

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

TESE DE DOUTORADO

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO E COMBINAÇÃO DE CRIOPROTETORES NA
VIABILIDADE MEDIDA POR CITOMETRIA DE FLUXO DAS CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS CONGELADAS EM FREEZER MECÂNICO.**

Gustavo Brandão Fischer

Porto Alegre

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO E COMBINAÇÃO DE CRIOPROTETORES NA
VIABILIDADE MEDIDA POR CITOMETRIA DE FLUXO DAS CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS CONGELADAS EM FREEZER MECÂNICO.**

Gustavo Brandão Fischer

Orientador (a):

Professora Doutora Maria Lúcia Scroferneker

**Tese submetida para obtenção do Grau
de Doutor em Medicina: Ciências
Médicas**

Porto Alegre, RS

Junho de 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Brandão Fischer, Gustavo

Efeito da Concentração e Combinação de Crioprotetores na Viabilidade Medida por Citometria de Fluxo das Células Tronco Hematopoiéticas Congeladas em Freezer Mecânico / Gustavo Brandão Fischer. -- 2014.
169 f.

Orientador: Maria Lúcia Scroferneker.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Transplante Alogênico de Medulas Óssea. 2. Criobiologia. 3. Citocinas. 4. Criopreservação. 5. Viabilidade Celular. I. Scroferneker, Maria Lúcia, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Com o mais sincero sentimento, agradeço a todas as pessoas que ao longo desses quatro anos, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho. Sem a sua ajuda, essa tese não seria possível. Agradeço, da mesma forma, às pessoas que aqui não foram citadas mas que tiveram igual importância na elaboração da tese.

- Profa. Dra. Maria Lúcia Scroferneker, pela orientação e sabedoria na resolução das dificuldades técnicas do doutorado;

- Liane Rhosig e equipe do Banco de Cordão e Terapia Celular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pela manipulação das amostras, o seu congelamento e por muitas críticas construtivas ao longo da tese;

- Dra. Ana Paula Alegretti e equipe de profissionais do Laboratório de Diagnóstico Personalizado do HCPA, pela realização das citometrias de fluxo e valiosa orientação nos princípios da imunofenotipagem por citometria de fluxo;

- Bianca Pfaffenseller, Doutoranda do PPG de Bioquímica da UFRGS pela realização da dosagem de citocinas inflamatórias;

- Dr. Dário Brum, diretor técnico do Banco de Sangue do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre pela obtenção das amostras daquela instituição

- À UFRGS pela oportunidade de aprendizado e FIPE pelo apoio financeiro à minha pesquisa

"As convicções são inimigas mais perigosas da verdade do que as mentiras"

"O medo é o pai da moralidade"

Friedrich Nietzsche

RESUMO

O Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) baseia-se no princípio de infusão de Células Tronco Hematopoiéticas (CTH) CD34 + num receptor condicionado. Sabe-se que tais células são capazes de gerar uma nova hematopoiese bem como que o benefício do aumento de dose de CD34 + estende-se de aproximadamente 2×10^6 CD34/Kg a 5×10^6 CD34/Kg do receptor. A determinação do número de CD34 baseia-se no número total de CD34, porém sabe-se que apenas uma pequena porção celular do grupo de CD34 está associada à recuperação medular. Uma maneira de refinar a detecção desse grupo de células quando comparado com a quantificação do CD34 total, é a análise citométrica dos padrões de tamanho e granularidade citoplasmática.

No contexto do TCTH autólogo e algumas vezes no TCTH alogênico, onde a infusão das células precursoras é feita com intervalo superior a três dias após a sua coleta, o congelamento das CTH CD34 +as faz-se necessário para que as células permaneçam viáveis. O agente crioprotetor mais comumente usado é o Dimetilsulfóxido (DMSO), que em temperaturas extremamente baixas protege as CTH da morte celular, porém em temperatura ambiente torna-se tóxico. As reações adversas do receptor no momento da infusão são atribuídas, em geral, ao DMSO. Portanto existem diferentes protocolos de congelamento de CTH que usam diferentes concentrações desse agente, com o intuito de reduzir as reações adversas e, ao mesmo tempo, evitar a morte celular decorrente de temperaturas baixas. Alguns estudos concluem que a viabilidade das CTH congeladas pode ser mantida com concentrações baixas de DMSO ou com celularidade elevada nos produtos congelados. Além do DMSO, a albumina e o Hidroxetilamido (HES) são usados como adjuvantes na proteção celular ao frio. Alguns protocolos de criopreservação usam apenas o DMSO enquanto outros indicam a necessidade do uso dos três agentes juntos. Não há consenso a respeito do protocolo de criopreservação ideal. Um expressivo número de trabalhos sugere o uso do DMSO 5 a 10% juntamente com a albumina 20% e HES 6% em enxertos com celularidade até 3×10^8 células nucleadas/ml, porém existem sugestões de protocolos diferentes

desse padrão que usam o DMSO como agente único assim como concentrações menores de DMSO.

Com relação ao efeito tóxico do DMSO, os eventos adversos do paciente no momento da infusão são atribuídos diretamente a ele. Porém evidências recentes apontam outras possíveis causas: citocinas liberadas durante o período de armazenamento e infundidas com o enxerto e micro-agregados leucocitários decorrentes da elevada celularidade do enxerto.

O presente estudo pretendeu verificar a viabilidade das CTH através da medida da Anexina-V e 7-AAD pela técnica de citometria de fluxo usando-se diferentes concentrações de DMSO, bem como comparou tal desfecho entre amostras que foram congeladas apenas com DMSO e amostras congeladas com DMSO, HES e albumina. Além disso, foram verificados os níveis de citocinas inflamatórias nos enxertos e sua relação com a concentração de DMSO.

Palavras-Chave: Célula Tronco Hematopoiética; CD34 positiva; Citometria de Fluxo, Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas; Criobiologia; Viabilidade Celular; Citocinas.

ABSTRACT

Bone Marrow Transplantation (BMT) is based on the principle of hematopoietic CD34 stem cells infusion in a conditioned recipient. It is known that such cells are capable of generating a new hematopoiesis, as well as known that the benefit of the increase of CD34 dose is goes best when it is between from 2 and to 5 x 10⁶ CD34 by patient's body weight. The CD34 determination is based on the total CD34 number. However it is known that only a small portion of the CD34 population is related to the marrow repopulating capacity. An alternative way of detecting such cells when compared to total CD34 dose is the cytometric analysis of cytoplasmatic granularity and size patterns.

In the autologous BMT context and, sometimes in the allogeneic type where the graft infusion occurs more than three days after the graft harvest, the CD34 cells freezing is necessary to keep their viability. The crioprotective agent most commonly used is the DMSO, which at extremely low temperatures this agent protects the CD34 cells from dying. However at temperatures above 30°C it became toxic and causing adverse events in the patient receiving them. The adverse reactions at the infusion moment in general are linked to DMSO, thus there are some different cryopreservative protocols using different DMSO concentrations aiming to reduce the incidence of collateral damage and at the same time avoid the CD34 from dying at low temperatures. Some studies conclude that CD34 viability can be maintained with the use of high mononuclear cellularity in the graft or with low DMSO concentrations. Besides DMSO, albumin and Hydroxietilstarch (HES) are cryoprotectants adjuvants. Some Cryopreservation protocols only use DMSO as cryoprotective agent, while others indicate the three agents together. There is no consensus about the ideal cryopreservation protocol. An important number of studies suggests the use of DMSO 5 to 10% with albumin 20% and HES 6% in grafts with cellularity number of no more than 3 x 10⁸ cells/ml, however there are some new different protocols that use DMSO alone and at lower concentrations.

As to adverse events during the infusion moment, it is known that DMSO causes the effects. However, there are evidences that other causes could cause

these events: cytokines released during the storage freezing time and infused with the graft and leukocyte micro-clots caused by the high cellularity in the graft.

The present study aimed to study the viability of CD34 cells using the Annexin-V and 7-AAD apoptosis reagents through the flow cytometry technique in different DMSO concentrations as well as compared such outcome among the samples only frozen with DMSO and samples frozen with DMSO, HES and albumin. Besides, it was verified the inflammatory cytokine levels and their relationship with the DMSO concentration.

Key Words: Hematopoietic Stem Cell; CD34 positive; Flow Cytometry; Hematopoietic Stem Cell Transplantation; Cryobiology; Cellular Viability; Cytokines.

LISTA DE TABELAS

- Tabela Número 1 (Artigo 1): Mean viabilities and mean apoptosis rates in the fresh/control group, DMSO 5%, DMSO 2, 5%, DMSO 1, 25%.....124

- Tabela Número 2 (Artigo 1): Four possible outcomes (Viable HSC, Necrotic HSC, Necrotic/Apoptotic HSC and Apoptotic HSC) in HSC low and high complexity and their relationship with DMSO 5%, 2,5% and 1,25%.....124

- Tabela Número 1 (Artigo 2): Mean viabilities and mean apoptosis rates in the fresh/control group, DMSO 5% and DMSO 5% + Cryo.....140

- Tabela 2 (Artigo 2): Four possible outcomes (Viable HSC, necrotic HSC, necrotic/apoptotic HSC and apoptotic HSC) in the low complexity and high complexity HSC groups respectively and its relationship with DMSO 5% with and without the cryoprotective solution composed by HES 6% and Human albumin 20%.....140

- Tabela 1 (Artigo 3): Plasma concentrations in pg/ml of the more common inflammatory cytokines and its relationship with the DMSO concentrations of 5% and 2, 5%.....155

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 (Artigo 3): Inflammatory cytokines tested on BD CBA Human Inflammatory Cytokines Kit.....155

LISTA DE ABREVIATURAS

APO-2L.....	Proteína sinalizadora de apoptose
APO-3L.....	Proteína sinalizadora de apoptose
Bax.....	Família de proteínas anti-apoptóticas
BFU-E.....	Núcleo formador de colônia de eritrócitos
BFU-Meg.....	Núcleo formador de colônia de Megacariócitos
BRIGHT.....	Maior Densidade de CD34 na CF SSC/FSC
CCL5.....	Quimiocina para linfócitos T
CD34.....	Antígeno de superfície das CTH
CD133.....	Marcador de CTH primitiva (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CD110.....	Marcador de CTH primitiva
CD117high.....	Marcador de CTH primitiva
CD90 low.....	Marcador de CTH primitiva
CD45RA.....	Antígeno leucocitário de superfície com distribuição ampla

- CD71..... Antígeno de superfície da série eritróide
- CD95..... Molécula receptora do Fas
- CF..... Citometria de Fluxo
- CFU-GM..... Unidade Formadora de Colônias de Granulócitos e Macrófagos.
- CTH..... Células Tronco Hematopoiéticas
- DED..... Domínio de morte celular
- DIM..... Menor Densidade de CD34 na CF SSC/FSC
- DMSO..... Dimetilsulfóxido
- DNA..... .Ácido desoxiribonucléico
- EBMT..... Sociedade Européia de TCTH (*European Bone Marrow Transplantation Society*)
- Fas/ Fas-L..... Antígeno de superfície com função apoptótica e seu ligante
- FACS..... Seletor de células por fluorescência (*Fluorescence activator cell sorting*)

- FADD/Mort-1.....Sinalizador intracitoplasmático da via do Fas
- FDA..... Agência Nacional Americana de Alimentos e Medicamentos
(*Food and Drug Agency*)
- FITC.....Isocianato Fluoresceína (*Fluorescein Isocyanate*)
- FLASH..... Proteína pró-apoptótica envolvida com a via das caspases
- FLICE..... Molécula reguladora pró-caspase
- FLIP..... Proteína anti-apoptótica reguladora
- FSC.....Feixe de Luz frontal (*Forward Light Scatter*)
- G-CSF.....Fator de Crescimento de Granulócitos
- HES..... Hidroxietilamido
- HLA..... .Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leucocyte Antigen*)
- IFN..... Interferon
- IL-11..... Interleucina 11
- IL-12..... Interleucina 12
- IL-6..... Interleucina 6
- IL-1..... Interleucina 1

ISHAGE.....Sociedade Internacional de hemoterapia e engenharia de enxertos (*International Society of Hematotherapy and Graft Engineering*).

KDa..... Kilo Dalton

Lin neg..... CTH não-comprometida com a linhagem

L-Selectina..... Ligante para a Selectina

LTC-CFC..... Colônias de precursores cultivados de longo termo

MACH/MACH 5..... Componente do complexo de morte celular

NK..... Linfócitos citotóxicos naturais (*Natural Killers*)

PE..... Ficoeritrina (*Phycoeritrin*)

ProCOUNT..... Protocolo de Citometria de fluxo de Plataforma simples

RANTES..... Citocina da super-família da IL-8

Rhodamina-123..... Corante vital que se concentra na mitocôndria

RIP..... Subtipo de domínio de morte celular

Sca-1Pos..... Marcador de CTH primitiva

SIDA..... Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SSC..... Feixe de luz lateral (*Sideward Light Scatter*)

STELLer..... Protocolo de Citometria de fluxo de Plataforma simples

TCTH..... Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas

TdT..... Desoxinucleotidil Transferase Terminal

TGF-Beta..... Fator de crescimento transformador

Thy-1..... Antígeno de superfície de CTH primitiva

Thy-1dim..... Antígeno de superfície reagente fraco

TRAIL/APO..... Proteínas apoptóticas de linfócitos T humanos

TRADD..... Componente do receptor do Fator de Necrose Tumoral

TUNEL..... Método de detecção de apoptose

8G12..... Classe de anticorpo monoclonal anti-CD34

7-AAD..... 7- Aminoactinomicina D

SUMÁRIO

1. MARCO CONCEITUAL ESQUEMÁTICO.....	17
2. CHECKLIST CONSORT.....	18
3. ESTRATÉGIA DE BUSCA DE INFORMAÇÃO.....	19
4. JUSTIFICATIVA.....	20
5. INTRODUÇÃO.....	21
6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
6.1. CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (CTH).....	26
6.1.2. ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS CTH.....	31
6.1.3. CTH E RESULTADOS CLÍNICOS.....	32
6.2 DETECÇÃO DAS CTH POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	34
6.3 O TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (TCTH).....	39
6.3.1. CARACTERÍSTICAS DOS TCTH.....	39
6.3.2. DIFERENÇAS ENTRE TCTH AUTÓLOGO E ALOGÊNICO.....	39
6.3.3. FASES DO TCTH AUTÓLOGO.....	40
6.3.4. RECUPERAÇÃO HEMATOPOIÉTICA.....	41
6.4. CRIOBIOLOGIA.....	43
6.4.1. FISIOPATOLOGIA DA TOXICIDADE INDUZIDA PELAS BAIXAS TEMPERATURAS.....	44
6.4.2. CRIOPROTETORES.....	45
6.4.3. CONGELAMENTO E TEMPERATURA.....	49
6.4.4. CONCENTRAÇÃO CELULAR.....	51
6.5. APOPTOSE.....	54
6.5.1. INDUÇÃO DA APOPTOSE POR AGENTES FÍSICO-QUÍMICOS EXTERNOS.....	58

6.5.2. MÉTODOS DE DETECÇÃO DA APOPTOSE.....	58
6.6. CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO ENXERTO CRIOPRESERVADO.....	63

7. OBJETIVOS.....65

7.1. OBJETIVO GERAL.....66

7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....66

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS67

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....115

9.1. ARTIGO 1116

EFFECT OF THE LOW CONCENTRATION OF DMSO IN THE VIABILITY MEASURED BY FLOW CYTOMETRY OF THE HEMATOPOIETIC STEM CELLS STORED IN MECHANICAL FREEZER.

9.2. ARTIGO 2.....131

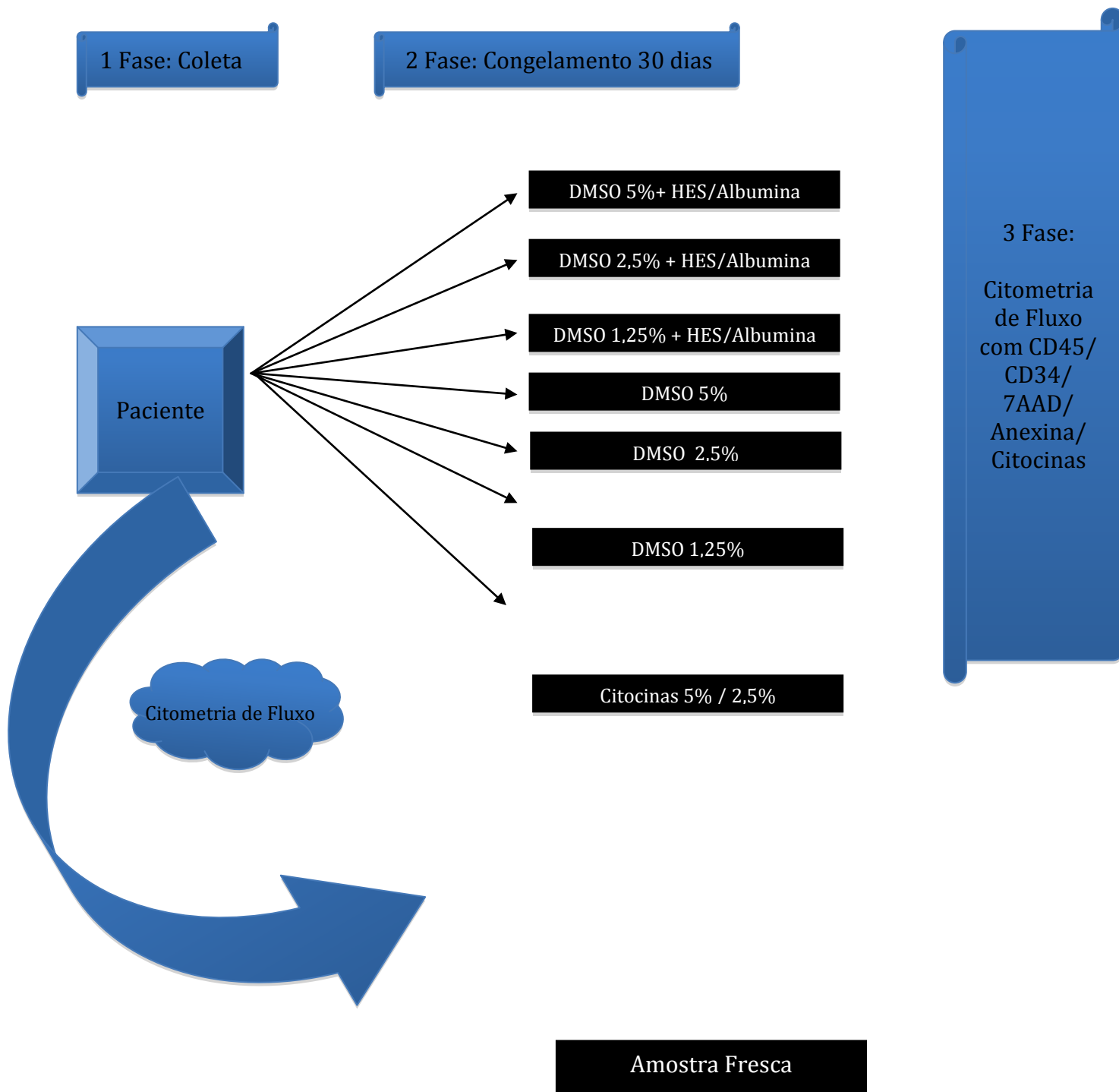
EFFECT OF A COMBINATION OF CRYOPROTECTOR AGENTS COMPARED TO DMSO AS A SOLE CRYOPROTECTIVE AGENT IN THE HEMATOPOIETIC STEM CELLS VIABILITY MEASURED BY FLOW CYTOMETRY OF THE HEMATOPOIETIC STEM CELLS STORED IN MECHANICAL FREEZER.

9.3. ARTIGO 3.....148

CORRELATION BETWEEN INFLAMMATORY CYTOKINE RELEASE AND HEMATOPOIETIC STEM CELL VIABILITY AFTER STORAGE IN A MECHANICAL FREEZER.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....162

MARCO CENCEITUAL ESQUEMÁTICO



CHECKLIST CONSORT 2010 PARA ESTUDOS EXPERIMENTAIS

- Título e Abstract conforme o modelo
- Background específico e revisão sistemática da literatura conforme o modelo
- Objetivos gerais e específicos conforme o modelo
- Design do estudo conforme o modelo
- Pacientes e critérios de inclusão conforme o modelo
- Locais onde o estudo foi realizado conforme o modelo
- Desfechos descritos conforme o modelo
- Tamanho da amostra calculado conforme o modelo
- Randomização: Não houve
- "Blinding" não houve
- Métodos estatísticos devidamente apresentados conforme o modelo
- Perdas de participantes do estudo apresentadas conforme o modelo
- Discussão: Apresentadas limitações do estudo, fontes de potencial bias, validade interna e externa, e interpretação consistente dos resultados
- Termos de consentimento e aprovação dos comitês de ética dos locais de pesquisa apresentados conforme o modelo
- Fontes de Financiamento apresentadas conforme o modelo

ESTRATÉGIA DE BUSCA DE INFORMAÇÃO

- A revisão sistemática da literatura foi realizada usando a ferramenta de busca bibliográfica End Note versão X7

- Com essa ferramenta, a base de dados acessada foi o Pubmed com limitação de data de publicação de 10 anos exceto para publicações relevantes para o contexto da pesquisa, para os quais foram apresentados artigos mais antigos

- Foi selecionado o critério de busca de artigos de língua inglesa

Foi realizada biblioteca de busca para cada assunto da revisão, e incluídas nas bibliografias relevantes para o contexto da tese.

JUSTIFICATIVA

O presente estudo visou demonstrar a manutenção da viabilidade das Células tronco hematopoiéticas congeladas em freezer mecânico utilizando-se diferentes concentrações de crioprotetores, em especial o DMSO.

Foi demonstrado que a viabilidade das CTH, principalmente as CTH de baixa complexidade que são aquelas menos comprometidas com as linhagens hematopoiéticas, é mantida mesmo usando-se concentrações muito baixas dos crioprotetores.

Esse estudo foi elaborado com o intuito de sugerir o uso de menores quantidades de DMSO, pois esse crioprotetor está associado a inúmeras reações adversas no momento da infusão das Células descongeladas. Além disso, o DMSO é caro.

O mesmo estudo ainda pretendeu demonstrar que as células apoptóticas liberam mais citocinas inflamatórias e que isso poderia explicar, ao menos em parte, as reações adversas do paciente no momento da infusão das CTH descongeladas.

As células tronco hematopoiéticas (CTH), por definição, expressam o antígeno de superfície CD34, não são comprometidas com nenhuma linhagem hematopoiética e são responsáveis pela manutenção da hematopoiese normal (1-5).

Na literatura existem diferenças significativas em relação à dose de CTH necessária para garantir uma recuperação hematológica adequada após o Transplante de Células Hematopoiéticas periféricas (TCTH), porém sabe-se que a maioria dos estudos estabelece como dose segura aquela de 2×10^6 CD34 total/Kg de peso do receptor(6-18). É consenso que o tempo de recuperação leucocitária diminui com o aumento da dose de CTH CD34 positivas, afetando significativamente, de maneira inversa, a recuperação hematopoiética e a mortalidade relacionada ao TCTH (19-25).

As células CD34 + mobilizadas para o TCTH formam uma população heterogênea de CTH. Sabe-se atualmente que apenas uma pequena porção das CD34 é responsável pela função primordial de hematopoiese. Essas células possuem marcadores imunofenotípicos de superfície além do CD34, como o CD133, o CD110, entre outros. Alguns estudos já estabeleceram doses celulares específicas para o TCTH quando utilizados tais marcadores em conjunto, e os resultados demonstram clara correlação com melhor recuperação hematopoiética e menor mortalidade(26-39). Porém, o uso rotineiro desses marcadores em conjunto ainda não foi claramente estabelecido e, portanto o seu uso ocorre apenas em pesquisa. Por outro lado, é possível delimitar com um pouco mais de precisão esse grupo de CTH por meio da técnica de citometria dos padrões de tamanho e granularidade citoplasmática (FSC x SSC). Dessa forma, as CTH CD34 podem ser divididas em células de baixa e alta complexidade segundo a análise cruzada desses dois

parâmetros associados. As primeiras apresentam baixo grau de diferenciação e elevada potencialidade regenerativa, enquanto as últimas apresentam um grau maior de diferenciação assim como um menor potencial regenerativo(40).

O TCTH utiliza as CTH CD34 positivas do próprio paciente (TCTH autólogo) ou de um doador familiar ou não-relacionado (TCTH alogênico) para restabelecer a hematopoiese sadia após quimioterapia mieloablativa (41-44). Particularmente no contexto do TCTH autólogo, onde após a coleta das CTH CD34 + no sangue periférico o paciente passa por um período de 3 a 8 dias realizando a mieloablação quimioterápica, é necessário que as CTH coletadas sejam congeladas para a manutenção de sua viabilidade.

O congelamento das CTH tem como princípio o uso de agentes crioprotetores destinados à manutenção da viabilidade destas células em temperaturas muito baixas. Sabe-se que existe perda de viabilidade das CTH congeladas por diversos fatores entre eles, a lesão direta pelo frio denominada crioinjúria, e, mais importante, a perda de viabilidade após o descongelamento das CTH por ação do próprio agente crioprotetor (45-66). Além disso, o principal agente crioprotetor denominado DMSO (Dimetilsulfóxido) está associado com inúmeras reações adversas do receptor no momento da infusão por se tratar de uma substância com elevado potencial tóxico tecidual. A dose preconizada de DMSO assim como a composição da solução crioprotetora varia de forma considerável nos diferentes centros transplantadores. A tendência atual é que se use a menor concentração possível do DMSO para que possam ser reduzidos os efeitos tóxicos no momento da infusão das CTH (67-80). Outras variáveis, como a celularidade do produto de coleta também estão associadas diretamente com a viabilidade do enxerto. Sabe-se que existe uma relação inversa entre celularidade do enxerto e viabilidade celular (81-91).

A toxicidade relacionada à infusão das CTH CD34 + congeladas é, em grande parte, atribuída ao DMSO presente no enxerto. Porém, outro fator que pode estar relacionado à incidência de efeitos adversos na infusão é a presença das citocinas inflamatórias, sobretudo a IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-12 e TNF- α ; liberadas pelos leucócitos durante o período de armazenamento no freezer e presentes no enxerto no momento de sua infusão(92, 93). Tais citocinas estão relacionadas às reações transfusionais não-hemolíticas e podem contribuir para a toxicidade da infusão no contexto do TCTH autólogo (94, 95).

O presente trabalho analisou a influência de diferentes concentrações de DMSO além de diferentes composições da solução crioprotetora na viabilidade tanto das CTH de baixa complexidade como nas CTH de alta complexidade. Além disso, foi demonstrada a relação entre morte celular durante o período de congelamento e quantidade de citocinas inflamatórias liberadas pelos leucócitos presentes no enxerto.

2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (CTH)

O sistema hematopoiético consiste de vários tipos celulares com funções especializadas. Muitas células sanguíneas têm vida curta e necessitam ser repostas continuamente, sendo que a média humana de reposição situa-se em torno de 100 bilhões de células sanguíneas novas a cada dia. A produção contínua de tais células depende diretamente das CTH, legítimas fontes primárias de todo o sistema hematopoiético.

A história dessas células começa após as bombas atômicas de Hiroshima e Nagasaki em 1945 (96). Tais eventos provocaram um grande número de mortes precoces por insuficiência medular. Mais tarde, observou-se que ratos que recebiam radiação apresentavam morte com as mesmas características observadas no Japão. Porém, protegendo-se o baço ou alguma cavidade óssea dos ratos com chumbo, a dose de radiação não mais provocava a sua morte, pois nesses casos existia algum fator responsável pela manutenção da atividade da hematopoiética que não fora destruído pela radiação devido à proteção do chumbo. Em seguida, foram feitas tentativas bem sucedidas de reposição da atividade hematopoiética com injeção de suspensão de células oriundas de órgãos como a medula óssea. Em 1956, descobriu-se que tais suspensões injetadas regeneravam o sistema hematopoiético ao invés de liberarem fatores solúveis que causassem a regeneração das células hematopoiéticas mortas. Logo em seguida, viu-se que não apenas a radiação, mas também doses elevadas de quimioterápicos causavam a destruição da medula óssea, porém que a medula morta poderia ser recuperada com a infusão de células progenitoras de outro indivíduo. Inicia-se, então, a era dos transplantes de medula óssea. Através de experimentos adicionais, Till e McCulloch (1965) identificaram marcadores genéticos em células das suspensões infundidas, e observaram que tais células eram capazes de originar não apenas (97) outras células idênticas (auto-renovação), mas também todas as outras células do sistema hematopoiético. Nesse momento, tais células foram chamadas de pluripotentes, nome que mais tarde foi substituído por multipotente. Porém, a identificação dessas células através de marcadores genéticos randômicos na prática clínica se tornava impraticável. E, por volta dos anos 60, inicia-se a corrida pela sua identificação, fator crucial na prática

do transplante de medula.

