90 minutos postdescongelación. Este es un "largo plazo" teniendo en cuenta que el tiempo necesario para el restablecimiento de la osmolaridad fisiológica, desde la descongelación hasta la infusión, se da en cuestión de minutos (15-40). Los datos obtenidos en nuestro laboratorio muestran como la capacidad clonogénica y el recuento de células CD34+ vivas se reduce significativamente (60%), aún manteniendo el injerto a 4°C, en el plazo de una a dos horas postdescongelación cuando el DMSO está presente en la solución, mientras que la pérdida es aproximadamente la mitad (30%) si se elimina el crioprotector. Además, el resto de células del injerto, linfocitos, monocitos y granulocitos siguieron el mismo patrón.

La primera conclusión de estos resultados es que la presencia del crioprotector es deletérea para los productos hematopoyéticos descongelados independientemente de la etiología del mecanismo responsable, la toxicidad química del DMSO y/o la hiperosmolaridad *per se*. La segunda conclusión es que un producto hematopoyético descongelado debe ser infundido lo antes posible si no se elimina el crioprotector y que el tiempo máximo desde la descongelación hasta la infusión no debe sobrepasar el límite de seguridad de los 90 minutos.

La hiperosmolaridad en los productos hematopoyéticos descongelados tiene implicaciones más sutiles que el tiempo de caducidad. El choque osmótico afecta tanto a la capacidad clonogénica del injerto como a los resultados de los controles de calidad del descongelado.

La dilución directa del descongelado en medios isotónicos afecta la viabilidad celular de las CNT, de las células CD34+, de las CD3+ y también la capacidad clonogénica *in vitro* del injerto. Esta reducción de viabilidad tiene su origen en el choque osmótico y se produce en las manipulaciones implícitas en los controles de calidad como la dilución para recuento de CNT y la dilución en los tampones hipoosmóticos de lisis utilizados en los protocolos de CMF. Recordemos¹¹⁰ que el volumen osmóticamente activo de las células hematopoyéticas va del 60% al 80% de su volumen en condiciones isotónicas y que las células se comportan como osmómetros moviendo, en respuesta a los cambios de osmolaridad, hasta ese volumen a través de sus membranas.

Se puede amortiguar el efecto del choque osmótico mediante la adición a los medios de dilución de moléculas que asocian agua a sus estructuras como las proteínas y el polímero Dextrano40. Tal y como hemos demostrado, la recuperación de células vivas en un descongelado es directamente proporcional a la concentración de estas moléculas en el medio de dilución seguramente porque controlan el flujo de agua hacia el interior celular cuando se produce una disminución de la osmolaridad¹³⁴⁻¹³⁶ en el medio extracelular. En este sentido, es de destacar que las proteínas y los polisacáridos como el Dextrano40 pueden asociar moléculas de agua a su estructura por un peso de dos a cinco veces su peso seco.

Sin embargo, aunque la simple adición de estas moléculas en los medios de dilución (5% v/v) rindió un 10-20% más de CNT vivas, hasta el 90%, debido principalmente al aumento de la viabilidad, tuvo un efecto más bien discreto en las recuperaciones celulares medidas por CMF, tanto en SCU como en CPH-A. Se obtuvieron recuperaciones medias de células CD34+ vivas del orden del 60%.

De forma similar, la presencia de macromoléculas durante la inducción del choque osmótico por dilución no tuvo un efecto beneficioso en la recuperación de colonias clonogénicas en SCU, que fue del orden del 60% independientemente de la presencia de Albúmina y/o Dextrano40 en el medio de dilución.

La extensión del choque osmótico y la etapa de equilibrio osmótico resultaron factores importantes en la recuperación de colonias y de células vivas por CMF en los productos descongelados. En este sentido, la recuperación de colonias aumentó en un 30% (hasta el 90%) cuando el choque osmótico del descongelado en presencia de Dextrano40 se realizó por dilución 1:1 frente a una dilución 1:10. La osmolaridad es un valor aditivo y la dilución en un medio isotónico reduce la osmolaridad del descongelado proporcionalmente a la extensión de la dilución, en consecuencia cuanto mayor sea la dilución del descongelado en un medio isotónico, mayor será el choque osmótico.

Este es un factor importante para la utilización de la técnica de cultivo clonogénico como control de calidad del descongelado. Los ensayos CFU sí han demostrado correlación con la capacidad de implante y es una buena medida del estado funcional de las células progenitoras^{137,138} siempre que se emplee, tal y como sugieren nuestros resultados, sin manipulaciones que modifiquen negativamente el estado de las células. Para evitar este tipo de artefactos, recomendamos la siembra directa de las muestras descongeladas en el medio de cultivo, metilcelulosa, que actuaría como un agente de control de choque osmótico o una etapa de equilibrio osmótico previa.

Por otra parte, la etapa de equilibrio osmótico antes de la determinación citométrica resultó en un aumento del 30% - 50% de la viabilidad de células CD3+ en SCU y CPH-A seguramente porque previno el choque osmótico inducido por la etapa de lisis de eritrocitos (soluciones hiperosmolares).