No início, as CTH foram caracterizadas através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, que tinham como objetivo medir a capacidade de essas células formarem colônias num período de tempo aproximado de cinco a sete semanas de cultivo. Porém, o grande problema desse tipo de ensaio é a dificuldade técnica principalmente pelo tempo despendido até o resultado final (98, 99).

Outros métodos de identificação e quantificação das CTH foram denominados de FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)(100) com a vantagem de poder selecionar células raras no meio de milhares. O princípio baseia-se na conjugação de marcadores particulares ligados às células através de anticorpos específicos, sendo possível realizar a seleção da população de células específica que se quer identificar. Porém, a técnica é demorada e cara para ser usada na prática diária do transplante de medula óssea.

Mais tarde, tentou-se caracterizar tais células pelas medidas de tamanho e granulação. Com o advento dos anticorpos monoclonais e um maior entendimento das proteínas de superfície de tais células, iniciou-se a técnica da imunofenotipagem que se tornou o padrão-ouro na identificação das CTH no transplante de medula óssea (101). Diversas combinações de anticorpos foram usadas na caracterização das CTHs murinas, como o CD117^{high}, CD90^{low}, Lin^{neg}, Sca-1^{pos}. Estratégias similares foram usadas para identificar as CTHs humanas, usando-se o CD34, CD38, Lin, CD90 e CD133. Na medula óssea murina, uma em cada dez mil células é considerada uma CTH com habilidade de auto-renovação e diferenciação em longo prazo. Se incluirmos CTH com potencial de proliferação e diferenciação de curto prazo, a sua incidência se eleva para uma em cada mil ou duas mil células medulares, proporções que também são vistas no homem. No sangue periférico, essas incidências são em geral dez vezes menores (29). As CTH com potencial de proliferação e diferenciação em curto prazo são também denominadas progenitores hematopoiéticos, e diferenciam-se das CTH imaturas por sua reduzida capacidade de diferenciação e incapacidade de auto-renovação. Porém, tais progenitores possuem boa capacidade proliferativa e podem gerar um grande número de células hematopoiéticas maduras (102-104).

Quando pensamos no papel funcional dos diferentes subgrupos de células CD34 positivas na reconstituição hematopoiética após o transplante de medula óssea, a tendência geral é considerar fundamental o papel das CTH imaturas e reduzir a importância dos progenitores mais maduros e precursores geradores das populações maduras. Porém, cada uma dessas subpopulações tem um papel de importância relativa na reconstituição. Sabe-se que os precursores maduros são responsáveis pela reconstituição prematura no primeiro mês após a infusão da medula, os progenitores tardios são responsáveis pela geração de tecido hematopoiético no período de um a três meses aproximadamente, os progenitores precoces, responsáveis pela produção de tecido hematopoiético do terceiro ao quinto mês e, finalmente, as CTH imaturas garantem o funcionamento medular a partir do final do terceiro mês em diante (105).

Como regra, o CD34 é um marcador da imaturidade celular hematopoiética, tornando-se progressivamente ausente à medida que ocorre diferenciação celular. Com relação à sua estrutura molecular, os anticorpos anti-CD34 são classificados em três grupos conforme os epítomos de ligação. Anticorpos do grupo III (entre eles o 8G12) (106-111) são considerados os ideais para a imunofenotipagem por citometria de fluxo pelo fato de apresentarem maior abrangência de ligação aos epítomos do CD34 e, além disso, ligam-se com afinidade a todas as formas glicosiladas do antígeno, o que os torna altamente sensíveis e específicos(112).

Quando consideramos o sistema hematopoiético em particular, as CTH que possuem o marcador de superfície CD34 compreendem um grupo heterogêneo de células imaturas que é funcionalmente caracterizado pela capacidade *in vitro* de gerar agregados clonais derivados de progenitores imaturos e com maior grau de diferenciação (*early and late progenitors*) (113) e capacidade *in vivo* de reconstituir o sistema imuno-hematopoiético num hospedeiro previamente tratado com dose de radiação supra letal. Estudos imuno-histoquímicos (114-118) demonstraram que o CD34 é estágio-específico e não linhagem-específico, isto é, sua expressão depende do estágio de maturação do precursor e que está presente em diferentes linhagens de precursores nos seus estágios mais precoces de desenvolvimento. Os receptores que normalmente coexistem com o CD34 podem ser divididos naqueles denominados linhagem não-específicos (Thy-1, CD38, HLA-DR, CD45RA, CD71) e

aqueles linhagem-específicos já mais maduros das linhagens linfóide-T (TdT, CD10, CD7, CD5, CD2), linhagem B (TdT, CD10, CD19), linhagem mielóide (CD33, CD13) e linhagem megacariocítica (CD61, CD41, CD42b). No grupo linhagem não-específico, as células que apresentam baixa expressão dos antígenos Thy-1, CD38, HLA-DR, CD45RA e CD71 são consideradas progenitores imaturos (*early*) e as células com maior expressão desses receptores serão denominadas progenitores mais maduros (*late*), também denominadas de progenitores restritos às linhagens ou CFU-GM, CFU-G, CFU-M, BFU-E, CFU-E e BFU-Meg (119, 120). De todos os antígenos linhagem não-específicos, a ausência da expressão do CD38 é a mais importante para definir os progenitores mais indiferenciados e com função de célula-tronco hematopoiética (119, 121-124). Se considerarmos apenas as células CD34+/CD38-, estaremos estudando apenas 1% de todas as células CD34 positivas e menos de 0,01% das células mononucleares. Além disso, os progenitores mais imaturos ainda expressam o CD45RO. Lansdorp et al. (1995) (125-130) identificaram subpopulações de CTH imaturas no sangue de cordão umbilical: CD34+CD45RA^{lo}CD71^{lo} (42% dos progenitores), CD34+CD45RA+CD71^{lo} (90% dos progenitores mielóides) e CD34+CD45RA^{lo}CD71+ (70% progenitores eritróides). Analisaram também a proliferação e diferenciação de longo prazo induzida por citocinas, e viram que diferentes subpopulações apresentam diferentes (125-131) capacidades de proliferação, e que a subpopulação CD34+CD45RA^{lo}CD71^{lo} teve os melhores resultados em termos de cultivo de longo prazo, fato que a aproxima da definição de CTH progenitora multipotente (132).

Além da caracterização de tais antígenos de superfície, o estudo de Carvalho J.M. et al. (2009) identificou ainda outro antígeno associado ao CD34+/CD38-, a presença em baixa quantidade do antígeno Rodamina -123 (Rh-123), que normalmente se acumula nas células mais maduras. Como nas CTH primitivas o número de mitocôndrias é menor refletindo o seu menor ritmo metabólico, nessas células existe pouco Rh-123 acumulado. Esse estudo revelou que o Rh-123 está presente em baixas concentrações nas regiões citométricas correspondentes às células menos diferenciadas (133).

A função de auto-renovação e diferenciação das CTH imaturas é regulada por fatores solúveis e fatores presentes no nicho medular. Já são conhecidas citocinas com potencial excitatório (IL-11, IL-12, IL-6, IL-1) e inibitório (IFN, TGF- β).

Fatores de crescimento aumentam não apenas a proporcionalidade de precursores hematopoiéticos, mas também seu número absoluto em diversas vezes os valores basais(134).

Além de sua função primordial hematopoiética, o antígeno CD34 é expresso em diferentes tipos celulares como, por exemplo, células endoteliais capilares, tumores de origem epitelial, fibroblastos, células multipotentes mesenquimais estromais e células dendríticas (135).

As características das populações de células CD34+ assim como de outras populações, como subpopulações de linfócitos, células NK e células dendríticas, variam conforme a origem do enxerto: Chevalier P. et al. (2013) caracterizaram imunofenotipicamente as diferentes populações celulares presentes em diferentes fontes de CTH tais como sangue periférico, cordão umbilical e medula óssea, o que pode explicar a diferença nos desfechos associados a essas características (136).

Champlin R. et al. (1995) (137) caracterizaram o perfil imunofenotípico de CTH primitivas no sangue periférico após mobilização com o uso de G-CSF (Fator de crescimento de granulócitos) em pacientes submetidos à coleta de CTH de sangue periférico. Nesse estudo, observou-se uma multiplicação não apenas das células CD34+ após o uso do fator de crescimento, como também das populações CD34+Thy-1^{dim} (Thy também denominado de CD90) e CD34+Thy-1^{dim}CD38- na ordem de dezesseis a vinte e quatro vezes o número inicial. Além disso, o percentual dessas duas populações primitivas aumentou com relação ao número total de CD34 positivas, o que sugere um efeito de "periferalização" do G-CSF nas populações de CTH primitivas. Interessante observar nesse estudo que o número médio de células CTH primitivas por quilograma do receptor foi $3,3 \times 10^6$ para as CD34+Thy-1^{dim} e $0,2 \times 10^6$ para CD34+Thy-1^{dim}CD38-, significando que as populações de células provavelmente comprometidas diretamente com a hematopoiese real são aproximadamente dez a cinquenta por cento do número total de CD34 positivos calculados na coleta de CTH do sangue periférico, o que pode explicar a razão da existência de pega neutrofílica e plaquetária normais em pacientes que receberam quantidades de CD34 inferiores ao número mínimo de 2×10^6 CD34/Kg, já que nesses casos existe um aumento não apenas absoluto mas de

proporção dos precursores primitivos relacionados com a hematopoiese real no enxerto com relação ao número total de CD34 positivas. Nesse estudo, os enxertos foram criopreservados em freezer de congelamento controlado, e foi medida a viabilidade das populações linfocitárias assim como das CTH primitivas. Não foi encontrada redução anormal de alguma população linfocitária específica, o que vai contra algumas suposições de que enxertos de sangue periférico congelados estão associados à redução na taxa de Doença do Enxerto Versus Hospedeiro pelo efeito da citotoxicidade causada pela exposição a baixas temperaturas.

Desde o início do uso da quantificação das CTH pela marcação de CD34 no início do século 21, existem cada vez mais evidências de que a simples quantificação da população de células CD34 + não é um bom preditor para a pega hematopoiética, e posteriormente os demais desfechos do TCTH como veremos nos capítulos a seguir. A definição de uma população primitiva de células com função de célula tronco multipotente capazes de restituição de longo prazo da hematopoiese torna-se cada vez mais necessária para que se possa melhorar o valor preditivo da quantificação de CTH nos TCTH (138, 139). Fasan O. (2014) também chama a atenção desse aspecto (140).

2.2 - ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS CTH CD34 POSITIVAS

A proteína CD34 é uma fosfoglicoproteína transmembrana, inicialmente identificada em 1984 em populações de células tronco hematopoiéticas, com o peso molecular de aproximadamente 115 KDa, e possui um domínio extracelular intensamente siálico além de conter sítios glicosilados. O gene do CD34 encontra-se no braço longo do cromossoma um, uma região contendo inúmeros outros codificadores de moléculas de adesão e sinalização intercelular (141, 142).

Apesar de a estrutura molecular do CD34 ser bastante conhecida, pouco se sabe sobre as suas funções (143). Estudos específicos para essa população celular sugerem função de cito adesão celular e regulação da proliferação e diferenciação celulares. Como linfócitos que apresentam na sua superfície L-selectina e se ligam a moléculas CD34 nas superfícies endoteliais, presume-se que

as CTH CD34 + possuam função adicional de *homing* de CTH a determinados nichos específicos na medula óssea (144, 145).

2.3 - CTH E RESULTADOS CLÍNICOS

Na prática clínica, a expressão de CD34 nas CTH está associada à precocidade da pega leucocitária e plaquetária. Há ainda controvérsia na dose adequada de CTH CD34 + que devem ser transplantadas para que haja associação com rapidez na reconstituição hematopoiética assim como na redução de eventos infecciosos e morbimortalidade do TCTH. Enquanto poucos estudos não conseguem detectar benefício entre um maior número de CTH CD34 + redução do tempo para a pega hematopoiética, taxa de infecções pós TCTH autólogo e mortalidade relacionada ao procedimento (146), a maioria dos estudos é capaz de demonstrar que existe correlação direta entre o número de CTH CD34 + e eventos clínicos satisfatórios, sobretudo no contexto do TCTH alogênico, como redução de morbimortalidade em geral (147-158).

Além do número puro de CTH CD34 +, outro fator que tem se tornado importante no contexto do TCTH é a qualidade do enxerto em termos de populações específicas de CTH infundidas (159). Sabe-se que, dependendo da fonte de CTH e do tipo de mobilização celular, podemos ter não apenas quantidades diferentes de CTH, mas também selecionar populações específicas de CTH com capacidades diferentes de proliferação e diferenciação (160, 161).

Embora na maioria das vezes usado como único marcador das CTH, a detecção do CD34 na medula óssea ou sangue periférico representa uma população heterogênea de células com variáveis potenciais progenitoras. As CTH com maior potencial progenitor dentro da população total de células CD34 + (162) são aquelas que possuem também os marcadores citoplasmáticos CD45, CD133 (163), ausência de CD38 (26, 164) e CFU-GM (165, 166).

Segundo Beksac M. e Preffer F. (2012) (167), as seguintes populações de CTH progenitoras já foram identificadas e muitas delas já correlacionadas com pega

neutrofílica e plaquetária: CD34 presentes em 1/200 células da medula óssea, dose celular recomendada para TCTH de 2 a 8 x 10⁶/Kg de peso do receptor e com correlação positiva para pega neutrofílica e plaquetária; células CD34+/CD38- presentes em 1/1000 das células da medula óssea com dose celular recomendada desconhecida e correlação positiva com pega plaquetária e neutrofílica; células CD34+/CD90+ presentes em 1/1000 células da medula óssea com dose celular recomendada de 25 a 80 x 10⁴/Kg e com correlação positiva documentada para pega neutrofílica e plaquetária; células CD34+/CD110+ com correlação positiva para pega plaquetária; células CD34 negativas/*low* presentes em 1/24000 das células medulares e dose celular assim como correlação com pega desconhecidos; células CD133 + com resultados semelhantes àqueles do grupo das células CD34+; células CD34+/CD133+ com prevalência medular e dose recomendada desconhecidos, mas com correlação positiva com pega hematopoiética (163, 168-170); células SSC *low*/LDH *bright* com prevalência de 1,2% na medula óssea e dose recomendada de 5 a 7 x 10⁶/Kg, com correlação positiva com pega neutrofílica e plaquetária (171).

Prabhash K. et al. (2010) (172) demonstraram uma correlação positiva entre a presença do marcador CD26 na superfície de linfomonócitos e neutrófilos com pega hematopoiética precoce no contexto do TCTH. No contexto do TCTH autólogo, a presença de células CD34+/CD110+ (receptor de trombopoetina) foi correlacionada positivamente com precocidade na pega plaquetária (173). Outro estudo avaliou as células CD34+/CD38- e aquelas CD34+/CD61+ (linhagem comprometida) com a pega plaquetária, encontrando novamente correlação positiva da imaturidade das CTH com a pega precoce de plaquetas (32).

Chevallier P. et al. (2013) demonstraram diferenças de quantidade e também de qualidade e funcionalidade entre CTH coletadas de diferentes fontes como por exemplo CTH coletadas após mobilização com fator de crescimento, CTH coletadas por leucocitaférese, medula óssea e cordão umbilical (174). Um estudo em TCTH autólogo envolvendo pacientes portadores de Mieloma Múltiplo detectou uma seleção de CTH mais imaturas nos pacientes que usaram plerixafor (175) na mobilização para coleta por aférese (176). Alexander E.T. et al. (2011) demonstraram resultados semelhantes em CTH mobilizadas com plerixafor comparadas com fator de crescimento (20). Nessa mesma linha, sabe-se que o potencial progenitor das CTH é preservado nos pacientes bons mobilizadores

quando comparados com aqueles de difícil mobilização (160). Na tentativa de detectar novos e confiáveis marcadores de CTH progenitoras, outro estudo utilizou a detecção de células lactato desidrogenase (LDH) *bright* que também marcavam CD34 e eram negativas para CD38. A presença de células LDH *bright* correlacionou-se com a precocidade na pega de neutrófilos e plaquetas no contexto de TCTH autólogo (171, 177). Por outro lado, CTH criopreservadas e frescas possuem semelhantes capacidades de proliferação e diferenciação (24, 178-180).

3- MÉTODOS DE DETECÇÃO DAS CTH POR CITOMETRIA DE FLUXO

Durante muitos anos, a contagem das células mononucleares totais presentes no produto de coleta da medula óssea representou a medida padrão relacionada diretamente com a capacidade de recuperação hematopoiética e conseqüentemente, um preditor da morbimortalidade relacionada ao transplante (11). Porém tal medida mostrou-se pouco eficaz devido à pobre correlação entre o número de células mononucleares e a quantidade de CTH de sangue periférico CD34 positivas presentes no produto de coleta (181-186).

Os ensaios clonogênicos dos progenitores hematopoiéticos tais como as unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) foram utilizados como marcadores da reconstituição hematopoiética. Porém, tais ensaios requerem 10 a 14 dias de cultivo para a leitura final, tornando-se, portanto inúteis na prática clínica onde resultados da quantidade de CD34 são necessários em no máximo 24 horas para definir o momento exato da coleta de CTH periféricas, assim como para decidir a necessidade de novas coletas nos casos de coletas numericamente insuficientes. Além disso, os ensaios clonogênicos são de difícil padronização devido ao grande número de variáveis envolvidas no procedimento (187).

Somente de um a três por cento das células presentes na medula óssea expressam o antígeno de superfície CD34 e são capazes de reconstituir em longo prazo a hematopoiese multilinear após ablação da medula óssea. Apesar de não representar um antígeno de superfície celular exclusivo das células progenitoras

hematopoiéticas responsáveis pela reconstituição hematopoiética de longo-prazo, o CD34 é o único antígeno de superfície cuja expressão é restrita à maioria das células tronco hematopoiéticas primitivas e às células hematopoiéticas progenitoras de multilinhagem.

A técnica de citometria de fluxo (CF) constitui-se, na atualidade, um dos principais métodos para identificação das CTH e suas subpopulações, tendo como vantagens a rapidez na sua execução, a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. As desvantagens principais são o elevado custo e a dependência do observador, mas os protocolos existentes e o pessoal treinado e qualificado sobrepujam esse último viés.

O princípio da CF baseia-se na detecção do antígeno de superfície CD34 e é realizada com o uso de anticorpos monoclonais anti-CD34. Existem mais de trinta subtipos de anticorpos anti-CD34 específicos para diferentes epítopos antigênicos, e eles apresentam variações de sensibilidade e especificidade nos métodos de detecção. Anticorpos da classe III, como o representante 8G12 são muito específicos para as regiões glicadas da proteína e, portanto, são muito usados nos protocolos de citometria de fluxo e imunofluorescência.

A CF propicia a análise das CTH de duas formas: a análise citométrica pura com base nos parâmetros SSC (*Side Scatter*) e FSC (*Forward Scatter*) e a análise por imunofenotipagem através dos anticorpos marcados contra os antígenos de superfície já comentados anteriormente (144, 188-194).

A análise pelos parâmetros citométricos oferece-nos a classificação das CTH de acordo com o seu tamanho (FSC) e a granularidade citoplasmática diretamente relacionada à complexidade celular (SSC). As CTH de baixa complexidade apresentam escassa granularidade citoplasmática e, portanto, são SSC baixas ou *low*, e como apresentam abundância do antígeno CD34 na superfície, são denominadas também de *bright*. As CTH de maior complexidade têm mais granularidade citoplasmática, e como apresentam menor expressão de CD34 na sua superfície, também são denominadas de *dim* (40, 195-199).

A análise imunofenotípica é complementar à análise citométrica e apresenta maior grau de sensibilidade e capacidade de detectar diferentes espécies

de CTH com base na expressão de outros antígenos de superfície. Porém, essa análise apresenta custo elevado pelo fato de usar anticorpos monoclonais. Portanto, na grande maioria dos serviços que realizam TCTH, ainda se utiliza como marcador apenas a quantidade de CD34 total da amostra. Em alguns centros, é realizada uma análise mais depurada, usando-se as características citométricas de complexidade celular acima descritas na tentativa de estabelecer uma correlação mais específica entre o tipo celular, a sua funcionalidade e os resultados clínicos (200-205).

Do ponto de vista histórico da CF (206), em 1989, Sienna et al. propuseram a quantificação de células CD34 pela citometria de fluxo como marcadoras da capacidade regenerativa da medula óssea após terapêutica mieloablativa em transplantes de medula que envolviam CTH de sangue periférico, já que tal técnica poderia fornecer resultados satisfatórios em poucos horas. Além disso, alguns investigadores demonstraram uma correlação positiva entre a quantidade de CD34 e os ensaios clonogênicos dos progenitores hematopoiéticos (207, 208).

Um problema importante até meados da década de 90 foi a falta de padronização na técnica de CF com respeito à mensuração das células CD34. Esse problema surgiu devido não só à utilização de anticorpos anti-CD34 com sensibilidades diferentes, mas também devido a diferentes técnicas de preparo da amostra e interferência de fatores tais como hemácias e plaquetas, agregados plaquetários e debris celulares inespecíficos.

Em 1995 foi criado um comitê de estudo de enumeração das células tronco pertencente à Sociedade Internacional de Hemoterapia e Engenharia de Enxerto (*International Society of Hemotherapy and Graft Engineering* ou ISHAGE) com a tarefa de estabelecer e validar os métodos de CF para quantificar células CD34 em sangue periférico e produtos de leucocitaférese (209-212). O manuscrito original previa alguns critérios: simplicidade, proporcionando aplicabilidade universal, alta sensibilidade já que células CD34 constituem eventos raros, acurácia, a fim de proporcionar resultados clínicos relevantes, reprodutibilidade e rapidez, para garantir resultados em tempo satisfatório (213, 214).

Assim, foi selecionado um ensaio padrão que usava sangue periférico total ou produtos de aférese, disponível comercialmente. Esse ensaio consistia de anticorpos

monoclonais conjugados a um fluorocromo, coloração e substância lisante padronizada, uma estratégia de janela única utilizando dispersão luminosa, uma combinação de anticorpos monoclonais pan-CD45 conjugados com FITC (*Fluorescein Isocyanate*) e pan-CD34 conjugados com PE (*Phycoeritrin*) para identificar com elevada sensibilidade o cluster de células progenitoras hematopoiéticas e um número mínimo de eventos de cem CD34 e setenta e cinco mil CD45, amostras replicadas e um número absoluto de leucócitos obtido de um contador hematológico automático, fazendo de tal análise um ensaio de dupla-plataforma.

Atualmente, existem diferentes metodologias oriundas do protocolo original do ISHAGE, como a ProCOUNT and STELLer de plataforma única (215), as metodologias de plataforma-dupla como a ISHAGE original, Millan-Mulhouse (modificada da técnica pioneira de Sienna), o ensaio Nórdico (modificada do ensaio de Millan-Mulhouse) e o método de SIHON (proposto pela sociedade Holandesa de imunofenotipagem em Hemato-Oncologia) (216, 217). Com relação aos ensaios de plataforma única, foram desenvolvidas diferentes técnicas, sendo uma delas uma modificação do protocolo desenvolvido pela ISHAGE. Todos esses ensaios produziram contagens absolutas de CD34 diretamente a partir de uma única análise de CF, sem a necessidade de um segundo instrumento de contagem automática de células. Dois desses ensaios dependem da medida de volume celular e os outros se baseiam no uso de concentrações conhecidas de “*counting beads*” (218-220).

Comparadas aos métodos de plataforma dupla, as técnicas de plataforma única representam não só uma diminuição no trabalho do processamento como também oferecem uma maior capacidade de padronização da técnica pelas seguintes características: evita a necessidade de um segundo instrumento de análise automatizada para calcular as contagens absolutas; e evita os fatores de interferência nas baixas contagens de CD34 vistos nas plataformas duplas como os processos de diluição da amostra antes dos testes (221-226).

Através de um esforço internacional de padronização das técnicas em vigor, foram feitas recomendações recentes tais como: o uso de corantes de ácidos nucléicos vitais a fim de determinar debris celulares inapropriados, plaquetas e hemácias das amostras, ou o uso do 7-aminoactinomicina D (7-AAD) para excluir

células apoptóticas não viáveis durante a fase de aquisição (227, 228). Além disso, recomenda-se a inclusão de CD45^{dim} e CD45^{bright} na contagem da população global até que a contribuição do CD45^{dim} na recuperação hematopoiética a curto e longo prazo seja bem determinada. Com relação a CD45^{dim} e CD45^{bright}, a população “*bright*” representa as mais primitivas e expressa CD90, CD133 e ausência de CD38 (229-233). Essa população representa o cerne da atividade de CTH multipotentes, toda a atividade de repopulação de longo prazo e capacidade de repopulação hematopoiética em camundongos SCID (Imunodeficiência Severa Combinada). Além disso, estudos usando subpopulações de CTH purificadas para Lyn-, CD34+, CD90+ mostraram recuperação hematológica rápida e sustentada com quantidades tão reduzidas quanto 8×10^5 /Kg de peso do receptor (234). Outras medidas recomendadas recentemente para a padronização da técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo são a omissão do corante de controle considerado redundante, técnica de janela seqüencial para separar os precursores CD34 das células irrelevantes com base nas propriedades destas últimas, como baixa expressão de CD45 e baixa intensidade de sinal na luz lateral (SSC) (235-238).

4 - O TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (TCTH)

O TCTH visa de uma forma geral, substituir a hematopoiese doente por outra nova, sem a presença do clone que originou a doença de base. Para que isso ocorra, é necessário ter uma fonte de CTH capaz de não só gerar uma nova hematopoiese como também eliminar a medula óssea original (239-243).

4.1- CARACTERÍSTICAS DOS TCTH

O TCTH atualmente teve sua indicação ampliada para um número grande de doenças não apenas onco-hematológicas (244-251), mas também imunodeficiências, erros inatos do metabolismo e outras doenças não hematológicas como, por exemplo, a esclerose múltipla (252, 253). As CTH podem ser oriundas do próprio paciente (TCTH autólogo), de um doador idêntico com relação ao complexo gênico denominado antígeno leucocitário humano (HLA-idêntico) relacionado (irmão ou familiar próximo), de um doador HLA-idêntico não aparentado (doador de fora da família) ou de um gêmeo idêntico (TCTH singênico). As fontes de CTH são medula óssea, cordão umbilical e CTH periféricas (254).

4.2- DIFERENÇAS ENTRE TCTH AUTÓLOGO E ALOGÊNICO

Além da diferença fundamental na fonte de CTH, os TCTH autólogos diferenciam-se dos TCTH alogênicos pelas maiores taxas de recidiva das doenças de base, já que usam muitas vezes CTH contaminadas com células doentes residuais, e o TCTH alogênico usa doador sadio como fonte de CTH, portanto apresentando menor chance de recidiva da doença de base. Outra diferença entre as duas principais modalidades de TCTH (autólogo e alogênico) baseia-se na fonte de CTH do primeiro que, praticamente em todos os casos, são usadas as CTH periféricas mobilizadas, enquanto que, no segundo caso, apesar de também se usar

fonte de sangue periférico, a fonte ainda mais usada é a medula óssea. Isso significa que os TCTH oriundos de CTH periféricas são coletados por leucocitaférese e proporcionam um número significativamente maior de CTH, enquanto que nas coletas de CTH da medula óssea, o número de CTH aproxima-se, na maioria das vezes, dos 2×10^6 CD34/Kg preconizados como mínimo para um TCTH sem prejuízo em termos de morbimortalidade associada ao número de CTH.

4.3- FASES DO TCTH AUTÓLOGO

O TCTH autólogo é dividido nas fases de mobilização, coleta das CTH periféricas, congelamento das CTH, condicionamento, infusão das CTH e período de recuperação hematopoiética após a infusão (255).

A mobilização consiste na utilização de fatores de crescimento de colônias de granulócitos (G-CSF) para a obtenção das CTH. Sabe-se que as CTH CD34 positivas são encontradas raramente no sangue periférico de indivíduos normais e em quantidades muito baixas, 0.01% a 0.1%, segundo consenso internacional. A mobilização está diretamente relacionada ao conceito de nicho medular. As CTH residem dentro de nichos medulares específicos e ficam ancoradas por proteínas adesivas e sinalizatórias que guiam todo o processo de quiescência, proliferação e auto-renovação. O fator de crescimento produz alterações na composição dos nichos, incluindo uma regulação negativa das moléculas de adesão e quimiocinas (256). Após a mobilização com fatores de crescimento, as células CD34 são detectadas mais frequentemente numa monta que varia de 0.1% a 8.0% no sangue periférico ou no produto de coleta por leucocitaférese. Portanto, dessa forma é possível coletar essas CTH através da máquina de leucocitaférese. A coleta consiste na separação das CTH do restante dos componentes sanguíneos por gradiente de densidade e força centrífuga utilizando-se a máquina de leucocitaférese (257-272).

O congelamento das CTH é necessário pois a viabilidade em temperatura ambiente das CTH é de cerca de 72 horas. Como existe um intervalo de tempo de aproximadamente 8 dias pelo menos entre a coleta e a infusão, é necessário congelar o material coletado. É feito em freezer -80°C , e, para que as CTH não

sejam prejudicadas pelo frio intenso, são usadas substâncias crioprotetoras como o Dimetilsulfóxido (DMSO), albumina e o Hidroxietilamido (HES) em concentrações dependentes dos protocolos de congelamento de cada serviço.

O condicionamento é a realização de quimioterapia no paciente em doses elevadas com o objetivo de eliminar clones doentes residuais para que haja espaço para o estabelecimento de uma nova hematopoiese.

A infusão das CTH acontece após o término do condicionamento, e as CTH são descongeladas em banho-maria até a temperatura de 37°C antes de serem infundidas no receptor.

O período da recuperação hematopoiética após a infusão das CTH compreende os dias seguintes à infusão quando ocorre o *homing* das CTH e o início da nova hematopoiese. Pega é definida como o surgimento no sangue periférico das novas células oriundas da hematopoiese. A precocidade da pega está diretamente relacionada à redução de transfusões, complicações infecciosas, tempo de hospitalização, doença do enxerto-versus-hospedeiro (no caso do TCTH alogênico), redução da taxa de mortalidade e aumento da sobrevida geral após o TCTH.

4.4- RECUPERAÇÃO HEMATOPOIÉTICA

As variáveis que podem influenciar na pega podem ser divididas naquelas relacionadas ao receptor, ao doador, ao enxerto e naquelas relacionadas às complicações intrínsecas do período após a infusão das CTH.

As variáveis relacionadas ao receptor compreendem a idade (273), o status da doença no momento do TCTH (274, 275), o número e os tipos de tratamentos prévios ao TCTH (276).

As variáveis relacionadas ao doador compreendem fatores possivelmente genéticos e intrínsecos do indivíduo. A idade do doador não influencia na quantidade e na qualidade de CTH coletadas por aférese (277). Talvez isso possa ser explicado pelo fato de que a leucocitaférese é capaz de fornecer elevadas quantidades de

CTH(278, 279). Já no contexto das CTH de medula óssea, existem hipóteses de que idade avançada do doador está associada com menor quantidade de CTH progenitoras, menor potencial progenitor e subpopulações de CTH diferenciadas (280-284).

As variáveis relacionadas ao enxerto compreendem aquelas que já foram discutidas anteriormente. Em alguns casos, onde o número de CTH infundido foi realizado em quantidades preconizadas e os pacientes apresentaram pega retardada, o número de células nucleadas e granulócitos no enxerto foi associado com o atraso na pega. A explicação para tal fenômeno foi a de que os granulócitos contaminantes podem liberar elastase, metaloproteinase-9, interleucina 1- β e interleucina-6; todas elas envolvidas no *homing* das CTH (285). Outros fatores como radioterapia prévia correlacionaram-se significativamente com o atraso na pega plaquetária (276). A perda de viabilidade das CTH CD34 positivas após o descongelamento pode interferir na pega caso haja uma perda significativa (19). Com relação à viabilidade e ao congelamento, concentrações menores de DMSO de 7,5% quando comparadas com DMSO 10% foram associadas a uma recuperação hematopoiética melhor (286, 287).

As variáveis relacionadas às complicações do período após a infusão das CTH compreendem a presença de infecções bacterianas (288), virais, como aquelas causadas pelos vírus da família Herpes como o citomegalovírus (289), infecções fúngicas(290), doença do enxerto-versus-hospedeiro no caso dos TCTH alogênicos, medicamentos mielotóxicos como as sulfas e antivirais como o ganciclovir entre outros.

5 - CRIOBIOLOGIA

Nos últimos quarenta anos, têm sido estudadas as possibilidades de congelamento de componentes sanguíneos para tratar militares feridos e aqueles expostos à radiação. Inicialmente o sangue total foi congelado com HES em freezers de nitrogênio líquido, porém, devido aos pobres resultados, essa técnica foi rapidamente abandonada. Entretanto, o congelamento de hemocomponentes em separado (hemácias, plaquetas, plasma e CTH foi obtido com sucesso. Smith A.U. et al. (1950) iniciaram o congelamento de hemácias com glicerol em temperaturas de -80°C.

No transplante autólogo, a criopreservação e a estocagem das CTHs são necessárias para utilização após a terapia de condicionamento com quimioterapia em altas doses. Assim, o conhecimento dos mecanismos físico-químicos que ocorrem durante o congelamento e descongelamento é de suma importância para se manter a estrutura e a integridade funcional das células e tecidos congelados.

Atualmente, a criopreservação é um método que permite a preservação de células vivas e tecidos funcionais para pesquisas científicas ou aplicações médicas e industriais, como transfusão sanguínea, transplante de medula óssea, inseminação artificial, fertilização *in vitro*, armazenamento de alimentos, entre outros. O metabolismo de células vivas diminui drasticamente em baixas temperaturas, um fato que permite a preservação de células e tecidos no longo prazo. A maioria das células dos mamíferos é sensível à hipotermia; mudanças no metabolismo celular induzidas por temperatura afetam fortemente sua atividade e viabilidade (291).

A literatura demonstra uma contradição aparente entre o processo de criopreservação, ideal para o armazenamento de células, e os danos por ele causados, ou seja, a formação de gelo intracelular e extracelular (292).

O estresse térmico de amostras induzido durante o processo de congelamento tem sido proposto como uma deformação elástica das células, o que pode causar danos na estrutura física e mecânica da membrana plasmática, produzindo deformações permanentes (293).

5.1- FISIOPATOLOGIA DA CITOTOXICIDADE INDUZIDA PELAS BAIXAS

TEMPERATURAS

Os danos observados em congelamento de tecidos biológicos podem ser causados pela taxa de resfriamento da amostra, pela taxa de descongelamento, temperatura mínima alcançada durante o processo, número de ciclos congelamento-descongelamento e a presença de crioprotetores. Os mecanismos de dano destruição de amostras biológicas podem ser separados em dois grupos: a primeira fase, chamada fase de transição, está relacionada ao resfriamento da amostra, que é a passagem da temperatura ambiente, positiva, para as temperaturas negativas. A segunda fase refere-se aos danos relacionados ao processo de congelamento propriamente dito. Dentre os mecanismos de danos físicos, citam-se a transferência de calor e massa e o equilíbrio químico entre as soluções intra e extracelular. A interação mecânica entre cristais de gelo e células está relacionada ao processo de destruição celular durante a fase de transição (190).

A formação de gelo extracelular induz a numerosas alterações físicas e químicas. O dano celular está relacionado à natureza e à cinética da resposta celular frente ao decaimento da temperatura. Quando uma suspensão celular é refrigerada abaixo do seu ponto de congelamento, a água é removida da solução na forma de gelo, aumentando a concentração de solutos, que permanecem na fração não congelada, aumentando a pressão osmótica da solução restante (294). O gradiente resultante da pressão osmótica do outro lado da membrana plasmática fornece a força condutora para um efluxo de água das células, sendo que a taxa de efluxo é limitada pela permeabilidade da membrana plasmática à água. Com a diminuição da temperatura, há maior formação de gelo, e a concentração de solutos na fração não congelada aumenta. Se a taxa de resfriamento é suficientemente lenta para permitir que as células fiquem próximas do ponto de equilíbrio osmótico, então o efluxo de água irá continuar em baixas temperaturas (295). Em taxas de resfriamento altas o suficiente para causar afastamento significativo do ponto de equilíbrio osmótico, onde a cinética de formação de gelo no meio extracelular é muito mais rápida do que

a cinética do efluxo da água da célula, pode ocorrer congelamento intracelular, o que quase sempre está associado aos danos letais observados. Os danos provocados pelo congelamento intracelular estão relacionados à formação, recristalização e liquefação do gelo intracelular (296, 297). Associados a estes últimos, os danos à membrana plasmática são os mais estudados, e talvez a mais importante forma de dano celular causada por congelamento e desidratação (298).

As membranas das células geralmente são afetadas durante os processos de congelamento e descongelamento, sendo a ruptura da membrana plasmática um dos indicadores mais comumente utilizados para se identificar processos de morte celular (299).

Entre os fatores que afetam a eficácia da criopreservação, destacam-se a concentração do crioprotetor, a velocidade do congelamento e a concentração celular (300).

5.2 - CRIOPROTETORES

O estabelecimento de técnicas de criopreservação requer o desenvolvimento de protocolos de adição e retirada dos agentes crioprotetores, com o objetivo de minimizar danos relativos à osmose. O delineamento de um protocolo de criopreservação otimizado deve levar em consideração a seqüência de eventos que ocorrem durante a criopreservação. Inicialmente, as células entram em contato com o crioprotetor, e, nesta etapa, podem ocorrer danos relativos à toxicidade do agente crioprotetor (tóxico à temperatura ambiente) e à alta osmolaridade do meio externo.

Células tronco hematopoiéticas têm sido congeladas com eficácia com um dos três protocolos conhecidos e estudados, quais sejam: CTH aditivadas com DMSO 10% com HES e Albumina ou plasma humano a uma taxa de congelamento ideal de 1C por minuto usando-se nitrogênio líquido ou freezers de congelamento controlado e estocadas em nitrogênio líquido; a segunda técnica envolve as CTH aditivadas com DMSO 10% com HES ou plasma humano seguido de congelamento em freezer mecânico a -80°C por um dia e após estocadas em nitrogênio líquido e,

finalmente, a terceira técnica utiliza DMSO 10% com HES 6% diluídos numa solução eletrolítica ou com albumina 1% e congeladas em freezer mecânico a -80°C (301). Apesar desses três métodos inicialmente propostos, não existe, na literatura, um método padrão e, em decorrência disso, em diferentes centros do mundo, existem inúmeros protocolos de criopreservação.

O DMSO é uma molécula anfipática com um domínio polarizado e dois grupos apolares, tornando-a dessa forma, solúvel em meios orgânicos e aquosos. Além disso, é um solvente muito eficiente e causa ruptura de cadeias de hidrogênio com facilidade. As suas propriedades foram descobertas na década de 1960, porém apenas em 1978 foi aprovado pelo *Federal Drug and Food Administration* (FDA) para ser usado no tratamento da cistite intersticial. Também já foi usado com sucesso no tratamento de edema cerebral, enfermidades musculoesqueléticas, adenocarcinoma pulmonar, doenças reumatológicas, prostatite crônica, doenças dermatológicas, esquizofrenia e como analgésico tópico.

Pela inexistência de um protocolo de criopreservação definitivamente superior, o DMSO tem sido usado de diferentes formas em diferentes centros transplantadores. Um estudo do *European Bone Marrow Transplantation Group* (EBMT) analisou aspectos multicêntricos do DMSO. Foi observada uma incidência de cinquenta por cento de náusea e vômito, e foi atribuída uma resposta vagal secundária à infusão de líquido frio endovenoso. Um total de 444 centros transplantadores foram entrevistados em 2003. Respostas vieram de 97 desses centros, não sendo observado consenso na concentração celular, sendo que as concentrações mais comuns usaram 1×10^8 seguido de 2×10^8 . A dose máxima diária de DMSO dada ao paciente variou de 80 gramas a 20 gramas e os sintomas adversos mais comuns observados foram: cardiovasculares, respiratórios, sistema nervoso central e renal. A incidência de efeitos adversos ao DMSO esteve relacionada à sua concentração e centros que usaram 10% relataram maior incidência de efeitos adversos do que os centros que usaram concentrações menores ou lavagem do crioprotetor antes da infusão (302).

Foi relatado que o DMSO é capaz de produzir efeitos adversos quando administrado em protocolos clínicos, sendo um mecanismo sugerido a liberação da histamina e desgranulação de mastócitos. Existem relatos de caso sugerindo que as

reações anafiláticas, em especial ocorridas nas infusões de enxerto, sejam explicadas pela desgranulação mastocitária induzida pelo DMSO (303). Os principais para-efeitos relacionados ao DMSO são: diarreia, náusea, vômitos, reações anafiláticas, broncoespasmo, insuficiência renal, hipertensão arterial sistêmica, hemoglobinúria, hemólise, bradicardia, arritmias e parada cardíaca (304, 305).

Existem evidências de que a viabilidade e recuperação hematopoiética podem ser mantidas adequadas com concentrações menores que 5% de DMSO(306). O estudo de Galmés A. et al.(2007) (307) demonstrou viabilidades e recuperação hematopoiética semelhantes nos grupos que usaram DMSO 5% e DMSO 10%.

Os mesmos autores verificaram em outro estudo que CTH de sangue periférico podem ser mantidas com viabilidades acima de 80% congeladas em freezer mecânico com DMSO 5% como único crioprotetor por um período não superior a seis meses, a viabilidade começando a diminuir progressivamente após essa data. Aqui, de novo, os desfechos foram semelhantes nas amostras congeladas com DMSO 5% e DMSO 10% (308).

Halle et al. (2001) (309) e Curcoy et al. (2002) (310) investigaram 109 transplantes autólogos após congelamento em freezer sem controle de temperatura e criopreservados com albumina 1%, HES 2,5% e DMSO 3,5% e não encontraram atraso na recuperação hematopoiética apesar de ter ocorrido uma redução razoável na recuperação de células nucleadas, CD34+, CFU-GM e BFU-E.

Abrahamsem et al. (2002) (311) concluíram que CTH humanas criopreservadas em DMSO 5% apresentaram significativamente menos apoptose que as CTH congeladas com DMSO 10% com anexina sendo usada como marcador de apoptose.

O mesmo grupo de pesquisa acima criopreservou amostras de CTH de sangue periférico em concentrações de DMSO de 2, 4, 5 e 10% em 20 pacientes. As amostras foram armazenadas durante 20 semanas e a conclusão foi que as viabilidades foram semelhantes nas amostras de 4 e 5%, enquanto as amostras de 2% apresentaram redução da viabilidade das CTH CD34+, sendo concluído que DMSO 5% é seguro para criopreservar CTH em freezer com controle de temperatura

(312). Em outro estudo de Abrahamsen et al. (2002) (311) foi investigada a viabilidade dos progenitores CFU-GM, CFU-E, CFU-GEMM nos grupos de amostras congeladas por um ano com 5 e 10% DMSO por citometria de fluxo, sendo demonstrada maior viabilidade e formação de colônias no grupo 5% do que no grupo 10%. Os mesmos autores observaram ainda que os resultados acima se repetiram quando foram analisados os progenitores de longo termo (LTC-CFC, responsáveis pela repopulação a longo termo da medula óssea após transplante de medula óssea) (313). Os autores desses estudos trabalham com DMSO 5% como crioprotetor único desde 2003, mas alertam que a sobrevivência das CTH CD34+ é dependente não apenas da concentração do DMSO como também da celularidade da amostra. Demonstraram que, aumentando a celularidade para $3 \times 10^8/\text{ml}$, ocorreu redução na sobrevivência das CTH CD34+, enquanto que no grupo DMSO 10% isso não ocorreu (312).

Outro agente crioprotetor usado com frequência é o HES. Sua molécula não penetra a membrana plasmática como o DMSO, mas forma uma camada protetora externa e previne a sua desidratação. O HES é uma molécula biodegradável e é eliminado pelos rins em 20 horas após a sua aplicação. Em geral, é adicionado ao DMSO, quando se usa concentração menor do mesmo (inferiores à concentração usual de 10%) ou quando se trabalha com freezer sem temperatura controlada (314).

Um terceiro componente da solução crioprotetora é o conteúdo protéico. Supõe-se que sua importância está em modificar a viscosidade da solução crioprotetora. Normalmente usa-se plasma do próprio paciente ou como substituição solução de albumina 4%(314).

Sabemos que a população de CTH CD34+ abrange uma multiplicidade de CTH com diferentes funções entre elas aquelas com função progenitora e aquelas com função precursora como foi visto no capítulo de CTH. O que ainda não se sabe é qual a sensibilidade de cada uma dessas diferentes CTH à criopreservação, porém, já se sabe que granulócitos em geral apresentam elevadas taxas de morte celular ligadas às técnicas de congelamento atuais, e que linfócitos conseguem manter suas propriedades não só quantitativas como qualitativas após período de congelamento (315). Com relação às CTH, sabe-se que elas têm maior tolerância a

baixas temperaturas do que células mais maduras, e que sobrevivem bem quando expostas ao frio intenso em protocolos de criopreservação. Um estudo feito por Balint et al. (1999) analisou a resposta ao congelamento de populações de CD34 muito primitivas e progenitores mais maduros já comprometidos com a linhagem granulocítica, em que foi observado que as CTH muito primitivas sobreviveram melhor ao congelamento quando expostas ao DMSO 10% e em freezers de controle de temperatura. Aqui, supuseram que as CTH primitivas pudessem ter mecanismos que diminuem a concentração intracelular de DMSO e que, por isso, necessitam de uma concentração maior do crioprotetor (316). Com uma conclusão um pouco diferente, dois outros estudos demonstraram perda de viabilidade sobretudo na população específica de precursores comprometidos com a linhagem granulocítica (CFU-GM) após congelamento com altas concentrações de células nucleadas, o que sugere que precursores comprometidos tenham maior susceptibilidade à apoptose induzida pelo frio do que as CTH progenitoras mais primitivas (317, 318).

5.3- CONGELAMENTO E TEMPERATURA

O desenvolvimento das técnicas de criopreservação evoluíram de temperaturas iniciais de -196°C nos anos 80 para temperaturas de -80°C nos anos 90. Atualmente ainda se usa congelamento e armazenamento em nitrogênio líquido a -196°C , porém tal método exige maiores recursos financeiros e operacionais, sendo, portanto, menos difundida do que o congelamento no freezer mecânico a -80°C . Com relação ao nitrogênio líquido, recomenda-se usar o armazenamento na fase de vapor, pois estudos demonstraram contaminação de agentes infecciosos com a fase líquida do nitrogênio.

A taxa de congelamento é um dos principais fatores que influenciam a viabilidade celular durante o processo de congelamento e descongelamento. Foi realizado um estudo (319) em que cinco espécies diferentes de células foram congeladas, incluindo micro-organismos e células da medula óssea, mostrando que, em baixas taxas de congelamento, ou seja, com congelamento lento, a saída de água da célula ocorreu de forma lenta não afetando a estrutura celular; já em taxas

mais rápidas de congelamento, a viabilidade celular foi dramaticamente reduzida. Esses resultados baseiam-se na hipótese de que se o fluxo de água é mais rápido que o fluxo de calor, então não irá ocorrer cristalização intracelular e a taxa de viabilidade será alta. Em contraste, se o fluxo de calor é igual ao da água, então a taxa de congelamento induzirá à cristalização da água intracelular, durante a osmose, um processo que parece provocar a morte celular. Por essas razões, os freezers com temperatura controlada ainda são considerados padrões na criopreservação. Nesses freezers, o congelamento ocorre a 1-2°C/ minuto até a temperatura de -40°C, quando então se processa um congelamento mais rápido até -120°C. Por motivos financeiros e de especialização de mão de obra, diversos estudos têm demonstrado o uso de freezers sem controle de temperatura onde as CTH são resfriadas a 4°C e, em seguida, congeladas a -80°C. Os resultados de descongelamento e viabilidade células nesses freezers têm sido semelhantes aos primeiros, pelo menos quando o período de congelamento não ultrapassa seis meses, quando, nos últimos meses, a viabilidade celular começa a diminuir de forma mais acelerada. Portanto, quando o armazenamento de CTH é necessário por períodos prolongados, recomenda-se (320) freezers de temperatura controlada. Já existem estudos mostrando viabilidade celular no descongelamento adequada em hemocomponentes congelados por 10 anos (321-323).

A estocagem das CTHs congeladas pode ser realizada em refrigerador mecânico a -80°C ou em tanques com nitrogênio líquido a -196°C. (324). O período de tempo que as CTHs podem ser estocadas, sem prejuízos para a viabilidade, é desconhecido. No entanto, estudos demonstram que a estocagem em nitrogênio líquido propicia um maior tempo de estocagem sem afetar a qualidade das CTHs (227, 325-327). O descongelamento das células é realizado em banho de imersão a 37°C e a reinfusão destas células ocorre, imediatamente, após o descongelamento (328).

5.4- CONCENTRAÇÃO CELULAR

Os protocolos de criopreservação das CTHs obtidas da medula óssea utilizavam a concentração celular máxima de 2×10^7 células/mL (320). A criopreservação das células mobilizadas do sangue periférico com estes protocolos resultaria em grande volume do produto final e proporcionalmente de DMSO a ser infundido. A redução do volume final do produto criopreservado com consequente aumento da concentração celular tem sido proposta como alternativa para contornar estas limitações. No entanto, poucas instituições que realizam a criopreservação de células para transplante estudaram os efeitos do aumento da concentração sobre a recuperação celular e a cinética da recuperação hematopoiética em pacientes transplantados (329-332). As diferentes metodologias empregadas nestes estudos têm como consequência a falta de comparabilidade entre os resultados propostos. Apesar da falta de padronização dos protocolos de criopreservação utilizados, diversos centros de transplante do mundo realizam a criopreservação com a concentração celular de 2×10^8 células/mL e 10% de DMSO (333, 334).

Existem crescentes evidências que o número de células nucleadas totais no enxerto criopreservado está diretamente relacionado com maior morte celular e perda de viabilidade (335). Esse feito provavelmente deriva dos granulócitos contaminantes que sobrevivem pouco ao frio extremo e liberam citocinas inflamatórias como elastase, metaloproteinase-9, interleucina 1- β e interleucina-6 tanto citotóxicas quanto envolvidas no *homing* celular (336). Além desse mecanismo citotóxico, enxertos congelados com altas concentrações celulares estão associados a uma maior presença de micro coágulos e agregados celulares. Tais componentes indesejados foram associados a uma maior toxicidade clínica ao paciente no momento da infusão (337).

Perseghin et al. (1997) avaliaram 23 produtos de leucaféreses, criopreservados até 2×10^8 células/mL, quanto à recuperação da viabilidade celular e dos progenitores CFU-GM, CFUGEMM e BFU-E. Nesse estudo, o congelamento das CTHs mobilizadas até a concentração celular de 2×10^8 células/mL não prejudicou a viabilidade celular e nem da recuperação dos progenitores CFU-GM, CFU-GEMM e BFU-E (332). Kawano et al. (2004) estudaram o efeito da

concentração celular em protocolos que utilizam 5% de DMSO e congelamento rápido, em refrigeradores sem controle de temperatura de congelamento. Dois protocolos de congelamento com concentração celular entre $0,2$ a $0,5 \times 10^8$ células/mL e 2×10^8 células/mL foram comparados quanto à viabilidade celular após o descongelamento, recuperação dos progenitores CFU-GM e tempo para a recuperação hematopoiética após o transplante com CTHs mobilizadas para o sangue periférico. Os autores demonstraram que a concentração celular de 2×10^8 células/mL não prejudica a viabilidade celular, a recuperação dos progenitores CFU-GM, nem a recuperação hematopoiética dos pacientes, quando comparados com o protocolo com $0,2$ a $0,5 \times 10^8$ células/mL.

Na tentativa de diminuir os custos com o procedimento de criopreservação e a toxicidade da infusão de grande volume de DMSO, tem sido avaliados protocolos de criopreservação que utilizam concentração celular alta. O primeiro estudo avaliando o efeito do aumento da concentração celular durante a criopreservação das CTHs foi publicado por Rowley et al. (1994) (338). Nesse estudo, 108 produtos de leucaféreses, criopreservados com concentração média de $3,7 \times 10^8$ células/mL ($0,4$ - $8,0 \times 10^8$ células/mL), foram analisados quanto à viabilidade celular após o descongelamento e a recuperação da viabilidade celular e dos progenitores CFU-GM. Os autores demonstraram não haver correlação estatisticamente significativa entre o aumento da concentração celular criopreservada, a viabilidade das células mononucleares após o descongelamento, a recuperação das células nucleadas, a recuperação dos progenitores CFUGM e a recuperação das células CD34 positivas. No mesmo estudo, os autores avaliaram o efeito do aumento da concentração celular criopreservada em amostras obtidas de produtos de leucocitaféreses, do mesmo paciente, concentradas de duas a vinte e quatro vezes. Os resultados desta análise pareada demonstraram que o aumento da concentração celular no congelamento de CTHs prejudica a recuperação dos progenitores eritróides BFU-E (Explosão/Surgimento de Unidade Formadores-Eritrócitos). Pacientes que receberam transplante com produtos de leucocitaféreses, criopreservados com concentração média de $3,8 \times 10^8$ células/mL, e foram avaliados pacientes que receberam transplante de medula óssea, com a concentração média de $0,71 \times 10^8$ células/mL quanto ao tempo para recuperação dos neutrófilos e plaquetas após transplante autólogo. O aumento da concentração celular criopreservada não

demonstrou ter influência para a recuperação hematológica após o transplante autólogo (82). Cabezudo et al. (2000) realizaram um estudo em três fases onde predominou a análise pareada. Na primeira fase, dezenove produtos de leucocitaféreses foram observados quanto à viabilidade após o descongelamento, a recuperação da viabilidade celular e da capacidade clonogênica dos progenitores CFU-GM. Duas alíquotas foram retiradas de cada produto de leucocitaféreses e criopreservadas em diferentes concentrações com mediana de $0,94 \times 10^8$ células/mL e $2,91 \times 10^8$ células/mL, respectivamente. Na segunda fase do estudo, 21 produtos de leucocitaféreses foram criopreservados em diferentes concentrações com mediana de $0,90 \times 10^8$ células/mL e $3,32 \times 10^8$ células/mL, e foi analisada quanto à viabilidade após descongelamento, recuperação da viabilidade celular e capacidade clonogênica dos progenitores CFU-GM. Os resultados do estudo demonstram que a alta concentração celular no congelamento prejudica a recuperação da viabilidade celular, mas não prejudica a capacidade clonogênica dos progenitores. Na terceira fase do estudo, o tempo para a recuperação de granulócitos e plaquetas de dez pacientes que realizaram transplante autólogo com os produtos de leucocitaféreses congelados com a mediana de $2,4 \times 10^8$ células/mL (1,5-4,7) foi comparado com dez pacientes que receberam transplante com 1×10^8 células/mL. O aumento da concentração celular criopreservada não demonstrou ser influente para a recuperação hematológica após o transplante autólogo (339). Martin-Henao et al. (2005) desenvolveram um estudo retrospectivo envolvendo a análise de 1065 produtos de leucocitaféreses obtidos de 450 pacientes. Dois protocolos utilizados para o congelamento das CTHs mobilizadas para o sangue periférico foram avaliados quanto à viabilidade celular, recuperação da viabilidade celular e capacidade clonogênica dos progenitores CFU-GM. A mediana da concentração celular no protocolo A foi de $0,82 \times 10^8$ células/mL (0,12-1,56) e no protocolo B foi de $1,56 \times 10^8$ células/mL (0,16-6,78). O protocolo B, com maior concentração, resultou em prejuízo à viabilidade celular e à capacidade clonogênica dos progenitores CFUGM. No entanto, a mediana do tempo para recuperação hematopoética não foi estatisticamente diferente entre os grupos de pacientes que receberam transplante autólogo com produtos criopreservados nos protocolos avaliados (340).