Cuando determinamos la recuperación de CPH vivas en muestras descongeladas mediante CMF con o sin etapa de equilibrio en un estudio pareado, obtuvimos recuperaciones medias del 90% y 60% respectivamente tanto para SCU como para CPH-A. En estos ensayos, independientemente del protocolo de CMF utilizado (con o sin etapa de equilibrio), el número total de células CD34+ entre muestras pareadas no variaba mientras que la viabilidad celular fue el parámetro más afectado en los análisis realizados sin etapa de equilibrio, sugiriendo que el choque osmótico fue el único responsable de la disminución de progenitores CD34+ vivos.

Resumiendo, para la prevención del choque osmótico postdescongelación se deben tener en cuenta la presencia de proteína y/o Dextrano40 en el medio de dilución y el cambio paulatino de osmolaridad. La aplicación directa de los protocolos de CMF para muestras precongelación rendirá falsos negativos de viabilidad en muestras descongeladas afectando la recuperación de CPH si no se previene el choque osmótico producido con los medios hipotónicos que rutinariamente se emplean en esta técnica. Recomendamos, por tanto, que antes de la determinación citométrica de muestras descongeladas, estas sean equilibradas osmóticamente mediante la dilución volumen:volumen en una solución de Dextrano-Albúmina ¹³⁹. Esta etapa de equilibrio se realiza a 4°C durante cinco minutos y es de destacar que, en nuestra experiencia, el aumento del tiempo de equilibrio no afectó significativamente los resultados de recuperación celular.

La técnica de determinación citométrica propuesta en este trabajo para el análisis de productos hematopoyéticos descongelados se basa principalmente en este paso de equilibrio y ofrece una elevada reproducibilidad para todos los parámetros ensayados, recuento de células CD34+, recuento de células CD45+ y viabilidad 7AAD, con un coeficiente de variación entre el 5% – 6% y ninguna otra variación respecto a la técnica utilizada con muestras en fresco, lo que facilita su aplicación a cualquier laboratorio de control de calidad de productos hematopoyéticos.

La siguiente pregunta lógica respecto al choque osmótico es si la entrada en el torrente circulatorio de los injertos descongelados, asociada a un cambio brusco de osmolaridad, afecta a la viabilidad celular. En realidad este es un tema sin resolver de forma empírica, seguramente, por la complejidad de estudio de los procesos implicados: la dinámica de fluidos (para tratar el impacto de la unión de dos soluciones con distintas viscosidades), el cálculo de la extensión del choque osmótico en plasma, etc...No obstante, hemos ensayado lo que le sucede a las células descongeladas en el momento de la infusión mediante el estudio de la dilución directa en medios isotónicos de muestras descongeladas. Rubinstein¹³⁹ utilizó esta aproximación y reportó una disminución de viabilidad del 20% - 30% cuando las muestras de SCU descongeladas fueron diluidas 1/20 en plasma autólogo.

Si consideramos la volémia de un adulto como el 6% - 7% de su peso corporal y la de un niño como de unos 100mL de sangre por kg de peso, obtenemos que para un adulto de 70kg y un niño de 20 Kg, la volémia total es de 5 L y de 2 L respectivamente. Si el volumen medio de cada aféresis infundida es de 250 mL y el de cada unidad de SCU de 25mL, la dilución total de estos productos (CPH-A en adultos y SCU en niños) será de 1/20 en adultos y 1/80 en niños respectivamente. Aunque nosotros ensayamos únicamente diluciones 1/10, observamos una pérdida de un 30% en el conjunto de células CD34+ vivas y una reducción del 20% en la viabilidad celular al diluir las células descongeladas en medios isotónicos, similares a los reportados por Rubinstein, que unido a la observación de que el choque osmótico depende de la extensión de este, sugiere que la infusión directa de un producto hematopoyético descongelado puede afectar negativamente a las CPH y por extensión a la capacidad de implante.

Experimentalmente, el estado de las células descongeladas después de someterse a una dilución directa en medio isotónico mejoró significativamente mediante la aplicación de una etapa de equilibrio osmótico previa de cinco minutos a 4°C en un medio hiperosmolar de Dextrano40-Albúmina. El recuento celular y la viabilidad de muestras equilibradas osmóticamente se vieron inalterados al someterlas a un cambio brusco de osmolaridad mientras que muestras pareadas que no fueron equilibradas previamente disminuyeron dramáticamente su viabilidad. Estos resultados sugieren que la estabilidad osmótica de los productos hematopoyéticos tras descongelación podría resultar en una disminución de la pérdida de progenitores durante la infusión y, potencialmente, en una mejora de los resultados clínicos de recuperación hematológica.

El otro gran tema que afecta a la infusión directa de los productos hematopoyéticos descongelados son los síntomas asociados a la infusión de DMSO. La infusión directa al paciente de CPH descongeladas es la técnica más utilizada en el TPH por la baja probabilidad de contaminación, la ausencia de costes adicionales, ahorro de tiempo y menor riesgo de pérdida de progenitores asociados a las manipulaciones del descongelado. No obstante, esta práctica clínica implica no solo la infusión de DMSO, sino también de restos celulares y hemoglobina libre al paciente. Estos factores parecen ser los responsables de la toxicidad asociada al TPH reportada en muchos pacientes ^{100,101,104,140,141}.