6- APOPTOSE

O termo apoptose foi descrito na década de setenta, com base em estudos de morte celular fisiológica. A apoptose é um programa para a eliminação ou deleção de células desencadeada por sinais fisiológicos ou anormais. Foi proposto que a apoptose é programada durante o desenvolvimento celular, deduzindo que algum tipo de relógio molecular interno esteja envolvido no desencadeamento da morte celular, indiferentemente aos sinais adjacentes. Entretanto, estudos comprovam que há casos em que a morte celular fisiológica pode ser desencadeada por sinais externos (341).

Os processos de morte celular conhecidos como apoptose e necrose podem ser diferenciados a partir da observação de alterações morfológicas e bioquímicas (342). Estas alterações são dependentes da duração e da intensidade dos estímulos, velocidade do processo de morte, bem como da extensão da depleção de adenosina trifosfato (ATP), observados nas células envolvidas (343).

A morte celular por necrose é conseqüente a estímulos intensos e de curta duração. Este processo caracteriza-se pelo aumento do volume intracelular, cariólise e lise da célula. Em virtude do envolvimento de elevado número de grupos celulares e da perda precoce dos componentes citoplasmáticos para o espaço extracelular, a necrose geralmente resulta em resposta inflamatória intensa (344), com freqüência, este processo não requer o consumo dos suprimentos energéticos celulares (345).

A morte celular por apoptose, por sua vez, decorre de estímulos de menor intensidade, mas de duração prolongada (342), como por exemplo: ligante Fas, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e ligantes TRAIL/APO 2-L e APO 3-L (346, 347). A atuação destes estímulos resulta na ativação regulada de programas de execução preexistentes, codificados no genoma (348).

Durante a apoptose, o material celular é freqüentemente preservado, o que por sua vez, resulta em resposta inflamatória e dano tecidual local menos intensos em relação àqueles observados na necrose (349). O consumo de ATP, por outro

lado, faz-se necessário para promover as mudanças do compartimento nuclear durante este processo de morte celular (350, 351).

A apoptose participa de forma complementar, ainda que oposta, ao processo de divisão celular como um mecanismo homeostático da morfogênese e reconstrução tecidual normal (352-356). Igualmente, esse processo é importante na remoção de células danificadas, infectadas ou potencialmente neoplásicas (345, 357-362).

Embora requisitada essencialmente durante o desenvolvimento animal, a morte celular por apoptose prossegue ao longo da vida adulta. Em animais adultos, a apoptose promove o balanço da divisão celular e favorece o equilíbrio celular dos tecidos (344). Além disso, a remoção de células afetadas por defeitos genéticos, pelo avanço da idade, por doenças ou por exposição a agentes nocivos, ocorre possivelmente, devido à apoptose (363).

Outros processos fisiológicos caracteristicamente regulados por apoptose incluem: involução da mama após o desaleitamento (364), desprendimento do endométrio durante a menstruação, impotência induzida por atrofia prostática, morte das células epidérmicas que migram da camada germinal basal à superfície do epitélio escamoso, morte de neutrófilos durante a resposta inflamatória aguda e exclusão de tímócitos auto-reativos durante o desenvolvimento de linfócitos T.

Em alguns casos, a apoptose pode também formar a base para o tratamento de patologias. O tratamento de tumores por radiação e quimioterapia, por exemplo, envolve a ativação seletiva da apoptose nas células neoplásicas (345).

Por outro lado, a execução fisiologicamente anormal da apoptose pode estar associada a processos patológicos (363). Assim, tanto a exacerbação quanto a diminuição deste processo de morte celular podem promover conseqüências biológicas adversas (357, 358), como as verificadas nas doenças neurodegenerativas de Alzheimer e Parkinson, SIDA e isquemia cardíaca, bem como na artrite reumatóide e nos diferentes tipos de câncer, respectivamente (365, 366).

A apoptose consiste-se, basicamente, em três estágios sucessivos: (1) o comprometimento à morte provocado por sinais extras e intracelulares; (2) execução

da morte celular por ativação de proteases intracelulares; (3) formação e remoção dos corpos apoptóticos por fagocitose, seguido da degradação lisossomal pelas células fagocíticas (367).

A indução da apoptose pode ocorrer em decorrência da ligação de moléculas sinalizadoras a seus receptores cognatos localizados na superfície das células, entre os quais: (1) ligante Fas (FasL) ao receptor Fas (CD95) (357, 359-362, 368-370), (2) ligante TNF- α ao receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1) (371-373), (3) ligantes TRAIL/APO 2-L (ligantes indutores de apoptose relacionado ao TNF) aos receptores TRAIL/R dos tipos 1 e 2 (374), (4) ligante APO 3-L ao receptor DR 3 (345).

Após a ligação das moléculas protéicas sinalizadoras FasL e TNF- α a seus respectivos receptores Fas e TNFR1, proteínas associadas à membrana, conhecidas como “domínios de morte”, são clivadas pela ação de metaloproteases (346, 358, 375-380). A ativação destes domínios de morte promove o recrutamento das proteínas adaptadoras FADD /Mort-1(domínio de morte associado ao Fas) (363, 381) e TRADD (domínio de morte associado ao receptor TNF) respectivamente, (382-384) para formar complexos sinalizadores de indução da morte (DISC) (385-393).

Em conseqüência ao recrutamento dos domínios de morte FADD e TRADD, tem início a ativação seqüencial da família das cisteíno-proteases também conhecidas como caspases. As caspases são sintetizadas como zimógenos inativos que se tornam ativos após a remoção de um pró-domínio terminal (394, 395). Caspases ativadas catalisam a clivagem de outras caspases, que por sua vez, ativam diversas proteases e endonucleases celulares promotoras da apoptose. Como exemplos, a caspase 8, também conhecida como FLICE, MACH e MACH 5 e a caspase 3 (CPP32) estão envolvidas na apoptose mediada pela ligação ao Fas, TNFR1 e receptores TRAIL/R1, TRAIL/2-R e DR 3 (374, 396-403).

A formação dos complexos sinalizadores de indução da morte (DISC) promove a ativação da enzima iniciadora caspase 8 (404-408), que por sua vez, ativa a enzima efetora, caspase . A atividade da caspase 3 tem como conseqüência a degradação de proteínas nucleares e celulares, assim como a decomposição do

DNA cromossômico. A caspase 8 pode, também, ativar a caspase 3 através da clivagem da proteína Bid, que por sua vez, é translocada à superfície da mitocôndria e interage seqüencialmente com as proteínas externas da membrana mitocondrial. Como resultado, tem-se a formação de poros que permitem a liberação do citocromo C e a ativação da enzima iniciadora caspase 9, devido a ativação do fator de ativação de proteases pro-apoptóticas (Apaf-1). A caspase 9, por sua vez, ativa a caspase 3, responsável pela degradação das proteínas celulares e nucleares e pela ativação da proteína CAD (Caspase-activated DNase) (345, 409).

Outras proteínas adaptadoras como FLASH (FLICE-associated huge protein), que se associam aos domínios efetores de morte (DED) da caspase 8, proteínas inibidoras como FLIP (FLICE-inhibitory protein) e proteínas envolvidas em mecanismos de sobrevivência como RIP (Receptor-interaction protein) podem atuar sobre o processo apoptótico, determinando, assim, a sobrevivência ou a morte celular (410, 411).

Nos estágios iniciais da apoptose, os níveis citoplasmáticos de cálcio bivalente são reduzidos e o volume celular diminui, enquanto o contato com as células vizinhas e a matriz extracelular é perdido. O efluxo do cálcio intracelular resulta num acentuado declínio do potencial transmembrana da mitocôndria e, conseqüentemente, no estresse oxidativo da célula (412, 413). O conseqüente aumento da permeabilidade da membrana plasmática, por sua vez, promove a diminuição da atividade esterásica intracelular em decorrência da presença de toxinas no citoplasma. Dessa forma, a cromatina é clivada em fragmentos oligonucleossomais pela ativação de endonucleases cálcio-magnésio dependentes e condensada em cápsulas granulares periféricas. Finalmente, a superfície celular forma vesículas, que resultam na formação dos corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos, por sua vez, são reconhecidos e fagocitados pelos macrófagos e células vizinhas (412, 413). A membrana plasmática passa, então, a exibir modificações, como a perda de junções intercelulares. Verifica-se, ainda, a translocação de resíduos de fosfatidilserina à face externa da membrana plasmática, que fisiologicamente se encontram confinados na face interna da bicamada lipídica das células (414-426).

6.1- INDUÇÃO DA APOPTOSE POR AGENTES FÍSICO-QUÍMICOS EXTERNOS

A ação de quimioterápicos, a radiação ultravioleta e a radiação ionizante podem também induzir mudanças mitocondriais que promovem o aumento da permeabilidade e a perda do potencial transmembrana mediados geralmente pela formação de radicais livres com envolvimento do gene supressor de tumores p53, que inicia o processo apoptótico pelo aumento da transcrição de proteínas como Bax (345, 427-429).

Enquanto a falta de estímulos de sobrevivência atua sobre Bax por mecanismos que envolvem MAP kinase e PI-3 kinase, a hipóxia e a depleção de ATP atuam diretamente sobre esta proteína que, ao se translocar para a superfície da mitocôndria, forma poros que permitem a liberação de citocromo C [244]. Conseqüentemente, proteínas reguladoras da apoptose, incluindo Apaf-1 e caspase 9, são liberadas e iniciam a ativação das caspases, levando à apoptose (345, 427-429).

6.2- MÉTODOS DE DETECÇÃO DA APOPTOSE

A apoptose representa um processo ativo de remoção celular que freqüentemente requer ativação gênica, síntese protéica e ativação de endonucleases. Morfologicamente, este processo caracteriza-se pela condensação da cromatina, diminuição do citoplasma, formação de vesículas a partir da membrana e, finalmente, formação dos corpos apoptóticos (374, 430, 431).

Com base na detecção de tais alterações morfológicas, diferentes metodologias como eletroforese, microscopia eletrônica e citometria de fluxo são amplamente empregadas na avaliação da apoptose (419, 420, 432).

A fragmentação do DNA por endonucleases, por exemplo, é classicamente demonstrada por eletroforese como uma graduação típica de DNA, enquanto o

percentual de fragmentação pode ser determinado por métodos colorimétricos após a separação dos fragmentos por ultra-centrifugação (433).

A principal falha desses métodos, posto que são desenvolvidos com todo o extrato nuclear, é a inabilidade em determinar diretamente o percentual de fragmentos nucleares e em reconhecer as células apoptóticas em populações celulares heterogêneas. Além disso, a clivagem internucleossomal detectada por eletroforese e por coloração histoquímica do núcleo pelo método de TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) (434-436), por exemplo, não permitem distinguir entre a célula necrótica e a apoptótica (437-440). Tal constatação deve-se ao fato de que os meios proteolíticos que operam na necrose podem também promover a ativação de enzimas que clivam o DNA em fragmentos internucleossomais indistinguíveis daqueles observados durante a apoptose.

Alternativamente, a fragmentação do DNA pode ser visualizada a partir da quantificação percentual de bases celulares por ensaios de transferência de marcação *in situ* (*ISNT, in situ nick translation*). Contudo, as evidências morfológicas da apoptose nem sempre são acompanhadas pela clivagem do DNA, podendo acarretar em interpretações subestimadas a respeito deste mecanismo de morte celular (441-451).

A utilização de microscopia eletrônica associada a corantes fluorescentes, embora permita detectar o processo apoptótico por criteriosa avaliação morfológica, torna-se inapropriada na quantificação da apoptose, posto que a marcação das células, geralmente realizada através de marcadores não vitais, ocorre somente após o dano da membrana (419, 420, 432, 452, 453).

As metodologias que incluem a avaliação e quantificação das populações celulares por citometria de fluxo fornecem análises mais precisas e reprodutíveis do processo de morte celular por apoptose. Na citometria de fluxo, a redução do volume celular e o aumento da granulosidade das células apoptóticas podem ser avaliados a partir de modificações nos padrões FSC e SSC de dispersão da luz, respectivamente (433, 454-458).

Entre os marcadores nucleares e corantes fluorescentes comumente utilizados nos ensaios de verificação e quantificação da apoptose por citometria de fluxo, destacam-se: iodeto de propídio, brometo de etídio, homodímero de etídio, 7-aminoactinomicina D (7-AAD), acridine orange, anexina-V-FITC e calceína AM (342, 430, 459-462).

Os métodos citoquímicos, como aqueles que utilizam 7-aminoactinomicina D (7-AAD) e iodeto de propídio ou acridine orange e brometo de etídio, são amplamente empregados e podem ser mais ou menos específicos na análise da apoptose. A perda progressiva da integridade da membrana, por exemplo, pode ser avaliada pela incorporação de 7-aminoactinomicina D (7-AAD) ao DNA, que permite distinguir as células apoptóticas precoces das inviáveis. Assim, células em estágios iniciais de apoptose são fracamente marcadas com 7-AAD, enquanto as células inviáveis permitem a penetração efetiva deste marcador. Entretanto, os percentuais médios de apoptose em células mononucleares de pacientes infectados pelo HIV obtidos pelo método 7-AAD/PI podem ser subestimados devido à interferência de eritrócitos com o corante 7-aminoactinomicina D (7-AAD). O corante vital 7-AAD é usado normalmente em conjunto com a Anexina para identificar células apoptóticas precoces. Células com membrana plasmática intacta excluem o 7-AAD enquanto que células com dano avançado ficam permeáveis a esse corante vital.

A anexina-V se mostrou útil na detecção de células apoptóticas em decorrência de sua ligação preferencial a fosfolípidios negativamente carregados, como a fosfatidilserina exposta no início do processo apoptótico. A conjugação do corante Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) à anexina-V, permite identificar e quantificar as células apoptóticas através da citometria de fluxo (463-467).

Portanto, as células viáveis apresentam negatividade dupla para a marcação com Anexina-V e 7-AAD, as células positivas apenas para Anexina-V revelam apoptose precoce e células com dupla positividade para Anexina-V e 7-AAD são consideradas mortas tardias (*Late apoptosis or dead cells*). Células que marcam para 7-AAD são células que também apresentam alterações morfofuncionais de morte celular já que são incapazes de excluir o corante. O método de marcação não distingue se o processo de morte celular foi causado por necrose ou por apoptose.

O primeiro trabalho que estudou apoptose em CTH de sangue periférico congeladas foi feito pela equipe de Abrahamsen JF et al. (2002) (468). Nesse trabalho eles estudaram 22 amostras de CTH congeladas usando a técnica de Anexina-V e Actinomicina D (apoptose precoce e tardia respectivamente). A concentração celular média ficou entre 1 e 2 x 10⁸ células/ml e o DMSO foi usado a 10% e armazenadas em freezer com controle de temperatura a -180°C. Nesse estudo, encontraram 81% de CTH CD34+ viáveis (relataram estudo prévio de Anthony et al. (469) com resultados semelhantes de 87,6% de CTH CD34+ viáveis com Anexina). O que foi surpresa para o grupo foi que uma média de 31% da população total congelada (sobretudo células mais maduras) apresentavam apoptose inicial e 33%, apoptose tardia, o que foi entendido como que corroborando a idéia que diferentes tipos celulares apresentam diferentes capacidades e mecanismos para tolerar o congelamento, e que, conforme já demonstrado com congelamento de neutrófilos e precursores comprometidos com a linhagem, essas células apresentam altos índices de apoptose quando submetidas ao congelamento. Outra questão que o grupo levantou com esses achados foi que talvez a toxicidade observada na infusão desses enxertos com uma média de 35% de células mortas possa não ser causada pela toxicidade exclusiva do DMSO, mas pela toxicidade, pelo menos em parte, da infusão de células necróticas e apoptóticas embebidas com citocinas inflamatórias no enxerto.

Com relação à utilização dos marcadores vitais para definir apoptose, o 7-AAD tem sido usado em muitos centros para definir células mortas. Porém, como visto acima, existe uma população de células apoptóticas precoces definidas somente pela Anexina-V que não são consideradas quando se usa somente o corante vital 7-AAD. Pelo menos dois estudos demonstraram a presença de uma razoável quantidade de células CTH apoptóticas precoces nos enxertos descongelados (470, 471).

A importância de se considerar as células apoptóticas precoces foi estudada por de Boer et al. (2002) usando conjuntamente marcadores de apoptose precoce e tardia, onde foi constatado um número de quase 40% de células já em processo de morte celular num enxerto descongelado. Segundo os autores, isso implicaria numa reconsideração do número alvo de CTH CD34+ necessários para o transplante,

tornando os reais valores cerca de duas a três vezes menores àqueles descritos na literatura. O mais interessante é que mesmo com uma mortalidade celular considerável de quase 50% do enxerto, a recuperação hematopoiética não foi afetada, sugerindo que as células mortas não são aquelas envolvidas diretamente com a hematopoiese que são as CTH primitivas e de repopulação de longo termo. Já existem evidências de que tais células são mais resistentes ao congelamento do que células precursoras hematopoiéticas mais maduras (471).

Outro aspecto pouco visto, mas considerado pelo grupo de Abrahamsen foi a perda celular durante o congelamento analisada pela comparação das CTH CD34+ viáveis antes e depois do descongelamento. Nesse estudo, foram analisados 51 enxertos congelados, sendo observado que a medida do CD34 positivo antes e após o congelamento se relacionou independentemente à recuperação hematopoiética, sugerindo, portanto, que a simples quantificação do CD34 positivo viável antes do congelamento é suficiente para prever o desfecho da recuperação hematológica (46).

Na mesma linha de pensamento, Sartori M. et al. (2005) estudaram 79 enxertos e as viabilidades de CD34 antes do congelamento e após o descongelamento, achando recuperação de CD34+ viáveis de 91 e 94% nas populações adulta e pediátrica respectivamente (84).

7- CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO ENXERTO CRIOPRESERVADO

Já são conhecidas de longa data as reações transfusionais febris não-hemolíticas. Constituem-se em efeitos adversos que incidem em 0,5% das transfusões e podem chegar a 15% naqueles pacientes que já tiveram história de ter apresentado esse quadro em transfusões prévias. Ocorrem em 3 a 7% dos pacientes que recebem hemácias e em cerca de 20% daqueles que recebem concentrados de plaquetas. São causados pela presença de leucoaglutininas presentes no plasma do receptor. A alo imunização é resultado da exposição a antígenos por transfusões prévias, transplante de órgãos e gestação. As leucoaglutininas são direcionadas contra antígenos presentes nos monócitos, granulócitos e linfócitos. Desde a descoberta desse tipo de reação, as leucoaglutininas foram consideradas responsáveis pelas reações transfusionais não-hemolíticas. Após o advento de filtro de leucócitos nas transfusões, o seu impacto diminuiu e começou a se levantar a possibilidade de outros componentes presentes nos tecidos a serem transfundidos como agentes causadores de tais reações, sendo os componentes as citocinas liberadas por diferentes classes de células hematopoiéticas durante o armazenamento do hemocomponente. Exemplos dessas citocinas são a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral (TNF- α) e RANTES (CCL5) (92, 472-476). Corroborando tal hipótese, estão estudos que usaram filtros de leucócitos antes do armazenamento do hemocomponente, e, nesses casos, a incidência de reações adversas transfusionais foi reduzida quase a zero. Em alguns países, já é praticada a redução leucocitária universal, que consiste no uso de filtros de leucócitos antes da estocagem, porém esse é um procedimento de alto custo e, portanto, não sendo feito em todos os centros transfusionais.

Heddle et al. (1995) investigaram exaustivamente a correlação entre citocinas no sobrenadante de hemocomponentes e as reações transfusionais não-hemolíticas concluindo que a IL-1 β e a IL-6 tinham forte correlação com as reações adversas (477-494). Assim como Heddle, Aye et al. (2001) concluíram que o uso de filtro de

leucócitos antes do armazenamento reduz os níveis de citocinas inflamatórias e, conseqüentemente, a incidência de reações transfusionais adversas.

Com relação ao contexto do transplante de medula, esse raciocínio torna-se ainda mais importante na tentativa de explicar os efeitos adversos durante a infusão de enxertos congelados, pois, aqui, o número de leucócitos no enxerto é sempre muito maior pelo próprio processo de leucocitaférese, e o uso de filtros de leucócitos é proibitivo já que, no transplante, as CTH CD34 positivas, que se constituem no principal objetivo do procedimento, estão na camada de leucócitos coletadas pela aférese. Com a criopreservação e conseqüente apoptose precoce e tardia de quase 40% do enxerto como visto anteriormente, o que se espera é uma quantidade muito maior de citocinas inflamatórias no enxerto e conseqüentemente uma maior incidência de reações adversas do paciente no momento da infusão.

Um estudo clássico realizado por Córdoba et al. (2007) (495) correlacionou a incidência de efeitos adversos durante a infusão de enxertos com o número de granulócitos presentes no produto da leucocitaférese. Eles encontraram na análise multivariada dois fatores de risco para o desenvolvimento de reações adversas na infusão a saber: número de granulócitos no enxerto e presença de microagregados celulares. Sabe-se que esses microagregados celulares estão diretamente relacionados ao número de células nucleadas totais no enxerto.

8 - OBJETIVOS

8.1- Objetivo Geral :

Estudar a viabilidade das CTH mensurada pela técnica de Anexina e 7-AAD em citômetro de fluxo com a concentração do agente crioprotetor DMSO.

8.2- Objetivos Específicos:

a) Analisar a relação entre a viabilidade das CTH e as diferentes concentrações do agente único crioprotetor DMSO (5%, 2,5% e 1,25%) com relação ao grau de complexidade através do padrão de granularidade citoplasmática e tamanho celular nos grupos de Baixa complexidade e Alta complexidade.

b) Analisar a relação entre a viabilidade das CTH e as diferentes concentrações do DMSO (5%, 2,5% e 1,25%) utilizado concomitantemente com o HES e a Albumina Humana como solução crioprotetora, com relação ao grau de complexidade através do padrão de granularidade citoplasmática e tamanho celular nos grupos de Baixa e Alta complexidade.

c) Analisar a relação entre o nível de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α) com a apoptose e a viabilidade celular após o descongelamento, nos grupos de concentrações de DMSO de 5% e 2,5% na solução crioprotetora composta de DMSO, HES e Albumina Humana.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anthony BA, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends in immunology*. 2014;35(1):32-7.
2. Boyd AL, Bhatia M. Bone marrow localization and functional properties of human hematopoietic stem cells. *Current opinion in hematology*. 2014;21(4):249-55.
3. Ema H, Morita Y, Suda T. Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Experimental hematology*. 2014;42(2):74-82 e2.
4. Kohli L, Passegue E. Surviving change: the metabolic journey of hematopoietic stem cells. *Trends in cell biology*. 2014.
5. Quesenberry PJ, Goldberg L, Aliotta J, Dooner M. Marrow Hematopoietic Stem Cells Revisited: They Exist in a Continuum and are Not Defined by Standard Purification Approaches; Then There are the Microvesicles. *Frontiers in oncology*. 2014;4:56.
6. Anderson KC. Autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Journal of clinical apheresis*. 1995;10(3):131-8.
7. Au WY, Chan EC, Lie AK, Liang R, Leung AY, Ma SK, et al. Poor engraftment after allogeneic bone marrow transplantation: role of chimerism analysis in treatment and outcome. *Annals of hematology*. 2003;82(7):410-5.
8. Carella AM, Podesta M, Frassoni F, Raffo MR, Pollicardo N, Pungolino E, et al. Collection of 'normal' blood repopulating cells during early hemopoietic recovery after intensive conventional chemotherapy in chronic myelogenous leukemia. *Bone marrow transplantation*. 1993;12(3):267-71.
9. Chung IJ, Lee JJ, Park MR, Kook H, Cho SH, Hwang TJ, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell rescue of late graft failure after bone marrow transplantation in patients with aplastic anemia. *Journal of Korean medical science*. 2002;17(4):468-74.
10. Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, et al. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Experimental hematology*. 1999;27(9):1460-6.
11. Koumakis G, Filis J, Vassilomanolakis M, Papanastasiou K, Hajichristou H, Barbounis V, et al. Relation between hematological recovery and number of transplanted mononuclear cells in patients after high dose chemotherapy with

peripheral blood stem cell rescue. *Blood cells, molecules & diseases*. 1995;21(3):235-8.

12. Lee SH, Lee MH, Lee JH, Min YH, Lee KH, Cheong JW, et al. Infused CD34+ cell dose predicts long-term survival in acute myelogenous leukemia patients who received allogeneic bone marrow transplantation from matched sibling donors in first complete remission. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2005;11(2):122-8.

13. Mavroudis D, Read E, Cottler-Fox M, Couriel D, Molldrem J, Carter C, 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.

14. Mavroudis DA, Read EJ, Molldrem J, Raptis A, Plante M, Carter CS, et al. T cell-depleted granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) modified allogeneic bone marrow transplantation for hematological malignancy improves graft CD34+ cell content but is associated with delayed pancytopenia. *Bone marrow transplantation*. 1998;21(5):431-40.

15. Min CK, Kim DW, Lee JW, Min WS, Kim CC. Additional stem cell therapy for graft failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Acta haematologica*. 2000;104(4):185-92.

16. Okamura A, Yakushijin K, Inui Y, Funakoshi Y, Kawamori Y, Shimada T, et al. Successful neutrophil engraftment by reduced use of granulocyte colony-stimulating factor after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with mycophenolate mofetil for graft-versus-host disease prophylaxis. *International journal of hematology*. 2011;93(6):765-70.

17. Rahman J, Chowdhury SA. Peripheral blood cells transplantation--a review article. *Bangladesh Medical Research Council bulletin*. 1999;25(1):14-23.

18. Wiesneth M, Schreiner T, Bunjes D, Bischof C, Erne E, Maccari B, et al. Comparison of T-cell-depleted BMT and PBPC with respect to chimerism, graft rejection, and leukemic relapse. *Journal of hematotherapy*. 1999;8(3):269-74.

19. Akkok CA, Liseth K, Hervig T, Ryningen A, Bruserud O, Ersvaer E. Use of different DMSO concentrations for cryopreservation of autologous peripheral blood stem cell grafts does not have any major impact on levels of leukocyte- and platelet-derived soluble mediators. *Cytotherapy*. 2009;11(6):749-60.

20. Alexander ET, Towery JA, Miller AN, Kramer C, Hogan KR, Squires JE, et al. Beyond CD34+ cell dose: impact of method of peripheral blood hematopoietic stem cell mobilization (granulocyte-colony-stimulating factor [G-CSF], G-CSF plus plerixafor, or cyclophosphamide G-CSF/granulocyte-macrophage [GM]-CSF) on number of colony-forming unit-GM, engraftment, and Day +100 hematopoietic graft function. *Transfusion*. 2011;51(9):1995-2000.
21. Bai L, Xia W, Wong K, Reid C, Ward C, Greenwood M. Factors predicting haematopoietic recovery in patients undergoing autologous transplantation: 11-year experience from a single centre. *Annals of hematology*. 2014.
22. Barbui T, Cortelazzo S, Rossi A, Viero P, Bellavita P, Buelli M, et al. Factors for rapid and sustained hematopoietic reconstitution by circulating progenitor-cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1996;38 Suppl:S110-4.
23. Bensinger WI, Longin K, Appelbaum F, Rowley S, Weaver C, Lilleby K, et al. Peripheral blood stem cells (PBSCs) collected after recombinant granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF): an analysis of factors correlating with the tempo of engraftment after transplantation. *British journal of haematology*. 1994;87(4):825-31.
24. Calvet L, Cabrespine A, Boiret-Dupre N, Merlin E, Paillard C, Berger M, et al. Hematologic, immunologic reconstitution, and outcome of 342 autologous peripheral blood stem cell transplantations after cryopreservation in a -80 degrees C mechanical freezer and preserved less than 6 months. *Transfusion*. 2013;53(3):570-8.
25. Canales MA, Arrieta R, Hernandez-Garcia MC, Ojeda E, Diez J, Calero F, et al. Factors influencing collection and engraftment of CD34+ cells in patients with breast cancer following high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Journal of hematotherapy & stem cell research*. 2000;9(1):103-9.
26. Camacho Villa AY, Reyes Maldonado E, Montiel Cervantes LA, Vela Ojeda J. CD133+CD34+ and CD133+CD38+ blood progenitor cells as predictors of platelet engraftment in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2012;46(3):239-44.