Algunas de estas complicaciones pueden estar relacionadas con la liberación de histamina inducida por DMSO ¹⁰⁰, por ejemplo se ha reportado que la ruborización, los dolores abdominales y la sensación de dificultad respiratoria se pueden atribuir a este mediador ¹⁰⁸. La premedicación con antihistamínicos no ha sido efectiva en muchos casos para eliminar estos síntomas a la vez que otras complicaciones más serias como bloqueos cardíacos y toxicidad neurológica han sido asociadas a la infusión. Por tanto, la toxicidad asociada al trasplante podría ser multifactorial y la eliminación del DMSO y los restos celulares podrían disminuir la morbilidad durante y después de la infusión. Por último, no se puede despreciar el hecho de que una toxicidad aguda durante la infusión pueda afectar la tolerancia de un paciente a trasplantes posteriores.

La toxicidad del DMSO durante la infusión es dosis dependiente ^{100,101}, en general se acepta un límite de 1g de crioprotector por kg de peso de paciente en cada infusión como un umbral máximo de toxicidad. Por tanto, el impacto de la infusión de productos de CPH-A o de una unidad de SCU será diferente debido a la diferencia de volumen en estos productos (el DMSO representa el 10% v/v). En este sentido, nuestros resultados de cuantificación de DMSO por HPLC en productos hematopoyéticos descongelados mostraron que una unidad de SCU (considerando un volumen de 25 mL) contendría una media de 2.95 g de DMSO, mientras que una bolsa de aféresis (considerando un volumen de 140 mL) presentaría una media de 18.2 g de DMSO.

Si consideramos un paciente pediátrico trasplantado con una unidad de SCU, lo más habitual, el umbral aceptado de toxicidad de DMSO solo se superaría con pacientes de menos de 3 kg de peso mientras que en el caso de un adulto trasplantado con 3 bolsas de CPH-A, ese umbral de toxicidad se superaría con cualquier paciente de menos de 54 kg.

Por tanto, la eliminación del DMSO representaría para las unidades de SCU una optimización del estado celular a lo largo del tiempo así como una medida para estabilizar osmóticamente el injerto antes de su infusión. En el caso de un trasplante de CPH-A, la eliminación del DMSO sería beneficioso por estas razones y adicionalmente podría reducir o eliminar la toxicidad asociada al TPH en pacientes en los que se supera el límite de toxicidad sin necesidad de recurrir a la infusión en días consecutivos.

La eliminación del DMSO para mejorar la infusión de progenitores criopreservados no es una nueva estrategia ^{123,142} para reducir la toxicidad del TPH. Se han propuesto diversas técnicas que van desde la utilización de menos DMSO en la mezcla de congelación, la congelación de productos altamente concentrados, la selección celular precongela, hasta el lavado manual del producto descongelado ^{117,118,122}. Estos métodos han resultado en una eliminación insuficiente del crioprotector como para abolir la morbilidad asociada a su infusión y poco o nada eficientes en lo que se refiere a la eliminación de restos celulares.

La evaluación preclínica de dos sistemas automáticos de lavado (SEPAX, CYTOMATE) de productos hematopoyéticos descongelados mostró, de forma reproducible, una eliminación del 98% del DMSO sin contaminación microbiológica y una pérdida de progenitores y de capacidad clonogénica irrelevantes después del proceso. Adicionalmente, como estos procesadores celulares funcionan en sistemas cerrados, una potencial pérdida celular podría haber sido revertida mediante la recuperación de la bolsa de deshecho que hubiera sido procesada de nuevo sin necesidad de salir del sistema cerrado. Nuestros protocolos de lavado incluyeron una etapa de equilibrio osmótico en solución Dextrano40-Albúmina que permitió la realización de los controles de calidad sin el artefacto experimental que representa el choque osmótico en estas manipulaciones.

Otros autores ^{108,143} han publicado resultados con estos mismos procesadores celulares pero las recuperaciones de células progenitoras y de capacidad clonogénica, del orden del 70%, fueron sensiblemente menores que las reportadas en nuestros ensayos (98%). Una explicación sería el posible choque osmótico producido durante el lavado celular porque estos autores no equilibraron osmóticamente las muestras descongeladas antes de diluirlas directamente en medios isotónicos. Además, la viabilidad celular de las muestras utilizadas en estos trabajos fue menor (70%) que la reportada por nuestro grupo (88%), pudiendo afectar por tanto al devenir del proceso de lavado.

La aproximación del lavado celular, comparada con la práctica de infusión directa del descongelado, consume tiempo y reactivos. Los procesos de lavado reportados consumieron una media de 30 minutos por bolsa de aféresis y por cada unidad de SCU procesada. Sin embargo, si su utilización se traduce en menos reacciones adversas asociadas a la infusión y menos carga de trabajo para el equipo médico, esta técnica podría ser utilizada de forma rutinaria en el TPH de productos criopreservados. Adicionalmente, como el producto resultante del lavado celular se encuentra en una osmolaridad plasmática, esta técnica podría presentar una ventaja adicional en la recuperación hematológica si, como los ensayos *in vitro* indican, la infusión directa del descongelado disminuye la viabilidad de las células infundidas.