27. Ciavarella D. Hematopoietic stem cell processing and storage. *Biotechnology*. 1991;19:317-49.
28. de Wynter EA, Emmerson AJ, Testa NG. Properties of peripheral blood and cord blood stem cells. *Bailliere's best practice & research Clinical haematology*. 1999;12(1-2):1-17.
29. Dercksen MW, Rodenhuis S, Dirkson MK, Schaasberg WP, Baars JW, van der Wall E, et al. Subsets of CD34+ cells and rapid hematopoietic recovery after peripheral-blood stem-cell transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1995;13(8):1922-32.
30. Feugier P, Thevenin S, Billot M, Serrurier B, Loigerot C, Schooneman F, et al. Comparison of T cell depletion strategies from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood using five separation systems. *Hematology and cell therapy*. 1997;39(2):67-73.
31. Gold J, Valinski HM, Hanks AN, Ballen KK, Hsieh CC, Becker PS. Adhesion receptor expression by CD34+ cells from peripheral blood or bone marrow grafts: correlation with time to engraftment. *Experimental hematology*. 2006;34(5):680-7.
32. Johnsen HE, Rasmussen T, Knudsen LM. CD34+ subset and tumor cell quantitation by flow cytometry--step toward quality assessment of autografts in B cell malignancies. *Vox sanguinis*. 1998;74 Suppl 2:477-82.
33. Kobari L, Pflumio F, Giarratana M, Li X, Titeux M, Izac B, et al. In vitro and in vivo evidence for the long-term multilineage (myeloid, B, NK, and T) reconstitution capacity of ex vivo expanded human CD34(+) cord blood cells. *Experimental hematology*. 2000;28(12):1470-80.
34. Tricot G, Gazitt Y, Leemhuis T, Jagannath S, Desikan KR, Siegel D, et al. Collection, tumor contamination, and engraftment kinetics of highly purified hematopoietic progenitor cells to support high dose therapy in multiple myeloma. *Blood*. 1998;91(12):4489-95.
35. Watanabe T, Kawano Y, Watanabe A, Takaue Y. Autologous and allogeneic transplantation with peripheral blood CD34+ cells: a pediatric experience. *Haematologica*. 1999;84(2):167-76.
36. Wojakowski W, Tendera M. Mobilization of bone marrow-derived progenitor cells in acute coronary syndromes. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*. 2005;43(4):229-32.

37. Yu J. Regulation and reconstitution of human hematopoiesis. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 1996;95(4):281-93.
38. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ascensao JL, MacKintosh FR, Flake AW. Transplantation of hematopoietic stem cells in utero. *Stem cells*. 1997;15 Suppl 1:79-92; discussion 3.
39. Zhang S, Ma X, Yao K, Zhu H, Huang Z, Shen L, et al. Combination of CD34-positive cell subsets with infarcted myocardium-like matrix stiffness: a potential solution to cell-based cardiac repair. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2014.
40. Harada N, Okamura S, Kubota A, Shimoda K, Ikematsu W, Kondo S, et al. Analysis of acute myeloid leukemia cells by flow cytometry, introducing a new light-scattering classification. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1994;120(9):553-7.
41. Bennett ST, Johnson NL, Lasky LC. Quality assurance and standards in hematopoietic progenitor processing. *Journal of clinical apheresis*. 1992;7(3):138-44.
42. Burgio GR, Locatelli F. Transplant of bone marrow and cord blood hematopoietic stem cells in pediatric practice, revisited according to the fundamental principles of bioethics. *Bone marrow transplantation*. 1997;19(12):1163-8.
43. Shelburne N, Bevans M. Non-myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Seminars in oncology nursing*. 2009;25(2):120-8.
44. VanBuskirk AM, Pidwell DJ, Adams PW, Orosz CG. Transplantation immunology. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1997;278(22):1993-9.
45. Abbruzzese L, Michieli M, Rupolo M, Toffola RT, Da Ponte A, Rossi FM, et al. A new freezing and storage procedure improves safety and viability of haematopoietic stem cells and neutrophil engraftment: a single institution experience. *Vox sanguinis*. 2010;98(2):172-80.
46. Abrahamsen JF, Wentzel-Larsen T, Bruserud O. Autologous transplantation: the viable transplanted CD34+ cell dose measured post-thaw does not predict engraftment kinetics better than the total CD34+ cell dose measured pre-freeze in patients that receive more than 2×10^6 CD34+ cells/kg. *Cytotherapy*. 2004;6(4):356-62.
47. Anagnostakis I, Papassavas AC, Michalopoulos E, Chatzistamatiou T, Andriopoulou S, Tsakris A, et al. Successful short-term cryopreservation of volume-

reduced cord blood units in a cryogenic mechanical freezer: effects on cell recovery, viability, and clonogenic potential. *Transfusion*. 2014;54(1):211-23.

48. Antoniewicz-Papis J, Lachert E, Wozniak J, Janik K, Letowska M. Methods of freezing cord blood hematopoietic stem cells. *Transfusion*. 2014;54(1):194-202.

49. Arnaud F, Riemersma G, Smit Sibinga CT, Das PC. Comparison of apheresis and other methods for separation and purification of hemopoietic stem cells: initial experience with a blood buffy coat model for the use of autologous bone marrow transplantation. *The International journal of artificial organs*. 1984;7(3):127-32.

50. Arseniev L, Goudeva L, Kadar JG, Sudmeier I, Battmer K, Matheja S, et al. Flow cytometry quantification of CD34+ cells and other leukocyte subpopulations in frozen-thawed blood cell suspensions: investigation of a new teflon container for cryopreservation of hematopoietic progenitor cells. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin*. 1995;22(3):152-8.

51. Avila Portillo LM, Guzman J, Rojas C, Becerra A, Avila J, Jaimes D, et al. Viability and functional capacity after thawing of hematopoietic progenitor cells cryopreserved at a cord blood stem cell bank in Colombia. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2010;109(2):151-4.

52. Ayello J, Semidei-Pomales M, Preti R, Hesdorffer C, Reiss RF. Effects of long-term storage at -90 degrees C of bone marrow and PBPC on cell recovery, viability, and clonogenic potential. *Journal of hematotherapy*. 1998;7(4):385-90.

53. Balint B, Ivanovic Z, Petakov M, Taseski J, Jovcic G, Stojanovic N, et al. The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of marrow repopulating ability. *Bone marrow transplantation*. 1999;23(6):613-9.

54. Balint B, Ivanovic Z, Petakov M, Taseski J, Vojvodic D, Jovcic G, et al. Evaluation of cryopreserved murine and human hematopoietic stem and progenitor cells designated for transplantation. *Vojnosanitetski preglad Military-medical and pharmaceutical review*. 1999;56(6):577-85.

55. Beshlawy AE, Metwally HG, Khalek KA, Hammoud RF, Mousa SM. The effect of freezing on the recovery and expansion of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*. 2009;7(1):50-5.

56. Bohbot A, Lioure B, Faradji A, Schmitt M, Cuillerot JM, Laplace A, et al. Positive selection of CD34+ cells from cryopreserved peripheral blood stem cells after thawing: technical aspects and clinical use. *Bone marrow transplantation*. 1996;17(2):259-64.
57. Castelhana MV, Reis-Alves SC, Vigorito AC, Rocha FF, Pereira-Cunha FG, De Souza CA, et al. Quantifying loss of CD34+ cells collected by apheresis after processing for freezing and post-thaw. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2013;48(2):241-6.
58. Clapisson G, Salinas C, Malacher P, Michallet M, Philip I, Philip T. Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES) + dimethylsulfoxide (DMSO) gives better results than DMSO alone. *Bulletin du cancer*. 2004;91(4):E97-102.
59. Clarke DM, Yadock DJ, Nicoud IB, Mathew AJ, Heimfeld S. Improved post-thaw recovery of peripheral blood stem/progenitor cells using a novel intracellular-like cryopreservation solution. *Cytotherapy*. 2009;11(4):472-9.
60. Da Rocha AR, Alves FR, Argolo Neto NM, Dos Santos LF, De Almeida HM, De Carvalho YK, et al. Hematopoietic progenitor constituents and adherent cell progenitor morphology isolated from black-rumped agouti (*Dasyprocta prymnolopha*, Wagler 1831) bone marrow. *Microscopy research and technique*. 2012;75(10):1376-82.
61. Del Pup L, De Angeli S, Conconi MT, Grandi C, Gamba PG, Parnigotto PP, et al. Effect of cryopreservation on in vitro clonal growth of cordonal blood cells. *International journal of molecular medicine*. 2003;11(3):375-7.
62. Duchez P, Chevaleyre J, Brunet de la Grange P, Vlaski M, Boiron JM, Wouters G, et al. Cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells amplified ex vivo from cord blood CD34+ cells. *Transfusion*. 2013;53(9):2012-9.
63. Figuera A, Hill RS, Petersen FB, Still BJ, Shilling D, Buckner CD. Controlled rate freezing of human marrow in a constant temperature cooling gradient in air. *Cryobiology*. 1986;23(5):470-5.
64. Galmes A, Besalduch J, Bargay J, Matamoros N, Duran MA, Morey M, 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.
65. Galmes A, Besalduch J, Bargay J, Matamoros N, Morey M, Novo A, et al. A simplified method for cryopreservation of hematopoietic stem cells with -80 degrees

C mechanical freezer with dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant. *Leukemia & lymphoma*. 1995;17(1-2):181-4.

66. Goldman JM, Th'ng KH, Park DS, Spiers AS, Lowenthal RM, Ruutu T. Collection, cryopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukaemia in blast-cell transformation. *British journal of haematology*. 1978;40(2):185-95.

67. Grilli G, Porcellini A, Lucarelli G. Role of serum on cryopreservation and subsequent viability of mouse bone marrow hemopoietic stem cells. *Cryobiology*. 1980;17(5):516-20.

68. Kudo Y, Minegishi M, Itoh T, Miura J, Saito N, Takahashi H, et al. Evaluation of hematological reconstitution potential of autologous peripheral blood progenitor cells cryopreserved by a simple controlled-rate freezing method. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2005;205(1):37-43.

69. Lee S, Kim S, Kim H, Baek EJ, Jin H, Kim J, et al. Post-thaw viable CD34(+) cell count is a valuable predictor of haematopoietic stem cell engraftment in autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Vox sanguinis*. 2008;94(2):146-52.

70. Lemoli RM, Visani G, Motta MR, Rizzi S, Ricci P, Bandini G, et al. Long-term cryopreservation of autologous bone marrow: analysis of granulocyte-macrophage progenitor (CFU-GM) viability in 31 samples stored more than 48 months. *Haematologica*. 1988;73(2):101-4.

71. Limaye LS. Bone marrow cryopreservation: improved recovery due to bioantioxidant additives in the freezing solution. *Stem cells*. 1997;15(5):353-8.

72. Limaye LS, Kale VP. Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium. *Journal of hematotherapy & stem cell research*. 2001;10(5):709-18.

73. Majado MJ, Salgado-Cecilia G, Blanquer M, Funes C, Gonzalez-Garcia C, Insausti CL, et al. Cryopreservation impact on blood progenitor cells: influence of diagnoses, mobilization treatments, and cell concentration. *Transfusion*. 2011;51(4):799-807.

74. Makino S, Harada M, Akashi K, Taniguchi S, Shibuya T, Inaba S, et al. A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80 degrees C without rate-controlled freezing. *Bone marrow transplantation*. 1991;8(4):239-44.

75. Matsumoto N, Yoshizawa H, Kagamu H, Abe T, Fujita N, Watanabe S, et al. Successful liquid storage of peripheral blood stem cells at subzero non-freezing temperature. *Bone marrow transplantation*. 2002;30(11):777-84.
76. McCullough J, Haley R, Clay M, Hubel A, Lindgren B, Moroff G. Long-term storage of peripheral blood stem cells frozen and stored with a conventional liquid nitrogen technique compared with cells frozen and stored in a mechanical freezer. *Transfusion*. 2010;50(4):808-19.
77. Muramaki M, Hara I, Miyake H, Yamada Y, Okada H, Kamidono S. Long-term cryopreservation of peripheral blood stem cells in patients with advanced germ cell tumors using the dump-freezing method at -80 degrees C. *Oncology reports*. 2003;10(6):1993-8.
78. Nomura T, Kuriya S, Dan K, Horikoshi H, Kuwabara T. Viability of megakaryocytic and erythroid progenitors after cryopreservation in comparison with myeloid progenitors and multipotent stem cells. *Nihon Ketsueki Gakkai zasshi : journal of Japan Haematological Society*. 1984;47(4):919-25.
79. Ratajczak J, Marlicz W, Rozmyslowicz T, Machalinski B, Ratajczak MZ. Comparison of the different strategies for cryopreserving and storage of the bone marrow CD34+ cells. Possibility of unprogrammed rate freezing and storage at -80 degrees C mechanical freezer. *Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society*. 1996;1(4):35-8.
80. Ross-Rodriguez LU, Elliott JA, McGann LE. Investigating cryoinjury using simulations and experiments. 1: TF-1 cells during two-step freezing (rapid cooling interrupted with a hold time). *Cryobiology*. 2010;61(1):38-45.
81. Rowley SD. Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques. *Journal of hematotherapy*. 1992;1(3):233-50.
82. 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.
83. Rybka WB, Mittermeyer K, Singer JW, Buckner CD, Thomas ED. Viability of human marrow after long-term cryopreservation. *Cryobiology*. 1980;17(5):424-8.
84. Sartor M, Antonenas V, Garvin F, Webb M, Bradstock KF. Recovery of viable CD34+ cells from cryopreserved hemopoietic progenitor cell products. *Bone marrow transplantation*. 2005;36(3):199-204.

85. Shlebak AA, Marley SB, Roberts IA, Davidson RJ, Goldman JM, Gordon MY. Optimal timing for processing and cryopreservation of umbilical cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation. *Bone marrow transplantation*. 1999;23(2):131-6.
86. Sputtek A, Jetter S, Hummel K, Kuhn P. Cryopreservation of peripheral blood progenitor cells: characteristics of suitable techniques. *Beitrage zur Infusionstherapie und Transfusionsmedizin = Contributions to infusion therapy and transfusion medicine*. 1997;34:79-83.
87. Vosganian GS, Waalen J, Kim K, Jhatakia S, Schram E, Lee T, et al. Effects of long-term cryopreservation on peripheral blood progenitor cells. *Cytotherapy*. 2012;14(10):1228-34.
88. Wang SY, Ho CK, Chen PM, Yung CH, Chong LL, Chen LY. Comparison of stem cell viability of bone marrow cryopreserved by two different methods. *Cryobiology*. 1987;24(3):229-37.
89. Wiesneth M, Hertenstein B, Koerner K, Heimpel H, Heit W. Concentration of bone marrow mononuclear cells for in vitro treatment and ABO-incompatible transplantation: a rapid and reproducible procedure using the haemonetics V50 cell separator. *Beitrage zur Infusionstherapie = Contributions to infusion therapy*. 1988;21:340-5.
90. Wu J, Lu Z, Nie M, Zhou H, Sun X, Xue X, et al. Optimization of cryopreservation procedures for porcine endothelial progenitor cells. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2012;113(1):117-23.
91. Zhao J, Hao HN, Thomas RL, Lyman WD. An efficient method for the cryopreservation of fetal human liver hematopoietic progenitor cells. *Stem cells*. 2001;19(3):212-8.
92. Kluter H, Wilhelm D, Bubel S, Fiebelkorn A, Kirchner H. [Cytokines and chemokines as inducers of nonhemolytic transfusion reactions after thrombocyte transfusion]. *Beitrage zur Infusionstherapie und Transfusionsmedizin = Contributions to infusion therapy and transfusion medicine*. 1997;34:100-4.
93. Palmer DS, Aye MT, Dumont L, Dumont D, McCombie N, Giulivi A, et al. Prevention of cytokine accumulation in platelets obtained with the COBE spectra apheresis system. *Vox sanguinis*. 1998;75(2):115-23.

94. Biancotto A, Wank A, Perl S, Cook W, Olnes MJ, Dagur PK, et al. Baseline levels and temporal stability of 27 multiplexed serum cytokine concentrations in healthy subjects. *PloS one*. 2013;8(12):e76091.
95. Costa EJ, Guimaraes TM, de Almeida NC, de Toledo Vde P. Comparison of cytokine levels and metabolic parameters of stored platelet concentrates of the Fundacao Hemominas, Belo Horizonte, Brazil. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2012;34(2):94-9.
96. de la Morena MT, Gatti RA. A history of bone marrow transplantation. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2011;25(1):1-15.
97. McCulloch EA, Till JE, Siminovitch L. The role of independent and dependent stem cells in the control of hemopoietic and immunologic responses. *The Wistar Institute symposium monograph*. 1965;4:61-8.
98. Haglund C, Aleskog A, Hakansson LD, Hoglund M, Jacobsson S, Larsson R, et al. The FMCA-GM assays, high throughput non-clonogenic alternatives to CFU-GM in preclinical hematotoxicity testing. *Toxicology letters*. 2010;194(3):102-7.
99. Masuda H, Alev C, Akimaru H, Ito R, Shizuno T, Kobori M, et al. Methodological development of a clonogenic assay to determine endothelial progenitor cell potential. *Circulation research*. 2011;109(1):20-37.
100. Shi L, Chen X, Tang W, Li Z, Liu J, Gao F, et al. Combination of FACS and homologous recombination for the generation of stable and high-expression engineered cell lines. *PloS one*. 2014;9(3):e91712.
101. Dauber K, Becker D, Odendahl M, Seifried E, Bonig H, Tonn T. Enumeration of viable CD34(+) cells by flow cytometry in blood, bone marrow and cord blood: results of a study of the novel BD stem cell enumeration kit. *Cytotherapy*. 2011;13(4):449-58.
102. David S, Rice A, Vianes I, Duperray V, Dupouy M, Reiffers J. Expansion of blood CD34 positive cells: committed precursors expansion does not affect immature hematopoietic progenitors. *Nouvelle revue francaise d'hematologie*. 1995;37(6):343-9.
103. Doulatov S, Vo LT, Chou SS, Kim PG, Arora N, Li H, et al. Induction of multipotential hematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells via respecification of lineage-restricted precursors. *Cell stem cell*. 2013;13(4):459-70.

104. Woods NB, Parker AS, Moraghebi R, Lutz MK, Firth AL, Brennand KJ, et al. Brief report: efficient generation of hematopoietic precursors and progenitors from human pluripotent stem cell lines. *Stem cells*. 2011;29(7):1158-64.
105. Lasky LC. Hematopoietic reconstitution using progenitors recovered from blood. *Transfusion*. 1989;29(6):552-7.
106. Aghebati Maleki L, Majidi J, Baradaran B, Movassaghpour A, Abdolalizadeh J. Generation and Characterization of Anti-CD34 Monoclonal Antibodies Reactive with Hematopoietic Stem Cells. *Cell journal*. 2013;16(3).
107. Arseniev L, Pickerd N, Goudeva L, Hertenstein B, Ganser A. Comparative evaluation of commonly used clones and fluorochrome conjugates of monoclonal antibodies for CD34 antigen detection. *Journal of hematotherapy & stem cell research*. 1999;8(5):547-59.
108. Barrande C, Traore Y, Szekeres G, Hirn J. Isolation and characterization of two new monoclonal antibodies against the CD34 molecule. *Hybridoma*. 1993;12(2):203-13.
109. Nikolaev Iu S, Gil'chuk PV, Gorbatiuk OB, Fliak AI, Labyntsev A, Irodov DM, et al. [Polyclonal antibodies against human cell-surface antigen CD34]. *TSitologiya i genetika*. 2011;45(3):3-14.
110. Siena S, Bregni M, Brando B, Belli N, Lansdorp PM, Bonadonna G, et al. Flow cytometry to estimate circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation: comparative analysis of different CD34 monoclonal antibodies. *Haematologica*. 1991;76(4):330-3.
111. Sovalat H, Racadot E, Henon P, Fuchs P, Lewandowski H, Billot M. Comparative analysis of class I, II and III epitope-detecting CD34 monoclonal antibodies by quantitative flow cytometry. *Hematology and cell therapy*. 1998;40(6):259-68.
112. Sutherland FLLHDR. Structural and Functional features of the CD34 antigen: an update. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2001:1-13.
113. Holmes T, Yan F, Ko KH, Nordon R, Song E, O'Brien TA, et al. Ex vivo expansion of cord blood progenitors impairs their short-term and long-term repopulating activity associated with transcriptional dysregulation of signalling networks. *Cell proliferation*. 2012;45(3):266-78.

114. Boehm D, Murphy WG, Al-Rubeai M. The potential of human peripheral blood derived CD34+ cells for ex vivo red blood cell production. *Journal of biotechnology*. 2009;144(2):127-34.
115. D'Arena G, Cascavilla N, Musto P, Greco M, Di Mauro L, Carella AM, et al. Flow cytometric characterization of CD34+ hematopoietic progenitor cells in mobilized peripheral blood and bone marrow of cancer patients. *Haematologica*. 1996;81(3):216-23.
116. Gaipa G, Coustan-Smith E, Todisco E, Maglia O, Biondi A, Campana D. Characterization of CD34+, CD13+, CD33- cells, a rare subset of immature human hematopoietic cells. *Haematologica*. 2002;87(4):347-56.
117. Nimgaonkar MT, Roscoe RA, Persichetti J, Rybka WB, Winkelstein A, Ball ED. A unique population of CD34+ cells in cord blood. *Stem cells*. 1995;13(2):158-66.
118. Steen R, Tjonnfjord GE, Groseth LA, Egeland T. Characteristics of haemopoietic progenitor cells related to CD34 epitope class expression. *European journal of haematology*. 2000;64(4):245-51.
119. Chavez-Gonzalez A, Dorantes-Acosta E, Moreno-Lorenzana D, Alvarado-Moreno A, Arriaga-Pizano L, Mayani H. Expression of CD90, CD96, CD117, and CD123 on Different Hematopoietic Cell Populations from Pediatric Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Archives of medical research*. 2014.
120. Sousa BR, Parreira RC, Fonseca EA, Amaya MJ, Tonelli FM, Lacerda SM, et al. Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2014;85(1):43-77.
121. Albeniz I, Turker-Sener L, Bas A, Kalelioglu I, Nurten R. Isolation of hematopoietic stem cells and the effect of CD38 expression during the early erythroid progenitor cell development process. *Oncology letters*. 2012;3(1):55-60.
122. Higuchi Y, Zeng H, Ogawa M. CD38 expression by hematopoietic stem cells of newborn and juvenile mice. *Leukemia*. 2003;17(1):171-4.
123. Randall TD, Lund FE, Howard MC, Weissman IL. Expression of murine CD38 defines a population of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Blood*. 1996;87(10):4057-67.

124. Tajima F, Deguchi T, Laver JH, Zeng H, Ogawa M. Reciprocal expression of CD38 and CD34 by adult murine hematopoietic stem cells. *Blood*. 2001;97(9):2618-24.
125. Mayani H, Lansdorp PM. Proliferation of individual hematopoietic progenitors purified from umbilical cord blood. *Experimental hematology*. 1995;23(14):1453-62.
126. Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *The Journal of experimental medicine*. 1993;178(3):787-91.
127. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Lineage commitment in human hemopoiesis involves asymmetric cell division of multipotent progenitors and does not appear to be influenced by cytokines. *Journal of cellular physiology*. 1993;157(3):579-86.
128. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood*. 1993;82(9):2664-72.
129. Mayani H, Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem cells*. 1998;16(3):153-65.
130. Thomas TE, Abraham SJ, Lansdorp PM. Flow cytometry and immunoselection of human stem cells. *Methods in molecular medicine*. 2002;63:29-57.
131. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. *Blood*. 1993;81(12):3252-8.
132. H. Mayani WDaPML. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood*. 1993;82:2664-72.
133. Jerusa Martins Carvalho MKdSac. CD34-Positive cells and their subpopulations characterized by flow cytometry analyses on the bone marrow of healthy allogeneic donors. *São Paulo Medical Journal*. 2009;127(1):12-8.
134. P. SCSCMDF. CD34. *Haematologica*. 1995;80:367-87.
135. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem cells*. 2014.
136. Patrice Chevallier NR, Marina Illiaquer and cols. Characterization of various blood and graft sources: a prospective series. *Transfusion*. 2013;53:2020-6.

137. M. Korbling YOH, A. Durett and cols. Allogeneic Blood Stem Cell Transplantation: Peripheralization and yield of Donor-Derived Primitive Hematopoietic Progenitor Cells (CD34+Thy-1dim) and Lymphoid Subsets, and Possible Predictors of Engraftment and Graft-Versus-Host Disease. . *Blood*. 1995;86(Number 7):2842-8.
138. Francesco Lanza DCac. CD34+ cell subsets and long-term culture colony-forming cells evaluated on both autologous and normal bone marrow stroma predict long-term hematopoietic engraftment in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Experimental Hematology*. 2001;29:1484-93.
139. P. Menendez MCdC, A. Orfao. Immunophenotypic characteristics of PB-mobilised CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2001;15:53-61.
140. Fasan O. Optimal Autologous Peripheral Blood Progenitor Cell Mobilization Involves More than the CD34+ Yield. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2014;20:1-3.
141. Satterthwaite AB, Burn TC, Le Beau MM, Tenen DG. Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. *Genomics*. 1992;12(4):788-94.
142. Sutherland DR, Keating A. The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *Journal of hematotherapy*. 1992;1(2):115-29.
143. Gorgens A, Radtke S, Horn PA, Giebel B. New relationships of human hematopoietic lineages facilitate detection of multipotent hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell cycle*. 2013;12(22):3478-82.
144. Rundberg Nilsson A, Bryder D, Pronk CJ. Frequency determination of rare populations by flow cytometry: a hematopoietic stem cell perspective. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2013;83(8):721-7.
145. Ballen K. Targeting the stem cell niche: squeezing blood from bones. *Bone marrow transplantation*. 2007;39(11):655-60.
146. Pichler H, Witt V, Winter E, Boztug H, Glogova E, Potschger U, et al. No Impact of Total or Myeloid Cd34+ Cell Numbers on Neutrophil Engraftment and Transplantation-Related Mortality after Allogeneic Pediatric Bone Marrow Transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2014.
147. Bittencourt H, Rocha V, Chevret S, Socie G, Esperou H, Devergie A, et al. Association of CD34 cell dose with hematopoietic recovery, infections, and other

outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 2002;99(8):2726-33.

148. Morariu-Zamfir R, Rocha V, Devergie A, Socie G, Ribaud P, Esperou H, et al. Influence of CD34(+) marrow cell dose on outcome of HLA-identical sibling allogeneic bone marrow transplants in patients with chronic myeloid leukaemia. *Bone marrow transplantation*. 2001;27(6):575-80.

149. Rocha V, Carmagnat MV, Chevret S, Flinois O, Bittencourt H, Esperou H, et al. Influence of bone marrow graft lymphocyte subsets on outcome after HLA-identical sibling transplants. *Experimental hematology*. 2001;29(11):1347-52.

150. Chang YJ, Xu LP, Liu DH, Liu KY, Han W, Chen YH, et al. The impact of CD34+ cell dose on platelet engraftment in pediatric patients following unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation. *Pediatric blood & cancer*. 2009;53(6):1100-6.

151. Lee HS, Park LC, Lee EM, Shin SH, Kim YS, Moon JH, et al. Predictive factors for rapid neutrophil and platelet engraftment after allogenic peripheral blood stem cell transplantation in patients with acute leukemia. *Annals of hematology*. 2013;92(12):1685-93.

152. Donmez A, Ozsan F, Arik B, Ozkayin N, Cagirgan S, Mir S, et al. The clearance time of infused hematopoietic stem cell from the blood circulation. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2013;48(2):235-9.

153. Stiehl T, Ho AD, Marciniak-Czochra A. The impact of CD34+ cell dose on engraftment after SCTs: personalized estimates based on mathematical modeling. *Bone marrow transplantation*. 2014;49(1):30-7.

154. Stiff PJ, Micallef I, Nademanee AP, Stadtmauer EA, Maziarz RT, Bolwell BJ, et al. Transplanted CD34(+) cell dose is associated with long-term platelet count recovery following autologous peripheral blood stem cell transplant in patients with non-Hodgkin lymphoma or multiple myeloma. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2011;17(8):1146-53.

155. Siena S, Schiavo R, Pedrazzoli P, Carlo-Stella C. Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. *Journal of clinical*

oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2000;18(6):1360-77.

156. Stewart DA, Guo D, Luider J, Auer I, Klassen J, Ching E, et al. Factors predicting engraftment of autologous blood stem cells: CD34+ subsets inferior to the total CD34+ cell dose. Bone marrow transplantation. 1999;23(12):1237-43.

157. Salvatore Siena R Sac. Therapeutic Relevance of CD34+ Cell Dose in Blood Cell Transplantation for Cancer Therapy. Journal of Clinical Oncology. 2000;18(6):1360-77.

158. D. Mavroudis E Rac. CD34+ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. Blood. 1996;88:3223-9.

159. Jantunen E, Fruehauf S. Importance of blood graft characteristics in auto-SCT: implications for optimizing mobilization regimens. Bone marrow transplantation. 2011;46(5):627-35.

160. Jiang L, Malik S, Litzow M, Gastineau D, Micallef I, Roy V, et al. Hematopoietic stem cells from poor and good mobilizers are qualitatively equivalent. Transfusion. 2012;52(3):542-8.

161. Meehan KR, Talebian L, Wu J, Hill JM, Szczepiorkowski ZM, Sentman CL, et al. Immune mobilization of autologous blood progenitor cells: direct influence on the cellular subsets collected. Cytotherapy. 2010;12(8):1013-21.

162. Lanza F, Campioni D, Moretti S, Dominici M, Punturieri M, Focarile E, et al. CD34(+) cell subsets and long-term culture colony-forming cells evaluated on both autologous and normal bone marrow stroma predict long-term hematopoietic engraftment in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. Experimental hematology. 2001;29(12):1484-93.

163. Drake AC, Khoury M, Leskov I, Iliopoulou BP, Fragoso M, Lodish H, et al. Human CD34+ CD133+ hematopoietic stem cells cultured with growth factors including Angptl5 efficiently engraft adult NOD-SCID Il2rgamma-/- (NSG) mice. PloS one. 2011;6(4):e18382.

164. Brunet de la Grange P, Vlaski M, Duchez P, Chevaleyre J, Lapostolle V, Boiron JM, et al. Long-term repopulating hematopoietic stem cells and "side population" in human steady state peripheral blood. Stem cell research. 2013;11(1):625-33.

165. Kozłowska-Skrzypczak M, Gil L, Komarnicki M. Factors affecting neutrophil recovery after autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia. *Transplantation proceedings*. 2009;41(9):3868-72.
166. Sari T, Yuksel MK, Topcuoglu P, Tol M, Ayyildiz E, Ozcan M, et al. The effect of CD34 count and clonogenic potential of hematopoietic stem cells on engraftment. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2010;43(3):315-20.
167. Beksac M, Preffer F. Is it time to revisit our current hematopoietic progenitor cell quantification methods in the clinic? *Bone marrow transplantation*. 2012;47(11):1391-6.
168. Jaime-Perez JC, Hernandez-Alcantara AE, Mendez-Ramirez N, Vazquez-Garza E, Cantu-Rodriguez OG, Gomez-Almaguer D. Mobilization kinetics of CD133+ hematoprogenitor cells for hematopoietic grafting. *Transfusion*. 2009;49(3):532-5.
169. Handgretinger R, Kuci S. CD133-Positive Hematopoietic Stem Cells: From Biology to Medicine. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;777:99-111.
170. Hicks C, Wong R, Manoharan A, Kwan YL. Viable CD34+/CD133+ blood progenitor cell dose as a predictor of haematopoietic engraftment in multiple myeloma patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Annals of hematology*. 2007;86(8):591-8.
171. Gunduz E, Demirel G, Bal C, Gulbas Z. Evaluation of mobilized peripheral stem cells according to CD34 and aldehyde dehydrogenase expression and effect of SSC(lo) ALDH(br) cells on hematopoietic recovery. *Cytotherapy*. 2010;12(8):1006-12.
172. Prabhash K, Khattry N, Bakshi A, Karandikar R, Joshi A, Kannan S, et al. CD26 expression in donor stem cell harvest and its correlation with engraftment in human haematopoietic stem cell transplantation: potential predictor of early engraftment. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010;21(3):582-8.
173. Wallington-Beddoe CT, Gottlieb DJ, Garvin F, Antonenas V, Sartor MM. Failure to achieve a threshold dose of CD34+CD110+ progenitor cells in the graft predicts delayed platelet engraftment after autologous stem cell transplantation for

- multiple myeloma. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2009;15(11):1386-93.
174. Chevallier P, Robillard N, Illiaquer M, Esbelin J, Mohty M, Bodin-Bressollette C, et al. Characterization of various blood and graft sources: a prospective series. *Transfusion*. 2013;53(9):2020-6.
175. Steinberg M, Silva M. Plerixafor: A chemokine receptor-4 antagonist for mobilization of hematopoietic stem cells for transplantation after high-dose chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma or multiple myeloma. *Clinical therapeutics*. 2010;32(5):821-43.
176. Varmavuo V, Mantymaa P, Silvennoinen R, Nousiainen T, Kuitinen T, Jantunen E. CD34+ cell subclasses and lymphocyte subsets in blood grafts collected after various mobilization methods in myeloma patients. *Transfusion*. 2013;53(5):1024-32.
177. Roug AS, Hokland LB, Segel E, Nielsen K, Toft-Petersen M, Van Kooten Niekerk PB, et al. Unraveling stem cell and progenitor subsets in autologous grafts according to methods of mobilization: implications for prediction of hematopoietic recovery. *Cytotherapy*. 2014;16(3):392-401.
178. Scholbach J, Schulz A, Westphal F, Egger D, Wege AK, Patties I, et al. Comparison of hematopoietic stem cells derived from fresh and cryopreserved whole cord blood in the generation of humanized mice. *PLoS one*. 2012;7(10):e46772.
179. Liseth K, Ersvaer E, Abrahamsen JF, Nesthus I, Rynningen A, Bruserud O. Long-term cryopreservation of autologous stem cell grafts: a clinical and experimental study of hematopoietic and immunocompetent cells. *Transfusion*. 2009;49(8):1709-19.
180. Vrhovac R, Peric Z, Jurenec S, Kardum-Skelin I, Jelic-Puskaric B, Jaksic B. Post-thaw viability of cryopreserved hematopoietic progenitor cell grafts: does it matter? *Collegium antropologicum*. 2010;34(1):163-9.
181. Balint B, Ljubenov M, Stamatovic D, Todorovic M, Pavlovic M, Ostojic G, et al. Stem cell harvesting protocol research in autologous transplantation setting: large volume vs. conventional cytopheresis. *Vojnosanitetski pregled Military-medical and pharmaceutical review*. 2008;65(7):545-51.
182. Bolwell BJ, Goormastic M, Yanssens T, Dannley R, Baucoco P, Fishleder A. Comparison of G-CSF with GM-CSF for mobilizing peripheral blood progenitor cells

and for enhancing marrow recovery after autologous bone marrow transplant. Bone marrow transplantation. 1994;14(6):913-8.

183. Isola L, Scigliano E, Fruchtman S. Long-term follow-up after allogeneic granulocyte colony-stimulating factor--primed bone marrow transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2000;6(4A):428-33.

184. Mick R, Williams SF, Bitran JD. Patients at increased risk for late engraftment after transplantation: a novel method for their identification. *Bone marrow transplantation*. 1990;6(3):185-91.

185. Pettengell R, Morgenstern GR, Woll PJ, Chang J, Rowlands M, Young R, et al. Peripheral blood progenitor cell transplantation in lymphoma and leukemia using a single apheresis. *Blood*. 1993;82(12):3770-7.

186. Rinaldi C, Savignano C, Silvestri F, Geromin A, Cerno M, Fanin R, et al. Autologous bone marrow transplantation in non-Hodgkin's lymphomas: prediction of mononuclear cell yield in bone marrow harvests. *Haematologica*. 1995;80(5):443-7.

187. Balana-Nowak A, Zdzilowska E, Szostek M, Skotnicki AB. [Evaluation of transplantation material based on immunophenotype and in vitro clonogenic assays of hematopoietic stem and progenitor cells]. *Przegląd Lekarski*. 1999;56 Suppl 1:28-33.

188. Barbier V, Nowlan B, Levesque JP, Winkler IG. Flow cytometry analysis of cell cycling and proliferation in mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *Methods in molecular biology*. 2012;844:31-43.

189. Elorza I, Palacio C, Dapena JL, Gallur L, Sanchez de Toledo J, Diaz de Heredia C. Relationship between minimal residual disease measured by multiparametric flow cytometry prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2010;95(6):936-41.

190. Keeney M, Gratama JW, Sutherland DR. Critical role of flow cytometry in evaluating peripheral blood hematopoietic stem cell grafts. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2004;58(1):72-5.

191. Marinov I, Luxova A, Tkacova V, Gasova Z, Pohlreich D, Cetkovsky P. Comparison of three single platform methods for CD34+ hematopoietic stem cell enumeration by flow cytometry. *Clinical laboratory*. 2011;57(11-12):1031-5.

192. Takekawa K, Yamane T, Tatsumi N. [Detection of hematopoietic stem cells using automated blood cell counter and flow cytometry]. *Rinsho byori The Japanese journal of clinical pathology*. 1995;Suppl 99:117-22.
193. Voltarelli JC. Applications of flow cytometry to hematopoietic stem cell transplantation. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000;95(3):403-14.
194. Yeung J, So CW. Identification and characterization of hematopoietic stem and progenitor cell populations in mouse bone marrow by flow cytometry. *Methods in molecular biology*. 2009;538:301-15.
195. Gorczyca W, Sun ZY, Cronin W, Li X, Mau S, Tugulea S. Immunophenotypic pattern of myeloid populations by flow cytometry analysis. *Methods in cell biology*. 2011;103:221-66.
196. Johnsen HE, Bogsted M, Klausen TW, Gimsing P, Schmitz A, Kjaersgaard E, et al. Multiparametric flow cytometry profiling of neoplastic plasma cells in multiple myeloma. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2010;78(5):338-47.
197. Kim GG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Gooding W, Whiteside TL. A novel multiparametric flow cytometry-based cytotoxicity assay simultaneously immunophenotypes effector cells: comparisons to a 4 h ⁵¹Cr-release assay. *Journal of immunological methods*. 2007;325(1-2):51-66.
198. Radcliff G, Jaroszeski MJ. Basics of flow cytometry. *Methods in molecular biology*. 1998;91:1-24.
199. Sun XF, He LR, Feng HL, Yan SL, Xia ZJ, Chen XQ. [The value of multiparameter flow cytometry in diagnosis of lymphocytic leukemia and bone marrow involvement of non-Hodgkin's lymphoma]. *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer*. 2003;22(11):1232-6.
200. Andreoni C, Rigal D, Bonnard M, Bernaud J. [Analysis of bone marrow by flow cytometry: morphologic and immunologic aspects]. *Pathologie-biologie*. 1988;36(10):1183-91.
201. Carulli G, Marini A. Diagnosis and classification of B-cell non-Hodgkin lymphomas. The role of multiparameter flow cytometry. *La Clinica terapeutica*. 2012;163(1):47-57.
202. Duggan PR, Easton D, Luider J, Auer IA. Bone marrow staging of patients with non-Hodgkin lymphoma by flow cytometry: correlation with morphology. *Cancer*. 2000;88(4):894-9.

203. Kussick SJ, Wood BL. Using 4-color flow cytometry to identify abnormal myeloid populations. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2003;127(9):1140-7.
204. Mand'akova P, Campř V, Kodet R. [Correlation of results of flow cytometry and morphologic findings in the diagnosis of malignant B-cell lymphoma]. *Casopis lekaru ceskych*. 2003;142(11):651-5.
205. Weir EG, Borowitz MJ. Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. *Seminars in hematology*. 2001;38(2):124-38.
206. Melamed MR. A brief history of flow cytometry and sorting. *Methods in cell biology*. 2001;63:3-17.
207. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clinical chemistry*. 2002;48(10):1819-27.
208. Marti GE, Zenger VE, Vogt R, Gaigalas A. Quantitative flow cytometry: history, practice, theory, consensus, inter-laboratory variation and present status. *Cytotherapy*. 2002;4(1):97-8.
209. Brocklebank AM, Sparrow RL. Enumeration of CD34+ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. *Cytometry*. 2001;46(4):254-61.
210. Herbert DJ, Miller DT, Bruce Bagwell C. Automated analysis of flow cytometric data for CD34+ stem cell enumeration using a probability state model. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2012;82(5):313-8.
211. Mortazavi S, Ardalan FA, Nodehi SR, Karder FF, Miraliakbari N. True volumetric method for flow cytometric enumeration of CD34 + stem cells and its agreement with a standard bead-based single-platform protocol. *Cytotherapy*. 2012;14(5):621-9.
212. Areman E. ISHAGE: the next step. International Society for Hematotherapy and Graft Engineering. *Journal of hematotherapy*. 1997;6(5):437-8.
213. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *Journal of hematotherapy*. 1996;5(3):213-26.
214. D.Robert Sutherland LAac. The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry. *Journal of Hematotherapy*. 1996;5:213-26.

215. 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(2):61-70.
216. Gajkowska A, Oldak T, Jastrzevska M, Machaj EK, Walewski J, Kraszewska E, et al. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of three methods. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*. 2006;44(1):53-60.
217. Venditti A, Battaglia A, Del Poeta G, Buccisano F, Maurillo L, Tamburini A, et al. Enumeration of CD34+ hematopoietic progenitor cells for clinical transplantation: comparison of three different methods. *Bone marrow transplantation*. 1999;24(9):1019-27.
218. Al-Rubeai M, Welzenbach K, Lloyd DR, Emery AN. A rapid method for evaluation of cell number and viability by flow cytometry. *Cytotechnology*. 1997;24(2):161-8.
219. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Dignat-George F. Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2010;36(8):807-18.
220. Leuner S, Arland M, Kahl C, Jentsch-Ullrich K, Franke A, Hoffkes HG. Enumeration of CD34-positive hematopoietic progenitor cells by flow cytometry: comparison of a volumetric assay and the ISHAGE gating strategy. *Bone marrow transplantation*. 1998;22(7):699-706.
221. Gratama JW, Braakman E, Kraan J, Lankheet P, Levering WH, Van Den Beemd MW, et al. Comparison of single and dual-platform assay formats for CD34+ haematopoietic progenitor cell enumeration. *Clinical and laboratory haematology*. 1999;21(5):337-46.
222. Marin P, Jover L, Petriz J. A new approach to CD34+ hematopoietic progenitor cell counting. *Current stem cell research & therapy*. 2013;8(2):163-71.
223. Sutherland DR, Nayar R, Acton E, Giftakis A, Dean S, Mosiman VL. Comparison of two single-platform ISHAGE-based CD34 enumeration protocols on BD FACSCalibur and FACSCanto flow cytometers. *Cytotherapy*. 2009;11(5):595-605.

224. Chapple P, Prince HM, Wall D, Filshie R, Haylock D, Quinn M, et al. Comparison of three methods of CD34+ cell enumeration in peripheral blood: dual-platform ISHAGE protocol versus single-platform, versus microvolume fluorimetry. *Cytotherapy*. 2000;2(5):371-6.
225. Gratama JW, Kraan J, Keeney M, Sutherland DR, Granger V, Barnett D. Validation of the single-platform ISHAGE method for CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cell enumeration in an international multicenter study. *Cytotherapy*. 2003;5(1):55-65.
226. Moretti S, Dabusti M, Castagnari B, Tieghi A, Ferrari L, Campioni D, et al. Comparison of single and dual platform methodologies for the estimation of CD34+ hematopoietic progenitor cells: correlation with colony assay. *The International journal of biological markers*. 2002;17(4):259-67.
227. Donnenberg AD, Koch EK, Griffin DL, Stanczak HM, Kiss JE, Carlos TM, et al. Viability of cryopreserved BM progenitor cells stored for more than a decade. *Cytotherapy*. 2002;4(2):157-63.
228. M.D.Reis. Enumeration of CD34+ Hematopoietic Precursor Cells: Current Status. *Tranplantation Proceedings*. 1999;31:2970-2.
229. Belaaloui G, Imbert AM, Bardin F, Tonnellet C, Dubreuil P, Lopez M, et al. Functional characterization of human CD34+ cells that express low or high levels of the membrane antigen CD111 (nectin 1). *Leukemia*. 2003;17(6):1137-45.
230. Goussetis E, Theodosaki M, Paterakis G, Peristeri J, Petropoulos D, Kitra V, et al. A functional hierarchy among the CD34+ hematopoietic cells based on in vitro proliferative and differentiative potential of AC133+CD34(bright) and AC133(dim)/-CD34+ human cord blood cells. *Journal of hematotherapy & stem cell research*. 2000;9(6):827-40.
231. Steidl U, Bork S, Schaub S, Selbach O, Seres J, Aivado M, et al. Primary human CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells express functionally active receptors of neuromediators. *Blood*. 2004;104(1):81-8.
232. Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P, Thiel KS, Vivier E, Carson WE, et al. Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood*. 1998;92(10):3647-57.
233. Zamai L, Del Zotto G, Buccella F, Galeotti L, Canonico B, Luchetti F, et al. Cytotoxic functions and susceptibility to apoptosis of human CD56(bright) NK cells

- differentiated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitors. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2012;81(4):294-302.
234. Stockerl-Goldstein KE, Reddy SA, Horning SF, Blume KG, Chao NF, Hu WW, et al. Favorable treatment outcome in non-Hodgkin's lymphoma patients with "poor" mobilization of peripheral blood progenitor cells. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2000;6(5):506-12.
235. Whitby A, Whitby L, Fletcher M, Reilly JT, Sutherland DR, Keeney M, et al. ISHAGE protocol: are we doing it correctly? *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2012;82(1):9-17.
236. Basso G, Timeus F. Cytofluorimetric analysis of CD34 cells. *Bone marrow transplantation*. 1998;22 Suppl 5:S17-20.
237. Gratama JW, Orfao A, Barnett D, Brando B, Huber A, Janossy G, et al. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry*. 1998;34(3):128-42.
238. D. Barnett GJac. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells. *Clinical and Laboratorial Hematology*. 1999;21:301-8.
239. Campbell K. The principles of bone marrow and stem-cell transplantation. *Nursing times*. 1996;92(48):34-6.
240. Duran-Struuck R, Dysko RC. Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*. 2009;48(1):11-22.
241. Schwartzberg L, Birch R, Blanco R, Wittlin F, Muscato J, Tauer K, et al. Rapid and sustained hematopoietic reconstitution by peripheral blood stem cell infusion alone following high-dose chemotherapy. *Bone marrow transplantation*. 1993;11(5):369-74.
242. Nemet D. [Autologous bone marrow transplantation--a new approach in the treatment of neoplastic hematologic diseases. I. Scientific principles and methodology of the treatment]. *Lijecnicki vjesnik*. 1989;111(12):466-74.
243. Niethammer D. [Clinical principles of bone marrow transplantation]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft fur Pathologie*. 1983;67:318-27.

244. Passweg JR, Baldomero H, Peters C, Gaspar HB, Cesaro S, Dreger P, et al. Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation. *Bone marrow transplantation*. 2014.
245. Gui L, Shi YK, He XH, Lei YH, Zhang HZ, Han XH, et al. High-dose therapy and autologous stem cell transplantation in peripheral T-cell lymphoma: treatment outcome and prognostic factor analysis. *International journal of hematology*. 2014;99(1):69-78.
246. Shimazaki C. Autologous stem cell transplantation for multiple myeloma in the era of novel agents. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2014;14(1):14-5.
247. Touzeau C, Leux C, Bouabdallah R, Roussel M, Delarue R, Bouabdallah K, et al. Autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a report from the SFGM-TC. *Annals of hematology*. 2014;93(2):233-42.
248. Giulia P, Corradini P. Autologous stem cell transplantation for T-cell lymphomas. *Seminars in hematology*. 2014;51(1):59-66.
249. Gurion R. Systematic review and meta-analysis of autologous stem cell transplantation in peripheral T cell lymphoma. *Acta haematologica*. 2014;131(2):112-3.
250. Reddy NM, Oluwole O, Greer JP, Engelhardt BG, Jagasia MH, Savani BN. Outcomes of autologous or allogeneic stem cell transplantation for non-Hodgkin lymphoma. *Experimental hematology*. 2014;42(1):39-45.
251. Bolwell BJ. Autologous bone marrow transplantation for Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *Seminars in oncology*. 1994;21(4 Suppl 7):86-95.
252. Burman J, Iacobaeus E, Svenningsson A, Lycke J, Gunnarsson M, Nilsson P, et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation for aggressive multiple sclerosis: the Swedish experience. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2014.
253. Chihara D, Izutsu K, Kondo E, Sakai R, Mizuta S, Yokoyama K, et al. High-Dose Chemotherapy with Autologous Stem Cell Transplantation for Elderly Patients with Relapsed/Refractory Diffuse Large B Cell Lymphoma: A Nationwide Retrospective Study. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2014.
254. Korbling M, Freireich EJ. Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(24):6411-6.

255. Vaughan W, Seshadri T, Bridges M, Keating A. The principles and overview of autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer treatment and research*. 2009;144:23-45.
256. L.Bik To J-PLaKEH. How I Treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly. *Blood*. 2011;118(17):4530-40.
257. Bellavita P, Celega E, Poma R. Comparison of performance of six different cell separators in collecting peripheral blood mononuclear cells. *Transfusion science*. 1997;18(2):215-21.
258. Bender JG, Lum L, Unverzagt KL, Lee W, Van Epps D, George S, et al. Correlation of colony-forming cells, long-term culture initiating cells and CD34+ cells in apheresis products from patients mobilized for peripheral blood progenitors with different regimens. *Bone marrow transplantation*. 1994;13(4):479-85.
259. Bjorkstrand B, Sundman-Engberg B, Christensson B, Kumlien G. A controlled comparison of two different clinical grade devices for CD34+ cell selection of autologous blood stem cell grafts. *Journal of hematotherapy*. 1999;8(1):75-80.
260. Dreger P, Viehmann K, Steinmann J, Eckstein V, Muller-Ruchholtz W, Loffler H, et al. G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: comparison of T cell depletion strategies using different CD34+ selection systems or CAMPATH-1. *Experimental hematology*. 1995;23(2):147-54.
261. Gasova Z, Ludvikova Z, Kucerova I, Marinov I, Hrubá A, Trneny M, et al. [Separation of hematopoietic progenitor cells from peripheral blood in patients with hemato-oncologic malignancy]. *Casopis lekaru ceskych*. 1999;138(12):369-73.
262. Hitzler WE, Wolf S, Runkel S, Kunz-Kostomanolakis M. Comparison of intermittent- and continuous-flow cell separators for the collection of autologous peripheral blood progenitor cells in patients with hematologic malignancies. *Transfusion*. 2001;41(12):1562-6.
263. Hocker P, Wagner A. [Collection and transfusion of peripheral blood stem cells]. *Beitrage zur Infusionstherapie = Contributions to infusion therapy*. 1991;28:242-6.
264. Ikeda K, Ohto H, Kanno T, Ogata T, Noji H, Ogawa K, et al. Automated programs for collection of mononuclear cells and progenitor cells by two separators for peripheral blood progenitor cell transplantation: comparison by a randomized crossover study. *Transfusion*. 2007;47(7):1234-40.

265. Ikeda K, Ohto H, Nemoto K, Yamamoto G, Kato K, Ogata T, et al. Collection of MNCs and progenitor cells by two separators for PBPC transplantation: a randomized crossover trial. *Transfusion*. 2003;43(6):814-9.
266. Imrie K, Stewart AK, Crump RM, Prince HM, Trip K, Keating A. Blood stem cell collection: factors influencing the recovery of granulocyte-macrophage colony forming cells. *Cell transplantation*. 1996;5(3):379-83.
267. Lane TA, Law P, Maruyama M, Young D, Burgess J, Mullen M, et al. Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood*. 1995;85(1):275-82.
268. Moog R. Comparison of two continuous-flow systems for the collection of peripheral progenitor cells. *Stem cells and development*. 2004;13(4):357-61.
269. Murea S, Goldschmidt H, Hahn U, Pforsich M, Moos M, Haas R. Successful collection and transplantation of peripheral blood stem cells in cancer patients using large-volume leukaphereses. *Journal of clinical apheresis*. 1996;11(4):185-94.
270. Rowley SD, Loken M, Radich J, Kunkle LA, Mills BJ, Gooley T, et al. Isolation of CD34+ cells from blood stem cell components using the Baxter Isolex system. *Bone marrow transplantation*. 1998;21(12):1253-62.
271. Van Epps DE, Bender J, Lee W, Schilling M, Smith A, Smith S, et al. Harvesting, characterization, and culture of CD34+ cells from human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Blood cells*. 1994;20(2-3):411-23.
272. Wu FY, Heng KK, Salleh RB, Soh TG, Lee JJ, Mah J, et al. Comparing peripheral blood stem cell collection using the COBE Spectra, Haemonetics MCS+, and Baxter Amicus. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2012;47(3):345-50.
273. Woolthuis CM, Mariani N, Verkaik-Schakel RN, Brouwers-Vos AZ, Schuringa JJ, Vellenga E, et al. Aging impairs long-term hematopoietic regeneration after autologous stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2014.
274. Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S, Storb R, Sanders J, Lilleby K, et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood

stem cells. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1995;13(10):2547-55.

275. Ninan MJ, Flowers CR, Roback JD, Arellano ML, Waller EK. Posttransplant thrombopoiesis predicts survival in patients undergoing autologous hematopoietic progenitor cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2007;13(8):895-904.

276. Turk HM, Komurcu S, Arpacı F, Ozet A, Kilic S, Kuzhan O, et al. Factors affecting engraftment time in autologous peripheral stem cell transplantation. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2010;11(3):697-702.

277. Motllo C, Sancho JM, Grifols JR, Junca J, Morgades M, Ester A, et al. Mobilization and engraftment of peripheral blood stem cells in healthy related donors >55 years old. *Cytotherapy*. 2014;16(3):406-11.

278. Mijovic A, Pamphilon D. Harvesting, processing and inventory management of peripheral blood stem cells. *Asian journal of transfusion science*. 2007;1(1):16-23.

279. Mitchell PL, Shepherd VB, Proctor HM, Dainton M, Cabral SD, Pinkerton CR. Peripheral blood stem cells used to augment autologous bone marrow transplantation. *Archives of disease in childhood*. 1994;70(3):237-40.

280. Anderlini P, Korbling M. The use of mobilized peripheral blood stem cells from normal donors for allografting. *Stem cells*. 1997;15(1):9-17.

281. Anguita-Compagnon AT, Dibarrart MT, Palma J, Paredes L, Mosso C, Montalva R, et al. Mobilization and collection of peripheral blood stem cells: guidelines for blood volume to process, based on CD34-positive blood cell count in adults and children. *Transplantation proceedings*. 2010;42(1):339-44.