Respecto a si la presencia de DMSO afecta a la velocidad de implante se han publicado estudios clínicos con SCU¹⁴² y CPH-A¹¹⁹. En este sentido, el estudio con SCU se basó en TPH a adultos y las dosis de progenitores fueron subóptimas, menos de 10^5 CD34+ /kg, por lo que la conclusión de que el lavado del crioprotector no mejora a la velocidad de injerto debería tomarse con precaución porque los resultados de tiempo de implante en este ensayo podrían haber estado influenciados por las bajas dosis infundidas. En el estudio clínico con CPH-A se comparó la velocidad de injerto con productos que se diferenciaban en el contenido en DMSO, 50% de diferencia, y se reportó una temprana recuperación en el recuento de neutrófilos en el grupo con menos crioprotector. Sin duda, serán necesarios más estudios para definir mejor el papel del lavado del DMSO en los resultados clínicos del TPH.

En resumen, el lavado de DMSO y la estabilización osmótica de los productos hematopoyéticos antes de la infusión preservan mejor el estado de las células progenitoras a lo largo del tiempo, facilitan la realización de los controles de calidad del injerto por CMF, pueden reducir los efectos tóxicos de la infusión del crioprotector y restos celulares y evita el choque osmótico asociado a la infusión, mejorando potencialmente, la recuperación hematológica del paciente.

CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES

1.

El choque osmótico producido por la dilución en medio isotónico de productos hematopoyéticos descongelados disminuye las recuperaciones celulares dependiendo de la técnica de análisis utilizada. Así, mientras que la recuperación celular calculada con valores de contador automático se sitúa en el 90%, la CMF rinde valores de recuperación inferiores al 60% para células CD34+ vivas.

2.

La disminución de la viabilidad celular, ensayada por métodos de análisis de integridad de membrana, es el factor principal de la disminución de recuperación celular postdescongelación. En especial para la CMF como método analítico donde el cambio brusco de osmolaridad causado por las soluciones hipoosmolares de lisis rinde viabilidades celulares del 50-60%.

3.

La adición de proteína y Dextrano 40 a los medios de dilución de un producto hematopoyético descongelado aumenta en un 20% la recuperación de CNT, células CD3+ y células CD34+ vivas. Sin embargo no tiene ningún efecto beneficioso en la recuperación de colonias clonogénicas, sugiriendo que el control del flujo de agua a las células es necesario pero no suficiente para evitar el fenómeno de choque osmótico.

4.

La estabilización osmótica en solución Dextrano-Albúmina previene el choque osmótico producido tanto por la dilución directa del descongelado en medio isotónico como por el uso de soluciones de lisis en los protocolos de CMF. La simple introducción de una etapa de equilibrio osmótico postdescongelación aumentó la recuperación celular de CPH (40%), su viabilidad (15%) y la capacidad clonogénica *in vitro* (40%) respecto a los QC realizados sin esta etapa.

5.

La técnica citométrica propuesta para el análisis de productos hematopoyéticos descongelados se basa en la aplicación de una etapa de equilibrio osmótico postdescongelación, muestra una alta reproducibilidad ($R=0.98$), un c.v. del 5% y un aumento del 30% en la recuperación de células CD34+ vivas respecto a la técnica de CMF estándar utilizada precongelación.

6.

La presencia de DMSO en productos hematopoyéticos es deletérea para la conservación de los injertos descongelados. Disminuye el recuento de células CD34+ vivas en un 50% y la recuperación clonogénica en un 60% dos horas post descongelación aún cuando las células se conservan a 4°C. El lavado de DMSO prolonga, por tanto, la estabilidad *ex vivo* de la muestra descongelada.

7.

Los sistemas automáticos de lavado de DMSO, SEPAX y CYTOMATE son efectivos para uso clínico en términos de recuperación celular, recuperación de colonias clonogénicas y seguridad microbiológica. Adicionalmente, la eliminación de DMSO con estos sistemas es del 98% y el producto resultante muestra un valor de osmolaridad similar a la del plasma que prevendría un posible choque osmótico durante la infusión del producto descongelado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