282. Borenstein SH, Tao KS, West LJ, Chamberlain JW. Extrathymic deletion of CD8+ alloreactive T cells in a transgenic T cell receptor model of neonatal tolerance. *Transplantation*. 2001;72(11):1807-16.

283. Bouwmeester W, Fechter MM, Heymans MW, Twisk JW, Ebeling LJ, Brand A. Prediction of nucleated cells in bone marrow stem cell products by donor characteristics: a retrospective single centre analysis. *Vox sanguinis*. 2010;98(3 Pt 1):e276-83.

284. Brown RA, Adkins D, Goodnough LT, Haug JS, Todd G, Wehde M, et al. Factors that influence the collection and engraftment of allogeneic peripheral-blood stem cells in patients with hematologic malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1997;15(9):3067-74.

285. Trebeden-Negre H, Rosenzwajg M, Tanguy ML, Lefrere F, Azar N, Heshmati F, et al. Delayed recovery after autologous peripheral hematopoietic cell transplantation: potential effect of a high number of total nucleated cells in the graft. *Transfusion*. 2010;50(12):2649-59.
286. Mitrus I, Smagur A, Giebel S, Gliwinska J, Prokop M, Glowala-Kosinska M, et al. A faster reconstitution of hematopoiesis after autologous transplantation of hematopoietic cells cryopreserved in 7.5% dimethyl sulfoxide if compared to 10% dimethyl sulfoxide containing medium. *Cryobiology*. 2013;67(3):327-31.
287. Smagur A, Mitrus I, Giebel S, Sadus-Wojciechowska M, Najda J, Kruzel T, et al. Impact of different dimethyl sulphoxide concentrations on cell recovery, viability and clonogenic potential of cryopreserved peripheral blood hematopoietic stem and progenitor cells. *Vox sanguinis*. 2013;104(3):240-7.
288. Toor AA, van Burik JA, Weisdorf DJ. Infections during mobilizing chemotherapy and following autologous stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*. 2001;28(12):1129-34.
289. Nash RA, Gooley T, Davis C, Appelbaum FR. The Problem of Thrombocytopenia after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *The oncologist*. 1996;1(6):371-80.
290. Srinivasan A, McLaughlin L, Wang C, Srivastava DK, Shook DR, Leung W, et al. Early infections after autologous hematopoietic stem cell transplantation in children and adolescents: the St. Jude experience. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 2014;16(1):90-7.
291. Seiyama A, Kosaka H, Maeda N, Shiga T. Effect of hypothermia on skeletal muscle metabolism in perfused rat hindlimb. *Cryobiology*. 1996;33(3):338-46.
292. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 2000;41(4):187-96.
293. Rabin Y, Steif PS. Analysis of Thermal Stresses around a Cryosurgical Probe. *Cryobiology*. 1996;33(2):276-90.
294. Dayong Gao JKC. Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *ILAR Journal*. 2000;41(4):1-13.
295. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Cell Physiology*. 1984;16:125-42.

296. Acker JP, Larese A, Yang H, Petrenko A, McGann LE. Intracellular ice formation is affected by cell interactions. *Cryobiology*. 1999;38(4):363-71.
297. Muldrew K, McGann LE. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophysical journal*. 1990;57(3):525-32.
298. Pincet F, Perez E, Wolfe J. Do trehalose and dimethyl sulfoxide affect intermembrane forces? *Cryobiology*. 1994;31(6):531-9.
299. Wolfe J, Bryant G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane- solute-water systems. *Cryobiology*. 1999;39(2):103-29.
300. John G. Baust DGaJMB. Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis*. 2009;5(3):90-6.
301. Ragno CRVG. Cryopreservation of human blood products. *Transfusion and Apheresis Science*. 2005;34:271-87.
302. P. Windrum TMac. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. *Bone Marrow Transplantation*. 2005;36:601-3.
303. Essayan DM, Schilder R, Kagey-Sobotka A, Jenkins MK, Korzeniowski O, Lichtenstein LM, et al. Anaphylaxis during autologous peripheral blood progenitor cell infusion. *Bone marrow transplantation*. 1997;19(7):749-52.
304. Santos N.C. F-CJac. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*. 2003;65:1035-41.
305. D.F. Stroncek SKFac. Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow. *Transfusion*. 1991;31(6):521-6.
306. Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *American journal of hematology*. 2007;82(6):463-72.
307. Galmes A. GAac. Long-term hematologic reconstitution and clinical evaluation of autologous blood stem cell transplantation after cryopreservation of cells with 5% and 10% dimethylsulfoxide at -80C in a mechanical freezer. *Haematologica*. 2007;92:986-9.
308. Galmes A. BJac. Long-term storage at -80C of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant. *Transfusion*. 1999;39:70-3.

309. Halle P, Tournilhac O, Knopinska-Posluszny W, Kanold J, Gembara P, Boiret N, et al. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80 degrees C, with only 3.5-percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations. *Transfusion*. 2001;41(5):667-73.
310. Curcoy AI, Alcorta I, Estella J, Rives S, Toll T, Tuset E. Cryopreservation of HPCs with high cell concentration in 5-percent DMSO for transplantation to children. *Transfusion*. 2002;42(7):962.
311. 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.
312. Liseth K, Abrahamsen JF, Bjorsvik S, Grottebo K, Bruserud O. The viability of cryopreserved PBPC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft. *Cytotherapy*. 2005;7(4):328-33.
313. Abrahamsen JF, Rusten L, Bakken AM, Bruserud O. Better preservation of early hematopoietic progenitor cells when human peripheral blood progenitor cells are cryopreserved with 5 percent dimethylsulfoxide instead of 10 percent dimethylsulfoxide. *Transfusion*. 2004;44(5):785-9.
314. Lee NJ, John R, Bakken S. Functional requirements specification and data modeling for a PDA-based decision support system for the screening and management of obesity. *AMIA Annual Symposium proceedings / AMIA Symposium AMIA Symposium*. 2006:1002.
315. D.M. Strong JNWac. Immunological Responsiveness of frozen-thawed human lymphocytes. *Clinical and Experimental Immunology*. 1975;21:442-55.
316. B. Balint ZIac. The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of marrow repopulating ability. *Bone Marrow Transplantation*. 1999;23:613-9.
317. Maria J. Majado GS-Cac. Cryopreservation impact on blood progenitor cells: influence of diagnoses, mobilization treatments, and cell concentration. *Transfusion*. 2011;51:799-806.
318. Keung YK CEac. High cellular concentration of peripheral blood progenitor cells during cryopreservation adversely affects CFU-GM but not hematopoietic recovery. *Journal of Hematotherapy*. 1996;5(1):73-7.

319. Dumont F, Marechal PA, Gervais P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(1):268-72.
320. Bakken AM. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells. *Current stem cell research & therapy*. 2006;1(1):47-54.
321. F. Beaujean J-HBac. Successful cryopreservation of purified autologous CD34+ cells: influence of freezing parameters on cell recovery and engraftment. *Bone Marrow Transplantation*. 1998;22:1091-6.
322. Dong Hwan Kim NFac. Similar Outcomes of Cryopreserved Allogeneic Peripheral Stem Cell Transplants (PBSCT) Compared to Fresh Allografts. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2007;13:1233-43.
323. Ayello J. S-PMac. Effects of long-term storage at -90 degrees C of bone marrow and PBSC on cell recovery, viability and clonogenic potential. *Journal of Hematotherapy*. 1998;7(4):385-90.
324. Galmes A, Besalduch J, Bargay J, Novo A, Morey M, Guerra JM, et al. Long-term storage at -80 degrees C of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant. *Transfusion*. 1999;39(1):70-3.
325. Broxmeyer HE, Srour EF, Hangoc G, Cooper S, Anderson SA, Bodine DM. High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(2):645-50.
326. Kobylka P, Ivanyi P, Breur-Vriesendorp BS. Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved cord blood cells. *Transplantation*. 1998;65(9):1275-8.
327. Perez-Oteyza J, Bornstein R, Corral M, Hermosa V, Alegre A, Torrabadella M, et al. Controlled-rate versus uncontrolled-rate cryopreservation of peripheral blood progenitor cells: a prospective multicenter study. *Group for Cryobiology and Biology of Bone Marrow Transplantation (CBTMO), Spain. Haematologica*. 1998;83(11):1001-5.
328. Rollig C, Babatz J, Wagner I, Maiwald A, Schwarze V, Ehninger G, et al. Thawing of cryopreserved mobilized peripheral blood--comparison between waterbath and dry warming device. *Cytotherapy*. 2002;4(6):551-5.

329. Elena Cabezudo CDac. Leukapheresis components may be cryopreserved at high cell concentration without additional loss os HPC function. *Transfusion*. 2000;40:1223-7.
330. Kawano Y. LCL, and cols. Cryopreservation of mobilized blood stem cells at a higher cell concentration without the use of a programmed freezer. *Annals of Hematology*. 2004;83:50-4.
331. Martin-Henao GA. TC, and cols. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells from apheresis at high cell concentrations dos not impair the hematopoietic recovery after transplantation. *Transfusion*. 2005;45:1917-24.
332. Perseghin P, Epis R, Vigano M, Malacrida A, Pastorini A, Camerone G. Satisfactory recovery and viability of stem cells cryopreserved at high cell concentration. *Transfusion science*. 1997;18(3):399-403.
333. Sibelle Alencar MGac. Cryopreservation of peripheral blood stem cell: the influence of cell concentration on cellular and hematopoietic recovery. *Transfusion*. 2010;50:2402-12.
334. Windrum P, Morris TC, Drake MB, Niederwieser D, Ruutu T, Subcommittee ECLWPC. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. *Bone marrow transplantation*. 2005;36(7):601-3.
335. K Liseth JFAac. The viability of cryopreserved PBPC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft. *Cytotherapy*. 2005;7(4):328-33.
336. Helene Trebeden-Negre MRac. Delayed recovery after autologous peripheral hematopoietic cell transplantation: potencial effect of a high number of total nucleated cells in the graft. *Transfusion*. 2010;50:2649-59.
337. E. Fois MDac. Recovery, viability ans clinical toxicity of thawed and washed haematopoietic progenitor cells: analysis of 952 autologous peripheral blood stem cell transplantations. *Bone Marrow Transplantation*. 2007;40:831-5.
338. Scott D. Rowley WIBac. Effect os Cell Concentration on Bone Marrow and Peripheral Blood Stem Cell Cryopreservation. *Blood*. 1994;83(9):2731-6.
339. Cabezudo E, Dalmases C, Ruz M, Sanchez JA, Torrico C, Sola C, et al. Leukapheresis components may be cryopreserved at high cell concentrations without additional loss of HPC function. *Transfusion*. 2000;40(10):1223-7.
340. Martin-Henao GA, Torrico C, Azqueta C, Amill B, Querol S, Garcia J. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells from apheresis at high cell

concentrations does not impair the hematopoietic recovery after transplantation. *Transfusion*. 2005;45(12):1917-24.

341. Padilla-Noriega L, Mendez-Toss M, Menchaca G, Contreras JF, Romero-Guido P, Puerto FI, et al. Antigenic and genomic diversity of human rotavirus VP4 in two consecutive epidemic seasons in Mexico. *Journal of clinical microbiology*. 1998;36(6):1688-92.

342. Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1999;47(9):1101-10.

343. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833(12):3448-59.

344. Wyllie AH. Apoptosis and carcinogenesis. *European journal of cell biology*. 1997;73(3):189-97.

345. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *The American journal of medicine*. 1999;107(5):489-506.

346. McGeehan GM, Becherer JD, Bast RC, Jr., Boyer CM, Champion B, Connolly KM, et al. Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature*. 1994;370(6490):558-61.

347. Mohler KM, Sleath PR, Fitzner JN, Cerretti DP, Alderson M, Kerwar SS, et al. Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing. *Nature*. 1994;370(6486):218-20.

348. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26(4):239-57.

349. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine reviews*. 1993;14(2):133-51.

350. Lazebnik YA, Cole S, Cooke CA, Nelson WG, Earnshaw WC. Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *The Journal of cell biology*. 1993;123(1):7-22.

351. Patki AH, Lederman MM. Detection of apoptotic cells by selective precipitation of [3H]thymidine-labelled DNA. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1996;3(1):1-4.

352. Bodmer JL, Meier P, Tschopp J, Schneider P. Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(27):20632-7.
353. Kimura E, Aoki S, Kikuta E, Koike T. A macrocyclic zinc(II) fluorophore as a detector of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(7):3731-6.
354. Kimura F, Suzu S, Nakamura Y, Nakata Y, Yamada M, Kuwada N, et al. Cloning and characterization of a novel RING-B-box-coiled-coil protein with apoptotic function. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(27):25046-54.
355. Kimura M, Haisa M, Uetsuka H, Takaoka M, Ohkawa T, Kawashima R, et al. TNF combined with IFN-alpha accelerates NF-kappaB-mediated apoptosis through enhancement of Fas expression in colon cancer cells. *Cell death and differentiation*. 2003;10(6):718-28.
356. Kimura M, Itoh N, Takagi S, Sasao T, Takahashi A, Masumori N, et al. Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. *Journal of andrology*. 2003;24(2):185-91.
357. Nagata S. A death factor--the other side of the coin. *Behring Institute Mitteilungen*. 1996(97):1-11.
358. Estaquier J, Tanaka M, Suda T, Nagata S, Golstein P, Ameisen JC. Fas-mediated apoptosis of CD4+ and CD8+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons: differential in vitro preventive effect of cytokines and protease antagonists. *Blood*. 1996;87(12):4959-66.
359. Nagata M, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama K, Loh D, Watanabe T. Apoptosis during an early stage of nephrogenesis induces renal hypoplasia in bcl-2-deficient mice. *The American journal of pathology*. 1996;148(5):1601-11.
360. Nagata S. Fas-induced apoptosis, and diseases caused by its abnormality. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 1996;1(10):873-9.
361. Nagata S. Fas-mediated apoptosis. *Advances in experimental medicine and biology*. 1996;406:119-24.
362. Nagata S. Apoptosis mediated by the Fas system. *Progress in molecular and subcellular biology*. 1996;16:87-103.
363. Salmena L, Lemmers B, Hakem A, Matysiak-Zablocki E, Murakami K, Au PY, et al. Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes & development*. 2003;17(7):883-95.

364. Strange R, Friis RR, Bemis LT, Geske FJ. Programmed cell death during mammary gland involution. *Methods in cell biology*. 1995;46:355-68.
365. Duke RC, Ojcius DM, Young JD. Cell suicide in health and disease. *Scientific American*. 1996;275(6):80-7.
366. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267(5203):1456-62.
367. Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(6):2239-44.
368. Liles WC, Huang JE, Llewellyn C, SenGupta D, Price TH, Dale DC. A comparative trial of granulocyte-colony-stimulating factor and dexamethasone, separately and in combination, for the mobilization of neutrophils in the peripheral blood of normal volunteers. *Transfusion*. 1997;37(2):182-7.
369. Liles WC, Huang JE, van Burik JA, Bowden RA, Dale DC. Granulocyte colony-stimulating factor administered in vivo augments neutrophil-mediated activity against opportunistic fungal pathogens. *The Journal of infectious diseases*. 1997;175(4):1012-5.
370. Nagata S. Apoptosis: telling cells their time is up. *Current biology : CB*. 1996;6(10):1241-3.
371. Darnay BG, Aggarwal BB. Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. *Journal of leukocyte biology*. 1997;61(5):559-66.
372. Magnusson C, Vaux DL. Signalling by CD95 and TNF receptors: not only life and death. *Immunology and cell biology*. 1999;77(1):41-6.
373. Willey DR, Southwick RJ, Ramadas K, Rapela BK, Neff WA. Laboratory observation of maser action in NH₃ through collisional cooling. *Physical review letters*. 1995;74(26):5216-9.
374. Badley AD, Pilon AA, Landay A, Lynch DH. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. *Blood*. 2000;96(9):2951-64.
375. Enokido Y, Araki T, Tanaka K, Aizawa S, Hatanaka H. Involvement of p53 in DNA strand break-induced apoptosis in postmitotic CNS neurons. *The European journal of neuroscience*. 1996;8(9):1812-21.
376. Hsu B, Marin MC, el-Naggar AK, Stephens LC, Brisbay S, McDonnell TJ. Evidence that c-myc mediated apoptosis does not require wild-type p53 during lymphomagenesis. *Oncogene*. 1995;11(1):175-9.

377. Matsuno T, Sasaki H, Ishido N, Nakagawa K, Ishikawa T, Oishi A, et al. Apoptosis in human kidney allografts. *Transplantation proceedings*. 1996;28(3):1226-7.
378. Okura Y, Tanaka R, Ono K, Yoshida S, Watanabe T. Analysis of neuronal death in the central nervous system using a new apoptosis model. *Neuroscience research*. 1996;26(3):279-88.
379. Tanaka M, Lee K, Martinez-Augustin O, He Y, Sanderson IR, Walker WA. Exogenous nucleotides alter the proliferation, differentiation and apoptosis of human small intestinal epithelium. *The Journal of nutrition*. 1996;126(2):424-33.
380. Tanaka S, Wands JR. Insulin receptor substrate 1 overexpression in human hepatocellular carcinoma cells prevents transforming growth factor beta1-induced apoptosis. *Cancer research*. 1996;56(15):3391-4.
381. Memon SA, Hou J, Moreno MB, Zacharchuk CM. Apoptosis induced by a chimeric Fas/FLICE receptor: lack of requirement for Fas- or FADD-binding proteins. *Journal of immunology*. 1998;160(5):2046-9.
382. Hsu HL, Yeh NH. Dynamic changes of NuMA during the cell cycle and possible appearance of a truncated form of NuMA during apoptosis. *Journal of cell science*. 1996;109 (Pt 2):277-88.
383. Kaipia A, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. Tumor necrosis factor-alpha and its second messenger, ceramide, stimulate apoptosis in cultured ovarian follicles. *Endocrinology*. 1996;137(11):4864-70.
384. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*. 1996;87(3):565-76.
385. Ball DJ, Luo Y, Kessel D, Griffiths J, Brown SB, Vernon DI. The induction of apoptosis by a positively charged methylene blue derivative. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 1998;42(2):159-63.
386. Bouchon A, Krammer PH, Walczak H. Critical role for mitochondria in B cell receptor-mediated apoptosis. *European journal of immunology*. 2000;30(1):69-77.
387. Luo X, Huang Z, Xiao G, Tang A, Deng Y. [Protection of hypertonic saline/mannitol to thymic cell apoptosis induced by endotoxin (LPS) in mice]. *Hunan yi ke da xue xue bao = Hunan yike daxue xuebao = Bulletin of Hunan Medical University*. 1998;23(1):14-6.

388. Luo Y, Umegaki H, Wang X, Abe R, Roth GS. Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(6):3756-64.
389. Schmitz I, Kirchhoff S, Krammer PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2000;32(11-12):1123-36.
390. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, et al. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*. 2000;12(6):599-609.
391. Stegh AH, Herrmann H, Lampel S, Weisenberger D, Andra K, Seper M, et al. Identification of the cytolinker plectin as a major early in vivo substrate for caspase 8 during CD95- and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(15):5665-79.
392. Walczak H, Bouchon A, Stahl H, Krammer PH. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells. *Cancer research*. 2000;60(11):3051-7.
393. Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Experimental cell research*. 2000;256(1):58-66.
394. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical journal*. 1997;326 (Pt 1):1-16.
395. Miller DK. The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Seminars in immunology*. 1997;9(1):35-49.
396. Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P, et al. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nature cell biology*. 2000;2(4):241-3.
397. Casciola-Rosen L, Rosen A. Ultraviolet light-induced keratinocyte apoptosis: a potential mechanism for the induction of skin lesions and autoantibody production in LE. *Lupus*. 1997;6(2):175-80.
398. Casciola-Rosen L, Wigley F, Rosen A. Scleroderma autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalyzed oxidation reactions: implications for pathogenesis. *The Journal of experimental medicine*. 1997;185(1):71-9.

399. Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, et al. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(15):7464-9.
400. LeBlanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, Totpal K, Morlan J, Schow P, et al. Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nature medicine*. 2002;8(3):274-81.
401. Patel T. Apoptosis in hepatic pathophysiology. *Clinics in liver disease*. 2000;4(2):295-317.
402. Patel VA, Hill DJ, Sheppard MC, Wang F, Logan A, Eggo MC. Apoptosis during goitre involution - the role of Bcl-2. *The Journal of endocrinology*. 2000;164(3):323-30.
403. Poulaki V, Mitsiades CS, Kotoula V, Tseleni-Balafouta S, Ashkenazi A, Koutras DA, et al. Regulation of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells. *The American journal of pathology*. 2002;161(2):643-54.
404. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual review of cell and developmental biology*. 1999;15:269-90.
405. Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *The EMBO journal*. 1999;18(19):5242-51.
406. Germain M, Affar EB, D'Amours D, Dixit VM, Salvesen GS, Poirier GG. Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(40):28379-84.
407. Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, et al. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(10):5752-7.
408. Wolf BB, Goldstein JC, Stennicke HR, Beere H, Amarante-Mendes GP, Salvesen GS, et al. Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. *Blood*. 1999;94(5):1683-92.

409. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*. 2002;111(3):331-42.
410. Imai Y, Kimura T, Murakami A, Yajima N, Sakamaki K, Yonehara S. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature*. 1999;398(6730):777-85.
411. Imaizumi K, Morihara T, Mori Y, Katayama T, Tsuda M, Furuyama T, et al. The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the BCL2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(12):7975-81.
412. Kannan K, Holcombe RF, Jain SK, Alvarez-Hernandez X, Chervenak R, Wolf RE, et al. Evidence for the induction of apoptosis by endosulfan in a human T-cell leukemic line. *Molecular and cellular biochemistry*. 2000;205(1-2):53-66.
413. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP*. 2000;7(3):153-63.
414. Behrens MM, Martinez JL, Moratilla C, Renart J. Apoptosis induced by protein kinase C inhibition in a neuroblastoma cell line. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1995;6(11):1375-80.
415. Ferrer I, Martin F, Serrano T, Reiriz J, Perez-Navarro E, Alberch J, et al. Both apoptosis and necrosis occur following intrastriatal administration of excitotoxins. *Acta neuropathologica*. 1995;90(5):504-10.
416. Green DR, Martin SJ. The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. *Current opinion in immunology*. 1995;7(5):694-703.
417. Gulbins E, Bissonnette R, Mahboubi A, Martin S, Nishioka W, Brunner T, et al. FAS-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signaling pathway. *Immunity*. 1995;2(4):341-51.
418. Hartsell TL, Yalowich JC, Ritke MK, Martinez AJ, Schor NF. Induction of apoptosis in murine and human neuroblastoma cell lines by the enediyne natural product neocarzinostatin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1995;275(1):479-85.
419. Koopman G, Keehnen RM, Lindhout E, Newman W, Shimizu Y, van Seventer GA, et al. Adhesion through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4

(CD49d)-VCAM-1 (CD106) pathways prevents apoptosis of germinal center B cells. *Journal of immunology*. 1994;152(8):3760-7.

420. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994;84(5):1415-20.

421. Krams SM, Egawa H, Quinn MB, Martinez OM. Apoptosis as a mechanism of cell death in a rat model of liver allograft rejection. *Transplantation proceedings*. 1995;27(1):466-7.

422. Maldarelli F, Sato H, Berthold E, Orenstein J, Martin MA. Rapid induction of apoptosis by cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology*. 1995;69(10):6457-65.

423. Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*. 1995;82(3):349-52.

424. Martin SJ, Green DR. Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Critical reviews in oncology/hematology*. 1995;18(2):137-53.

425. Martin SJ, Green DR. Apoptosis during HIV infection. A cytopathic effect of HIV or an important host-defense mechanism against viruses in general? *Advances in experimental medicine and biology*. 1995;374:129-38.

426. Martin SJ, Takayama S, McGahon AJ, Miyashita T, Corbeil J, Kolesnick RN, et al. Inhibition of ceramide-induced apoptosis by Bcl-2. *Cell death and differentiation*. 1995;2(4):253-7.

427. Bossy-Wetzel E, Green DR. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutation research*. 1999;434(3):243-51.

428. Bossy-Wetzel E, Green DR. Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(25):17484-90.

429. Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW, et al. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science*. 1999;284(5411):156-9.

430. Cotton J, Spandau DF. Ultraviolet B-radiation dose influences the induction of apoptosis and p53 in human keratinocytes. *Radiation research*. 1997;147(2):148-55.

431. Cotton MF, Ikle DN, Rapaport EL, Marschner S, Tseng PO, Kurrle R, et al. Apoptosis of CD4+ and CD8+ T cells isolated immediately ex vivo correlates with

disease severity in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatric research*. 1997;42(5):656-64.

432. Moller P, Henne C, Schmidt A, Eichelmann A, Leithauser F, Bruderlein S, et al. [Expression of APO-1, a cell surface molecule mediating apoptosis, during normal B cell ontogeny and in B cell tumors. Co-expression and coregulation of APO-1 and ICAM-1 (CD54) in germinal central cells]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft fur Pathologie*. 1992;76:237-42.

433. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of immunological methods*. 1991;139(2):271-9.

434. Lassus P, Hibner U. Detection and quantification of apoptosis in transiently transfected adherent cells. *Nucleic acids research*. 1998;26(22):5233-4.

435. Look AT. Arsenic and apoptosis in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90(2):86-8.

436. Tonetti MS, Cortellini D, Lang NP. In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingiva. *Infection and immunity*. 1998;66(11):5190-5.

437. Berman JR, McCarthy MM, Kyprianou N. Effect of estrogen withdrawal on nitric oxide synthase expression and apoptosis in the rat vagina. *Urology*. 1998;51(4):650-6.

438. Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport*. 1995;7(1):61-4.

439. McCarthy JV, Dixit VM. Apoptosis induced by *Drosophila* reaper and grim in a human system. Attenuation by inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(37):24009-15.

440. McCarthy NJ, Evan GI. Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Current topics in developmental biology*. 1998;36:259-78.

441. Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *The Biochemical journal*. 1992;286 (Pt 2):331-4.

442. Cohen JJ. Glucocorticoid-induced apoptosis in the thymus. *Seminars in immunology*. 1992;4(6):363-9.

443. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annual review of immunology*. 1992;10:267-93.

444. Falcieri E, Martelli AM, Bareggi R, Cataldi A, Cocco L. The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993;193(1):19-25.
445. Fehsel K, Kolb-Bachofen V, Kolb H. Analysis of TNF alpha-induced DNA strand breaks at the single cell level. *The American journal of pathology*. 1991;139(2):251-4.
446. Gold R, Schmied M, Rothe G, Zischler H, Breitschopf H, Wekerle H, et al. Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1993;41(7):1023-30.
447. Gorczyca W, Bigman K, Mittelman A, Ahmed T, Gong J, Melamed MR, et al. Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias. *Leukemia*. 1993;7(5):659-70.
448. Gorczyca W, Gong J, Ardelt B, Traganos F, Darzynkiewicz Z. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer research*. 1993;53(13):3186-92.
449. Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Apoptosis of S-phase HL-60 cells induced by DNA topoisomerase inhibitors: detection of DNA strand breaks by flow cytometry using the in situ nick translation assay. *Toxicology letters*. 1993;67(1-3):249-58.
450. Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. [Programmed death of cells (apoptosis)]. *Patologia polska*. 1993;44(3):113-9.
451. Zamai L, Falcieri E, Zauli G, Cataldi A, Vitale M. Optimal detection of apoptosis by flow cytometry depends on cell morphology. *Cytometry*. 1993;14(8):891-7.
452. Gougeon ML, Olivier R, Garcia S, Guetard D, Dragic T, Dauguet C, et al. [Demonstration of an engagement process towards cell death by apoptosis in lymphocytes of HIV infected patients]. *Comptes rendus de l'Academie des sciences Serie III, Sciences de la vie*. 1991;312(11):529-37.
453. Telford WG, King LE, Fraker PJ. Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry*. 1992;13(2):137-43.