BIBLIOGRAFIA

1. Russell NH, Gratwohl A, Schmitz N. Developments in allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation. *Br J Haematol* 1998;103(3):594-600.
2. Terstappen LW, Safford M, Unterhalt M, et al. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia: IV. Comparison to the differentiation pathway of normal hematopoietic progenitor cells. *Leukemia* 1992;6(10):993-1000.
3. Martín-Henao G. Modulación de la expresión de CD7 y L-Seectina en células CD34+ purificadas de los pacientes con leucemia mieloide crónica Departament de Medicina. Barcelona: UAB, 2000:93.
4. Verfaillie CH, R. Benz, EJ. Shattil, SJ. Furie, B. Cohen, HJ. Silberstein, LE. McGlave, P. *Anatomy and Physiology of hematopoyesis. Hematology. Basic Principles and Practice.* 3rd ed: Ed. Philadelphia, 2000.
5. Simmons PJ, Levesque JP, Zannettino AC. Adhesion molecules in haemopoiesis. *Baillieres Clin Haematol* 1997;10(3):485-505.
6. Simmons PJ, Zannettino A, Gronthos S, Leavesley D. Potential adhesion mechanisms for localisation of haemopoietic progenitors to bone marrow stroma. *Leuk Lymphoma* 1994;12(5-6):353-63.
7. Hurley RW, McCarthy JB, Verfaillie CM. Direct adhesion to bone marrow stroma via fibronectin receptors inhibits hematopoietic progenitor proliferation. *J Clin Invest* 1995;96(1):511-9.
8. Levesque JP, Haylock DN, Simmons PJ. Cytokine regulation of proliferation and cell adhesion are correlated events in human CD34+ hemopoietic progenitors. *Blood* 1996;88(4):1168-76.
9. Carreras EB, S. Rovira, M. Sierra, J. Urbano-Ispizua, A. *Manual de Trasplante hematopoyético.* 1st ed. Barcelona: Ed. Antares, 1998.
10. Fagundo JD, E. Pavón, V. Cortina, L. *Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas: tipos, fuentes e indicaciones.* *Revista Cubana Hematología.* 2004;20(2).
11. IBMTR/ABMTR. Summary Slides. www.ibmtr.org/summaryslidset1_files 2005;2005(

12. ONT. Actividad de TPH. España 2003. www.ont.es/esp/estadisticas/f_estadisticas.htm 2003.
13. Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW, Stevens CE. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood* 1993;81(7):1679-90.
14. Rebullá P. Cord blood banking 2002: 112,010 of 7,914,773 chances. *Transfusion* 2002;42(10):1246-8.
15. Cairo MS, Wagner JE. Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Blood* 1997;90(12):4665-78.
16. Forkner C. *Leukemia and allied disorders*. NY: Mcmillan, 1938.
17. Osgood E. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report. *Ann Intern Med* 1939;13(357).
18. Jacobson L. Role of the spleen in radiation injury. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1949;70(7440).
19. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951;12(1):197-201.
20. Lorenz E, Congdon CC. Modification of lethal irradiation injury in mice by injection of homologous or heterologous bone. *J Natl Cancer Inst* 1954;14(4):955-65.
21. Miescher P, Fauconnet M. [Antigenic components of the polynuclear leukocyte and their clinical importance.]. *Schweiz Med Wochenschr* 1954;84(36):1036-8.
22. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies.]. *Acta Haematol* 1958;20(1-4):156-66.
23. Dausset J, Rapaport FT, Legrand L, et al. [Studies on transplantation antigens (HL-A) by means of skin grafts from 90 children onto their fathers]. *Nouv Rev Fr Hematol* 1969;9(2):215-29.
24. Thomas ED, Sr. Stem cell transplantation: past, present and future. *Stem Cells* 1994;12(6):539-44.
25. Thomas ED. Bone marrow transplantation: past, present and future. *Rev Invest Clin* 1994;Suppl(5-6).

26. Thomas ED, Storb R, Clift RA, et al. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med* 1975;292(17):895-902.
27. Thomas E, Storb R, Clift RA, et al. Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N Engl J Med* 1975;292(16):832-43.
28. Santos GW, Owens AH, Jr. Allogeneic marrow transplants in cyclophosphamide treated mice. *Transplant Proc* 1969;1(1):44-6.
29. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957;257(11):491-6.
30. Bach FH, Albertini RJ, Joo P, et al. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 1968;2(7583):1364-6.
31. De Koning J, Van Bekkum DW, Dicke KA, et al. Transplantation of bone-marrow cells and fetal thymus in an infant with lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1969;1(7608):1223-7.
32. Kurnick NB, Montano A, Gerdes JC, Feder BH. Preliminary observations on the treatment of postirradiation hematopoietic depression in man by the infusion of stored autogenous bone marrow. *Ann Intern Med* 1958;49(5):973-86.
33. Mc GJ, Jr., Russell PS, Atkins L, Webster EW. Treatment of terminal leukemic relapse by total-body irradiation and intravenous infusion of stored autologous bone marrow obtained during remission. *N Engl J Med* 1959;260(14):675-83.
34. Appelbaum FR, Herzig GP, Ziegler JL, et al. Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood* 1978;52(1):85-95.
35. Goodman JW, Hodgson GS. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* 1962;19(702-14).
36. Korbling M, Burke P, Braine H, et al. Successful engraftment of blood derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 1981;9(6):684-90.
37. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 1997;337(6):373-81.

38. Bandini G, Bonifazi F, Baccharani M. 15 or 33 years of cord-blood transplantation? *Lancet* 2003;361(9368):1566-7.
39. Ende M, Ende N. Hematopoietic transplantation by means of fetal (cord) blood. A new method. *Va Med Mon (1918)* 1972;99(3):276-80.
40. Speck B, Zwaan FE, van Rood JJ, Eernisse JG. Allogeneic bone marrow transplantation in a patient with aplastic anemia using a phenotypically HL-A-identifcal unrelated donor. *Transplantation* 1973;16(1):24-8.
41. Carella AM, Champlin R, Slavin S, et al. Mini-allografts: ongoing trials in humans. *Bone Marrow Transplant* 2000;25(4):345-50.
42. Champlin R, Khouri I, Kornblau S, et al. Reinventing bone marrow transplantation: reducing toxicity using nonmyeloablative, preparative regimens and induction of graft-versus-malignancy. *Curr Opin Oncol* 1999;11(2):87-95.
43. Giralt S, Estey E, Albitar M, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997;89(12):4531-6.
44. Goldman JM, Schmitz N, Niethammer D, Gratwohl A. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe in 1998. Accreditation Sub-Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998;21(1):1-7.
45. Gratwohl A, Hermans J. Indications and donor source of hematopoietic stem cell transplants in Europe 1993: report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Clin Transplant* 1995;9(5):355-63.
46. Gratwohl A, Hermans J, Baldomero H. Hematopoietic precursor cell transplants in Europe: activity in 1994. Report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 1996;17(2):137-48.
47. Dupont B. Immunology of hematopoietic stem cell transplantation: a brief review of its history. *Immunol Rev* 1997;157(5-12).
48. Snyder EH, NB. Hematopoietic Progenitor Stem Cells: A Primer for Medical Professionals: American Association of Blood Banks, 2000.

49. Waters TM, Bennett CL, Pajean TS, et al. Economic analyses of bone marrow and blood stem cell transplantation for leukemias and lymphoma: what do we know? *Bone Marrow Transplant* 1998;21(7):641-50.
50. Bensinger WI. Should we purge? *Bone Marrow Transplant* 1998;21(2):113-5.
51. Deeg HJ, Socie G. Malignancies after hematopoietic stem cell transplantation: many questions, some answers. *Blood* 1998;91(6):1833-44.
52. Moscardo F, Sanz GF, Sanz MA. Unrelated-donor cord blood transplantation for adult hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 2004;45(1):11-8.
53. Program NMD. National Marrow Donor Program. www.nmdp.org, 2000.
54. Barker JN, Krepski TP, DeFor TE, et al. Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8(5):257-60.
55. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(9):4109-13.
56. Carow CE, Hangoc G, Broxmeyer HE. Human multipotential progenitor cells (CFU-GEMM) have extensive replating capacity for secondary CFU-GEMM: an effect enhanced by cord blood plasma. *Blood* 1993;81(4):942-9.
57. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 1996;335(3):157-66.
58. Rocha V, Wagner JE, Jr., Sobocinski KA, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med* 2000;342(25):1846-54.
59. Sanz GF, Saavedra S, Planelles D, et al. Standardized, unrelated donor cord blood transplantation in adults with hematologic malignancies. *Blood* 2001;98(8):2332-8.

-
60. Rocha V, Cornish J, Sievers EL, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001;97(10):2962-71.
 61. Apperley JC, E. Gluckman, E. Gratwohl, A. Masszi, T. Haemopoietic Stem Cell Transplantation. *The EMBT Handbook*. In: ESH, ed. Haemopoietic Stem Cell Transplantation. *The EMBT Handbook*: ESH, 2004.
 62. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972;175(23):720-31.
 63. Alberts BJ, L. Julian, R. Martin, R. Keith, W. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed: New York and London: Garland Publishing, 2002.
 64. Lotan RN, GL. *Advanced Cell Biology*. NY: Ed Van Nostrand, 1981.
 65. Darnell JL, H; Berk, A; Zipursky, S. L; Matsudaira, P; Baltimore, D;. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. NY: W H Freeman & Co, 1999.
 66. Hays LM, Crowe JH, Wolkers W, Rudenko S. Factors affecting leakage of trapped solutes from phospholipid vesicles during thermotropic phase transitions. *Cryobiology* 2001;42(2):88-102.
 67. Clerc SG, Thompson TE. Permeability of dimyristoyl phosphatidylcholine/dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer membranes with coexisting gel and liquid-crystalline phases. *Biophys J* 1995;68(6):2333-41.
 68. Steponkus P. *Effects of low temperatures on biological membranes*: Academia Press. NY, 1993.
 69. Mendoza JA, Dulin P, Warren T. The lower hydrolysis of ATP by the stress protein GroEL is a major factor responsible for the diminished chaperonin activity at low temperature. *Cryobiology* 2000;41(4):319-23.
 70. Steponkus P. *Advances in low temperature biology*: Ed. Jai press, 1993.
 71. Boiso I. *Criobiologia*. *Revista iberoamericana de fertilidad* 2001;18(4).
 72. Harris DT. Experience in autologous and allogeneic cord blood banking. *J Hematother* 1996;5(2):123-8.

73. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 1997;89(7):2233-58.
74. Thomas ED. A history of haemopoietic cell transplantation. *Br J Haematol* 1999;105(2):330-9.
75. Keung YK, Cobos E, Morgan D, et al. High cellular concentration of peripheral blood progenitor cells during cryopreservation adversely affects CFU-GM but not hematopoietic recovery. *J Hematother* 1996;5(1):73-7.
76. Rowley SD, Bensinger WI, Gooley TA, Buckner CD. Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. *Blood* 1994;83(9):2731-6.
77. Cabezudo E, Dalmases C, Ruz M, et al. Leukapheresis components may be cryopreserved at high cell concentrations without additional loss of HPC function. *Transfusion* 2000;40(10):1223-7.
78. Wolstenholme GOC, M. *The Frozen Cell*. London: Ciba Foundation. Ed. Churchill, 1970.
79. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 1977;14(3):251-72.
80. McGee HM, WJ. *Cryochemistry*. *Cryonics* 1962;2(1-11).
81. Mazur P. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol* 1963;47(347-69).
82. Nei T. Structure and function of frozen cells: freezing patterns and post-thaw survival. *J Microsc* 1978;112(2):197-204.
83. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984;247(3 Pt 1):C125-42.
84. Lovelock JE. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 1953;10(3):414-26.
85. Karow AM, Jr., Webb WR. Tissue freezing. A theory for injury and survival. *Cryobiology* 1965;2(3):99-108.

86. Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res* 1972;71(2):345-55.
87. Meryman HT. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology* 1971;8(5):489-500.
88. Meryman HT. Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. *Nature* 1968;218(139):333-6.
89. García JV, L. Criopreservadores: concepto y manejo. *Biol Clin Hematol* 1984;6(219).
90. Elliot CJ, Samson DM, Kanfer EJ. Quality assurance in the irradiation of blood products. *Bone Marrow Transplant* 1994;14(3):494.
91. Willhite CC, Katz PI. Toxicology updates. Dimethyl sulfoxide. *J Appl Toxicol* 1984;4(3):155-60.
92. Galmes A, Besalduch J, Bargay J, et al. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide at -80 degrees C without rate-controlled freezing. *Transfusion* 1996;36(9):794-7.
93. Stiff PJ, Murgu AJ, Zaroulis CG, et al. Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch. *Cryobiology* 1983;20(1):17-24.
94. Takaue Y, Abe T, Kawano Y, et al. Comparative analysis of engraftment after cryopreservation of peripheral blood stem cell autografts by controlled- versus uncontrolled-rate methods. *Bone Marrow Transplant* 1994;13(6):801-4.
95. Goldman JM, Th'ng KH, Park DS, et al. Collection, cryopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukaemia in blast-cell transformation. *Br J Haematol* 1978;40(2):185-95.
96. Douay L, Gorin NC, David R, 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(4):360-6.
97. Rowley SD, Anderson GL. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 1993;11(5):389-93.

98. Branch DR, Calderwood S, Cecutti MA, et al. Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity. *Transfusion* 1994;34(10):887-90.
99. Okamoto Y, Takaue Y, Saito S, et al. Toxicities associated with cryopreserved and thawed peripheral blood stem cell autografts in children with active cancer. *Transfusion* 1993;33(7):578-81.
100. Alessandrino P, Bernasconi P, Caldera D, et al. Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases. *Bone Marrow Transplant* 1999;23(6):533-7.
101. Lopez-Jimenez J, Cervero C, Munoz A, et al. Cardiovascular toxicities related to the infusion of cryopreserved grafts: results of a controlled study. *Bone Marrow Transplant* 1994;13(6):789-93.
102. Perseghin P, Balduzzi A, Bonanomi S, et al. Infusion-related side-effects in children undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2000;26(1):116-8.
103. Styler MJ, Topolsky DL, Crilley PA, et al. Transient high grade heart block following autologous bone marrow infusion. *Bone Marrow Transplant* 1992;10(5):435-8.
104. Keung YK, Lau S, Elkayam U, et al. Cardiac arrhythmia after infusion of cryopreserved stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1994;14(3):363-7.
105. Hertenstein B, Stefanic M, Schmeiser T, et al. Cardiac toxicity of bone marrow transplantation: predictive value of cardiologic evaluation before transplant. *J Clin Oncol* 1994;12(5):998-1004.
106. Dhodapkar M, Goldberg SL, Tefferi A, Gertz MA. Reversible encephalopathy after cryopreserved peripheral blood stem cell infusion. *Am J Hematol* 1994;45(2):187-8.
107. Bond GR, Curry SC, Dahl DW. Dimethylsulphoxide-induced encephalopathy. *Lancet* 1989;1(8647):1134-5.
108. Calmels B, Houze P, Hengesse JC, et al. 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(9):823-8.

109. Kessinger A, Armitage JO, Smith DM, et al. High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for patients with lymphoma. *Blood* 1989;74(4):1260-5.
110. Woods EJ, Liu J, Derrow CW, et al. Osmometric and permeability characteristics of human placental/umbilical cord blood CD34+ cells and their application to cryopreservation. *J Hematother Stem Cell Res* 2000;9(2):161-73.
111. Hunt CJ, Armitage SE, Pegg DE. Cryopreservation of umbilical cord blood: 1. Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity and permeability of CD34(+) cells to dimethyl sulphoxide. *Cryobiology* 2003;46(1):61-75.
112. Hunt CJ, Armitage SE, Pegg DE. Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34(+) cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing. *Cryobiology* 2003;46(1):76-87.
113. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 1970;168(934):939-49.
114. Therapy FftaoHC. Standards for hematopoietic progenitor cell collection, processing and transplantation. 1st ed: Ed.Ohama,NE, 1996.
115. AuBucho JS, RA. Marrow transplantation: Practical and technical aspects of stem cell reconstitution: American Association of Blood Banks, 1992.
116. Mavroudis D, Read E, Cottler-Fox M, et al. CD34+ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood* 1996;88(8):3223-9.
117. Abrahamsen JF, Bakken AM, Bruserud O. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5-percent rather than 10-percent DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34+ cells. *Transfusion* 2002;42(12):1573-80.
118. Bakken AM, Bruserud O, Abrahamsen JF. No differences in colony formation of peripheral blood stem cells frozen with 5% or 10% dimethyl sulfoxide. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12(3):351-8.
119. Rowley SD, Feng Z, Chen L, et al. A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch. *Bone Marrow Transplant* 2003;31(11):1043-51.

120. Martino M, Morabito F, Messina G, et al. Fractionated infusions of cryopreserved stem cells may prevent DMSO-induced major cardiac complications in graft recipients. *Haematologica* 1996;81(1):59-61.
121. Shpall EJ, LeMaistre CF, Holland K, et al. A prospective randomized trial of buffy coat versus CD34-selected autologous bone marrow support in high-risk breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *Blood* 1997;90(11):4313-20.
122. Ayello J, Hesdorffer C, Reiss RF. A semiautomated technique for volume reduction of stem cell suspensions for autotransplantation. *J Hematother* 1995;4(6):545-9.
123. Del Mastro L, Venturini M, Viscoli C, et al. Intensified chemotherapy supported by DMSO-free peripheral blood progenitor cells in breast cancer patients. *Ann Oncol* 2001;12(4):505-8.
124. Beaujean F, Hartmann O, Kuentz M, et al. A simple, efficient washing procedure for cryopreserved human hematopoietic stem cells prior to reinfusion. *Bone Marrow Transplant* 1991;8(4):291-4.
125. Van Putten L. The effectiveness of different freeze storage techniques for mouse-bone marrow cell-suspensions. *Am NY Acad Sci* 1964;114(695-700).
126. Van haute I, Lootens N, De Smet S, et al. Viable CD34+ stem cell content of a cord blood graft: which measurement performed before transplantation is most representative? *Transfusion* 2004;44(4):547-54.
127. Goodwin HS, Grunzinger LM, Regan DM, et al. Long term cryostorage of UC blood units: ability of the integral segment to confirm both identity and hematopoietic potential. *Cytotherapy* 2003;5(1):80-6.
128. Humpe A, Riggert J, Vehmeyer K, et al. Comparison of CD34+ cell numbers and colony growth before and after cryopreservation of peripheral blood progenitor and stem cell harvests: influence of prior chemotherapy. *Transfusion* 1997;37(10):1050-7.
129. Yang H, Acker JP, Cabuhat M, McGann LE. Effects of incubation temperature and time after thawing on viability assessment of peripheral hematopoietic progenitor cells cryopreserved for transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003;32(10):1021-6.
130. McKenna DM, J. Clinical utility of the clonogenic assay in the quality control of UCB units for transplant. In: ISCT, ed. 10th annual ISCT conference. Dublin, 2004:71.

131. Rock G, Chin-Yee I, Cantin G, et al. Quality assurance of progenitor cell content of apheresis products: a comparison of clonogenic assays and CD34+ enumeration. *The Canadian Apheresis Group and Canadian Bone Marrow. Transfus Med* 2000;10(1):67-75.
132. Allan DS, Keeney M, Howson-Jan K, et al. Number of viable CD34(+) cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002;29(12):967-72.
133. Syme R, Bewick M, Stewart D, et al. The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: on hematologic recovery, side effects, and toxicity. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10(2):135-41.
134. Katayama Y, Yano T, Bessho A, et al. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1997;19(3):283-7.
135. Holt WV, North RD. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol Reprod* 1994;51(3):414-24.
136. Wessel MT, Ball BA. Step-wise dilution for removal of glycerol from fresh and cryopreserved equine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2004;84(1-2):147-56.
137. Rowley SD, Zuehlsdorf M, Braine HG, et al. CFU-GM content of bone marrow graft correlates with time to hematologic reconstitution following autologous bone marrow transplantation with 4-hydroperoxycyclophosphamide-purged bone marrow. *Blood* 1987;70(1):271-5.
138. Bishop MR, Anderson JR, Jackson JD, et al. High-dose therapy and peripheral blood progenitor cell transplantation: effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the autograft. *Blood* 1994;83(2):610-6.
139. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(22):10119-22.
140. Stroncek DF, Fautsch SK, Lasky LC, et al. Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow. *Transfusion* 1991;31(6):521-6.

141. Davis JM, Rowley SD, Braine HG, et al. Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. *Blood* 1990;75(3):781-6.
142. Nagamura-Inoue T, Shioya M, Sugo M, et al. Wash-out of DMSO does not improve the speed of engraftment of cord blood transplantation: follow-up of 46 adult patients with units shipped from a single cord blood bank. *Transfusion* 2003;43(9):1285-95.
143. Perotti CG, Del Fante C, Viarengo G, et al. A new automated cell washer device for thawed cord blood units. *Transfusion* 2004;44(6):900-6.