454. Arends MJ, McGregor AH, Toft NJ, Brown EJ, Wyllie AH. Susceptibility to apoptosis is differentially regulated by c-myc and mutated Ha-ras oncogenes and is associated with endonuclease availability. *British journal of cancer*. 1993;68(6):1127-33.
455. Brown DG, Sun XM, Cohen GM. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(5):3037-9.
456. Olivier R. Flow cytometry technique for assessing effects of N-acetylcysteine on apoptosis and cell viability of human immunodeficiency virus-infected lymphocytes. *Methods in enzymology*. 1995;251:270-8.
457. Ormerod MG, Sun XM, Brown D, Snowden RT, Cohen GM. Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Acta oncologica*. 1993;32(4):417-24.
458. Petit PX, Lecoeur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *The Journal of cell biology*. 1995;130(1):157-67.
459. Gatti R, Belletti S, Orlandini G, Bussolati O, Dall'Asta V, Gazzola GC. Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1998;46(8):895-900.
460. Gougeon ML, Lecoeur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, et al. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *Journal of immunology*. 1996;156(9):3509-20.
461. Gougeon ML, Lecoeur H, Heeney J, Boudet F. Comparative analysis of apoptosis in HIV-infected humans and chimpanzees: relation with lymphocyte activation. *Immunology letters*. 1996;51(1-2):75-81.
462. Lecoeur H, Gougeon ML. Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons. Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes. *Journal of immunological methods*. 1996;198(1):87-99.
463. Clarke AR. Controlling apoptosis: implications for carcinogenesis? *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 2000;52:265-75.

464. Clarke P, Meintzer SM, Gibson S, Widmann C, Garrington TP, Johnson GL, et al. Reovirus-induced apoptosis is mediated by TRAIL. *Journal of virology*. 2000;74(17):8135-9.
465. Clarke R, Lund E, Johnson II, Pinder A. Apoptosis can be detected in attached colonic adenocarcinoma HT29 cells using annexin V binding, but not by TUNEL assay or sub-G0 DNA content. *Cytometry*. 2000;40(3):252.
466. Haanen C, Vermes I. Apoptosis and inflammation. *Mediators of inflammation*. 1995;4(1):5-15.
467. Homburg CH, de Haas M, von dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood*. 1995;85(2):532-40.
468. Abrahamsen JF, Bakken AM, Bruserud O, Gjertsen BT. Flow cytometric measurement of apoptosis and necrosis in cryopreserved PBPC concentrates from patients with malignant diseases. *Bone marrow transplantation*. 2002;29(2):165-71.
469. Anthony RS, McKelvie ND, Cunningham AJ, Craig JI, Rogers SY, Parker AC. Flow cytometry using annexin V can detect early apoptosis in peripheral blood stem cell harvests from patients with leukaemia and lymphoma. *Bone marrow transplantation*. 1998;21(5):441-6.
470. Schuurhuis GJ, Muijen MM, Oberink JW, de Boer F, Ossenkoppele GJ, Broxterman HJ. Large populations of non-clonogenic early apoptotic CD34-positive cells are present in frozen-thawed peripheral blood stem cell transplants. *Bone marrow transplantation*. 2001;27(5):487-98.
471. de Boer F, Drager AM, Pinedo HM, Kessler FL, van der Wall E, Jonkhoff AR, et al. Extensive early apoptosis in frozen-thawed CD34-positive stem cells decreases threshold doses for haematological recovery after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Bone marrow transplantation*. 2002;29(3):249-55.
472. Kluter H, Bubel S, Kirchner H, Wilhelm D. Febrile and allergic transfusion reactions after the transfusion of white cell-poor platelet preparations. *Transfusion*. 1999;39(11-12):1179-84.
473. Kluter H, Klinger M, Bauhaus M, Kirchner H. [Effect of leukocyte contamination on storage of platelet concentrates from buffy coats]. *Beitrage zur Infusionstherapie und Transfusionsmedizin = Contributions to infusion therapy and transfusion medicine*. 1994;32:61-5.

474. Kluter H, Muller-Steinhardt M, Danzer S, Wilhelm D, Kirchner H. Cytokines in platelet concentrates prepared from pooled buffy coats. *Vox sanguinis*. 1995;69(1):38-43.
475. Kluter H, Schlenke P, Muller-Steinhardt M, Paulsen M, Kirchner H. Impact of buffy coat storage on the generation of inflammatory cytokines and platelet activation. *Transfusion*. 1997;37(4):362-7.
476. Kluter H, Vieregge P, Stolze H, Kirchner H. Defective production of interleukin-2 in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences*. 1995;133(1-2):134-9.
477. Heddle NM, Blajchman MA. The leukodepletion of cellular blood products in the prevention of HLA-alloimmunization and refractoriness to allogeneic platelet transfusions. *Blood*. 1995;85(3):603-6.
478. Heddle NM, Blajchman MA, Meyer RM, Lipton JH, Walker IR, Sher GD, et al. A randomized controlled trial comparing the frequency of acute reactions to plasma-removed platelets and prestorage WBC-reduced platelets. *Transfusion*. 2002;42(5):556-66.
479. Heddle NM, Brox WT, Klama LN, Dickson LL, Levine MN. A randomized trial on the efficacy of an autologous blood drainage and transfusion device in patients undergoing elective knee arthroplasty. *Transfusion*. 1992;32(8):742-6.
480. Heddle NM, Cook RJ. Composite outcomes in clinical trials: what are they and when should they be used? *Transfusion*. 2011;51(1):11-3.
481. Heddle NM, Cook RJ, Arnold DM, Crowther MA, Warkentin TE, Webert KE, et al. The effect of blood storage duration on in-hospital mortality: a randomized controlled pilot feasibility trial. *Transfusion*. 2012;52(6):1203-12.
482. Heddle NM, Cook RJ, Blajchman MA, Barty RL, Sigouin CS, Boye DM, et al. Assessing the effectiveness of whole blood-derived platelets stored as a pool: a randomized block noninferiority trial. *Transfusion*. 2005;45(6):896-903.
483. Heddle NM, Cook RJ, Sigouin C, Slichter SJ, Murphy M, Rebullia P, et al. A descriptive analysis of international transfusion practice and bleeding outcomes in patients with acute leukemia. *Transfusion*. 2006;46(6):903-11.
484. Heddle NM, Cook RJ, Timmouth A, Kouroukis CT, Hervig T, Klapper E, et al. A randomized controlled trial comparing standard- and low-dose strategies for transfusion of platelets (SToP) to patients with thrombocytopenia. *Blood*. 2009;113(7):1564-73.

485. Heddle NM, Cook RJ, Webert KE, Sigouin C, Rebullia P, Biomedical Excellence for Safer Transfusion Working Party of the International Society for Blood T. Methodologic issues in the use of bleeding as an outcome in transfusion medicine studies. *Transfusion*. 2003;43(6):742-52.
486. Heddle NM, Fung M, Hervig T, Szczepiorkowski ZM, Torretta L, Arnold E, et al. Challenges and opportunities to prevent transfusion errors: a Qualitative Evaluation for Safer Transfusion (QUEST). *Transfusion*. 2012;52(8):1687-95.
487. Heddle NM, Klama L, Meyer R, Walker I, Boshkov L, Roberts R, et al. A randomized controlled trial comparing plasma removal with white cell reduction to prevent reactions to platelets. *Transfusion*. 1999;39(3):231-8.
488. Heddle NM, Klama L, Singer J, Richards C, Fedak P, Walker I, et al. The role of the plasma from platelet concentrates in transfusion reactions. *The New England journal of medicine*. 1994;331(10):625-8.
489. Heddle NM, Klama LN, Griffith L, Roberts R, Shukla G, Kelton JG. A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions. *Transfusion*. 1993;33(10):794-7.
490. Heddle NM, Lane SJ, Sholapur N, Arnold E, Newbold B, Eyles J, et al. Implementation and public acceptability: lessons from food irradiation and how they might apply to pathogen reduction in blood products. *Vox sanguinis*. 2014.
491. Heddle NM, Liu Y, Barty R, Webert KE, Whittaker S, Gagliardi K, et al. Factors affecting the frequency of red blood cell outdates: an approach to establish benchmarking targets. *Transfusion*. 2009;49(2):219-26.
492. Heddle NM, Ness P. Clinical research design and reporting: always room for improvement! *Transfusion*. 2007;47(1):2-3.
493. Heddle NM, O'Hoski P, Singer J, McBride JA, Ali MA, Kelton JG. A prospective study to determine the safety of omitting the antiglobulin crossmatch from pretransfusion testing. *British journal of haematology*. 1992;81(4):579-84.
494. Heddle NM, Soutar RL, O'Hoski PL, Singer J, McBride JA, Ali MA, et al. A prospective study to determine the frequency and clinical significance of alloimmunization post-transfusion. *British journal of haematology*. 1995;91(4):1000-5.
495. Cordoba R, Arrieta R, Kerguelen A, Hernandez-Navarro F. The occurrence of adverse events during the infusion of autologous peripheral blood stem cells is related to the number of granulocytes in the leukapheresis product. *Bone marrow transplantation*. 2007;40(11):1063-7.

10 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1. ARTIGO 1

**EFFECT OF THE LOW CONCENTRATION OF DMSO IN THE VIABILITY
MEASURED BY FLOW CYTOMETRY OF THE HEMATOPOIETIC STEM CELLS
STORED IN MECHANICAL FREEZER.**

**EFFECT OF THE LOW CONCENTRATION OF DMSO IN THE VIABILITY
MEASURED BY FLOW CYTOMETRY OF THE HEMATOPOIETIC STEM CELLS
STORED IN MECHANICAL FREEZER.**

**Gustavo Brandão Fischer^{a,b}, Ana Paula Alegretti^d, Gabrielle Dias Salton^c,
Anelise Bergmann Araújo^c, Liane Marise Röhsig^c, Juliana Monteiro Furlan^c,
Melissa Helena Angeli^c, Tissiana Schmalfluss^c, , Bianca Pfaffenseller^f, Maria
Lúcia Scroferneker^{a,e}**

**^a Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.**

**^b M.d. Hematology and Hematopoietic Stem Cell Transplantation Service,
Hospital de Clínicas de Porto Alegre**

**^c Cellular Therapy Unity and Cord Blood Bank of Hospital de Clínicas de
Porto Alegre**

**^d Personalized Diagnostic Unity, Flow Cytometry Service, Hospital de
Clínicas de Porto Alegre**

**^e Microbiology, Immunology and Parasitology Department, ICBS,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

^f Biochemistry Post graduation Program

Correspondence and reprints:

**Gustavo Brandão Fischer, Rua Visconde Duprat 53/703 Petrópolis, Rio Grande
do Sul, Brazil.**

ZIP Code: 90690-430

E-Mail: gustavo_fischer@msn.com and scrofern@ufrgs.br

Telephone Number: 55-51-98913886

ABSTRACT

Bone Marrow Transplantation (BMT) is based on the principle of hematopoietic CD34 stem cells infusion in a conditioned recipient. It is known that such cells are capable of generating a new hematopoiesis as well as that the benefit of the increase of CD34 dose goes from 2 to 5 x 10⁶ CD34 / patient's body weight. The CD34 determination is based on the total CD34 number, however, it is known that only a small portion of the CD34 population is related to the marrow repopulating capacity. An alternative way of detecting such cells when compared to total CD34 dose is the cytometric analysis of cytoplasmatic granularity and size patterns.

In the autologous BMT context and, sometimes in the allogeneic type where the graft infusion occurs more than three days after the graft harvest, the CD34 cells freezing is necessary to keep their viability. The cryoprotective agent most commonly used is the DMSO which at extremely low temperatures this agent protects the CD34 cells from dying, however, at temperatures above 30°C it became toxic causing adverse events in the patient receiving them. The adverse reactions at the infusion moment are linked to DMSO thus there are some different cryopreservation protocols using different DMSO concentrations aiming to reduce the incidence of collateral damage and at the same time avoid the CD34 death at low temperatures. Some studies conclude that CD34 viability can be maintained with the use of high mononuclear cellularity in the graft or with low DMSO concentrations. Besides DMSO, albumin and Hydroxyethylstarch (HES) are cryoprotectants adjuvants. Some Cryopreservation protocols only use DMSO as cryoprotective agent while others indicate the three agents together. There is no consensus about the ideal cryopreservation protocol. An important number of studies suggest the use of DMSO 5 to 10% with albumin 20% and HES 6% in grafts with cellularity number of no more than 3 x 10⁸ cells/ml, however there are some new different protocols that use DMSO alone and at lower concentrations.

The present study studied the viability of CD34 cells using DMSO in three different concentrations of 1,25%, 2, 5% and 5% as a sole cryoprotective agent.

Key Words: Hematopoietic Stem Cell; CD34 positive; Flow Cytometry; Hematopoietic Stem Cell Transplantation; Cryobiology; Cellular Viability; Cytokines.

1. Introduction

The hematopoietic stem cells (HSC), by definition, express the surface antigen CD34, are not committed to any hematopoietic lineage and are responsible for maintenance of normal hematopoietic functioning (1-5).

In literature, there are large differences in the HSC dose to ensure an adequate hematologic engraftment after the hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), however it is well known that the great majority of studies establishes 2×10^6 CD34 / Kg of receptor weight, as a safe dose to transplantation (6-18). In the same way, it is well known that there is an inverse relation between the white blood cells engraftment time and HSC CD34 dose (19-25).

The CD34-positive cells mobilized for HSCT form a heterogenic population of HSC. It is now well known that only a small portion of CD34 positive cells is directly responsible for the primary hematopoietic function. Those cells have immunophenotypic surface markers besides the CD34 like CD133, CD110, among others. Some studies have already established specific cellular doses to HSCT when these markers are used together, and the results have shown clear correlation with better engraftment and lower mortality (26). However, the routine use of these markers as a whole has not been clearly used yet and therefore its use is only for research. On the other hand, it is possible to define more precisely this HSC cell group by the Flow Cytometric technique using cytoplasmatic granularity and cell size (Pattern Forward scatter and Sideward Scatter). In this way the CD34 positive HSC can be divided into high complexity and low complexity groups based on cross analysis of these two associated parameters. The former have a low degree of differentiation grade and high regenerative capability while the latter have a greater degree of differentiation as well as lower regenerative capacity (3).

The HSCT uses CD34 positive cells to repopulate with a healthy marrow the hematopoiesis capacity. It is necessary that the HSC is frozen to maintain its viability, especially in autologous stem cell transplantation where, after the HSC harvesting from peripheral blood, the patient undergoes a 3 to 8-day myeloablative chemotherapy treatment (5, 12).

The HSC freezing has a principle the use of cryoprotective agents to maintain the HSC viability under very low temperatures. It is known that, there is loss of

viability of freezing HSC, due to some factors like as cryoinjury caused by direct cold damage, and more importantly, the loss of viability after thawing by the same cryoprotective agent Dymetilsulfoxide (DMSO) (25). In addition, this agent is associated with sometimes severe adverse reaction during the graft's infusion. The ideal DMSO dose as well as the cryoprotective solution composition varies considerably the different hematopoietic stem cell centers around the world. The present state of the art is to use the lowest possible DMSO dose that can maintain the HSC viability and reduce the undesirable adverse effects during the infusion period (27). Other variables, like the graft cellularity, are also associated with graft viability. There is an inverse relation between graft cellularity and graft viability (20). This paper aimed to analyze the influence of different DMSO concentrations on the high and low complexity HSC viability frozen in a mechanical freezer.

2. Material and Methods

Experimental Study with controlled intervention and not randomized.

We allocate 19 patients as candidates to HSC harvest from peripheral blood for autologous stem cell therapy from December 2013 to May 2014 in two hospital centers of Porto Alegre city: Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Hemotherapy Service of Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre. Only the patients over 18 years old were allocated. The study was approved by ethical committees in both hospitals and approved on the internet National Research Ethics Platform. The researchers signed a confidentiality term to use patient's data, and the patients signed a consent term to enter the study. Each of 19 patients was associated with the following samples: 1 fresh sample for control analysis, 1 with DMSO 5%, 1 with DMSO 2,5%, 1 with DMSO 1,25%, 1 with DMSO 5% plus cryoprotective solution, 1 with DMSO 2,5% plus cryoprotective solution, 1 with DMSO 1,25% plus cryoprotective solution, 1 with DMSO 5% for cytokine dosage and 1 with DMSO 2,5% for cytokine dosing. Therefore, each patient generated nine unity samples.

Of the total 19 patients enrolled, 3 left from the final analysis because of methodological problems with the flow cytometry protocol, and 1 was used as a negative control of frozen HSC without cryoprotective agent. The peripheral HSC were mobilized using granulocyte growth factor at a dose of 10 mcg/kg/day for 5 days. The aphaeresis harvests began on the fifth day after the onset of granulocyte growth factor as the local protocol guideline.

The HSC harvest was done by aphaeresis technique using the MCS+ (Haemonetics, Braintree MA), Baxter CS 3000 Plus (Baxter Healthcare, Deerfield IL) or Cobe Spectra (COBE BCT Inc., Lakewood, CO), and the anticoagulant was the acid-citrate-dextrose (ACD).

Flow Cytometry

The CD34 dosing was done by flow cytometry according the double platform ISHAGE protocol.

The samples were harvested in EDTA tubes. We did a complete blood count initially. We prepared 10 μ L samples incubated with CD34, CD45, 7AAD, Annexin and waited 15 minutes in a light protected box. We add 1 ml of a red blood cells lyse solution (Pharmalyse [®]) for more 15 minutes.

In the flow cytometer, we acquire 75 thousand events in the CD45+- FITC gate.

The reagents and antibodies used were: Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I[®] (BD Pharmigen, San Diego, CA, USA) is composed by Annexin V protein conjugated to FITC fluorochrome and the intracytoplasmatic vital dye named 7-AAD, allowing the identification of the population of CD45 positive and CD34 positive cells in the recent apoptosis stage (Annexin V positive and 7-AAD negative), non-viable late apoptotic cells (Annexin V negative and 7-AAD positive), and viable cells (Annexin V and 7-AAD double negative).

The HSC complexity was defined by the pattern of Sideward Scatter and Forward Scatter pattern with the criteria of cytoplasmatic granularity and cell using the Flow Cytometry technique. The CD45 positive population with low pattern of

sideward scatter was classified as low (CD45^{Bright}) and the higher sideward scatter HSC pattern was classified as high complexity ones (CD45^{dim}).

The antibodies and reagents used in Flow Cytometry technique were: CD45 APC-linked (Clone H130 Biolegend), CD34 PE-linked (Clone 8G12 BD Biosciences), 7-AAD *Viability Staining Solution* (Biolegend), *Annexin V* FITC-linked (Biolegend), *Annexin Binding Buffer* (Biolegend), BD *Pharm Lyse – Lysing Buffer* diluted 1:10 (BD Biosciences).

Equipments: Hematologic Automated Analyzer SYSMEX XE-5000, Flow Cytometer BD FACSCanto II.

Processing and HSC cryopreservation

The HSC samples harvested by aphaeresis were centrifuged at 950 G for ten minutes at 4°C within 48 hours after the harvest maximum. After centrifugation, it was removed plasma to get final white mononuclear cells concentration of 6×10^8 /ml. Aliquots of 500 μ L of this concentrate were separated in cryotubes of 2 ml each. One of these aliquots, the fresh one, was sent to Personalized Diagnostic Service oh HCPA to dosing the HSC CD34 positive as well the viability of them by flow cytometry. The other samples were cryopreserved into 3 different cryoprotective solutions that varied by DMSO concentration. After the forty-day freezing period in a mechanical freezer -80°C, the samples were sent to the Flow Cytometry laboratory to do the viability tests after thawing in a 37°C bath for 10 minutes. In all of samples we used saline to dilute the high cellular counting. A volume of 500 μ L of each cryoprotective solution was added to a cryotube with a HSC concentration of 6×10^8 /ml previously prepared. Therefore, the final cellular concentration was approximately $3 \times 10^8 \pm 0,4$ and the final DMSO concentration were as follows: 1) DMSO 1,25%; 2) DMSO 2,5% and 3) DMSO 5%. The samples were cryopreserved immediately in a mechanical -80°C freezer and kept during 45 ± 15 days.

Statistical Analysis

The statistical analysis was done using the *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) version 20.0. The mean and standard deviation were described and used to compare the test analysis of variation for repeated measures with the Bonferroni correlation when realized multiple comparisons. In case of two means comparison was done the Student t test for paired samples. It was considered a significance level of 5%.

3. Results

We analyzed fifteen patients. Each patient originated one sample for flow cytometry and fresh viability; the other samples were cryopreserved in a mechanical freezer with the DMSO concentrations: 5%, 2, 5% and 1, 25%. In total, each patient generated 4 analysis samples that were considered research unities, for a total of 60 research unities in the study. There was also one negative control in which the samples were cryopreserved without cryoprotective agents and in which the viability was zero.

The median of age was 52 years old, therefore eleven were male and 4 were women. With respect to diseases, 9 patients had Multiple Myeloma and 6 patients had Non-Hodgkin Lymphoma.

The median of CD34 positive cell was obtained in 11 of 15 patients. In the four others the CD34 count was not possible for technical reasons. The median was $2,6 \cdot 10^6$ /Kg.

The aphaeresis harvests were done from December 2013 to May 2014.

The means of lymphomonocytes and granulocytes were 34, 8% and 65, 11% in the buff coat bag respectively.

The interval between aphaeresis harvesting and freezing procedure was 3 days in one patient, 2 days in another one, one day in eleven ones and in the same day in two patients.

The mean cellularity before freezing was $2,94 \times 10^8$ cells/ml.

The mean percent of HSC CD34 positives in the Buffy coat bag was 0,75%, while the mean percent of high complexity CD34 positive was 0,46% and 0,27% for the low complexity population.

The mean of cryopreservation time was 49,53 days (28-68 days).

	Fresh/Control	DMSO 5%	DMSO 2,5%	DMSO 1,25%
Mean Viability	63,20%	60,84%	58,86%	57,85%
Mean LC Viability	94,3%	87,56%	94,75%	85,88%
Mean HC Viability	34,14%	28,33%	23,02%	24,07%
Mean LC apoptosis	Not available	6,58%	2,85%	9,31%
Mean HC apoptosis	Not available	22,05%	15,93%	21,67%

Table 1: Mean viabilities and mean apoptosis rates in the fresh/control group, DMSO 5%, DMSO 2, 5%, DMSO 1, 25%. HC = High complexity LC = Low complexity.

	Fresh/Control	DMSO 5%	DMSO 2,5%	DMSO 1,25%
Mean Viability	63,9±10,4	60,8±12	58,9±6,5	57,9±14,4
LC Mean Viability	94,3±5 ^a	87,6±23,9	94,7±3,3	85,9±11,2 ^b
HC Mean Viability	34,3±16,7	27,8±20,1	22,5±12,9	23,6±15,9
LC Necrosis	2,7±3,4 ^c	0,4±0,7 ^d	1,5±2,2	3,3±5,0
HC Necrosis	26,1±17,0	15,1±14,4	19,4±20,0	18,3±22,1
LC Necrosis/Apoptosis	1,3±1,6 ^e	3,2±11,3	0,4±0,7 ^f	1,4±2,2
HC Necrosis/Apoptosis	31,8±20,9	33,5±16,2	40,6±23,4	34,9±20,8

Table 2: Four possible outcomes (Viable HSC, Necrotic HSC, Necrotic/Apoptotic HSC and Apoptotic HSC) in HSC low and high complexity and their relationship with DMSO 5%, 2,5% and 1,25%. Difference a/b with $p=0,086$, difference c/d with $p=0,069$ and difference e/f with $p=0,081$

4. Discussion

In biomedical literature, there are large differences in total HSC dose necessary to assure an adequate hematopoietic engraftment in the context of HSCT, however, it is well known that the majority of papers establishes as safe dose that of 2×10^6 CD34 total/Kg of patient's weight (1-12).

The CD34 positive cells mobilized for HSCT form a heterogeneous HSC population. It is known that only a small portion of CD34 positive HSC are responsible for the main function of hematopoiesis. It is possible to define more precisely the true HSC group using the flow cytometry technique and analyzing the size and granularity patterns forward side scatter and sideward scatter (FSC x SSC) (14). Therefore, the CD34 positive cells can be divided into low and high complexity by this cross analysis of these two parameters (15). The former have low degree of differentiation and high regenerative capability while the latter have a high degree of as well as lower regenerative potential (16).

In the HSCT where the HSC are frozen before the infusion, it is necessary the use of cryoprotective solution to maintain the HSC viability at very low temperatures. There is loss of viability of frozen HSC caused by multiple factors such as, more importantly, loss of viability after thawing caused mainly by the cryoprotective agent (18). In addition, the most important cryoprotective agent called Dimethylsulfoxide (DMSO) is associated with a considerable number of adverse reactions during the infusion time because it is a substance with high toxicity potential. The estimated DMSO dose as the composition of the cryoprotective solution varies between the world transplant centers. The principle is the of the minimal DMSO dose to reduce the toxic effects in infusion (27). Other variables, like graft cellularity are associated with graft viability. There is an inverse correlation between graft cellularity and cellular viability (19; 20).

The toxicity related to thawed HSC infusion is due to DMSO present in the graft. However, another factor probably involved is the inflammatory cytokine burst released by leucocytes during the freezing time. Such cytokines have already been recognized in the context of non-hemolytic transfusion reactions and can contribute to the infusion-related toxicity (27).

This study was prospective and controlled because the great majority of studies in this area was almost always retrospective and uncontrolled, or when they had a control group, it was formed by previous clinical cases of different transplant centers.

The variables that could induce some bias were controlled: the freezing time was shorter (median 68 days) to avoid the bias of viability loss due to longer freezing time (more than six months) (23). We can speculate that shorter freezing periods could cause some false good results in terms of viability if we consider that there is some cell mortality caused by the freezing conditions. However, the chosen length of time that was approximately 45 days is the period that most transplantation centers use to harvest and after infuse the HSC. Similarly, the length of time between HSC harvest and freezing was only one day in eleven out of fifteen patients. This period of time was chosen to avoid cellular death and false negative results after thawing (24).

As to graft cellularity (19,20), the samples with numbers above 3×10^8 cells/ml were diluted with saline to obtain a mean cellular concentration of $2,94 \pm 0,4 \times 10^8$ in all samples. We used saline because some samples came to our laboratory without some plasma excess to dilute them as stated in many freezing protocols (26).

Another interesting characteristic of our study is the stratification of HSC in low and high complexity groups using the size and granularity pattern in flow cytometry. It is known that low complexity HSC are capable to generate efficient and long term engraftment, whereas the high complexity one include HSC more differentiated without true stem cell characteristics. With respect to complexity, it was surprisingly to note that low complexity HSC have much more high values of viability than the high complexity ones, and that total viability is in fact sub estimated due the high mortality rates of more differentiated cell population. This fact seems to explain that progenitor less differentiated cells are more resistant to external physical stimulus to necrosis and apoptosis as the freezing temperature as example. If we consider the HSCT context, we know that primitive HSC are more resistant to death due to physical stimuli as radiotherapy and chemotherapy, and it can explain why the reason for high doses of chemotherapy in conditioning regimens. As we can observe in table 1, the total HSC mean viability was only 63,20% in the fresh/control sample, while in this same sample but in the group of low complexity we found a viability of 94,8% compared to 34,14% in high complexity group.

The table 2 shows lower low complexity viability in the DMSO 1, 25% group compared to the control or fresh sample group, however it was just a trend because the results not reached statistical significance.

Finally if we consider the clinical significance of these results, we can see that even the statistically significant results that showed lower viability rates and higher cellular death rates within the DMSO only group, the results are approximately the same and show a minimal loss of the HSC graft. For example, the lower founded viability (DMSO 1, 25%) stayed 6% lower than the control group (64 x 58% respectively). If we concentrate in the low complexity population, the difference is 7% between the extremes. In clinical practice, the loss of less than 10% of graft HSC seems of little significance when compared to the possible benefit of reducing costs and adverse events in the infusion time.

Even considering a small sample size, we can note significance in some results and trend toward significance in others, therefore we believe in a strengthening in statistically power with more numbered samples.

We conclude that in cellular concentrations relatively high it seems possible to obtain acceptable viabilities with minimal losses of until 8% from those of fresh control group, even without other cryoprotective agents as HES and human albumin for example.

5. Acknowledgements

Thanks to FIPE/HCPA

Conflicts of interests: None

6. References

1. Anderson KC. Autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Journal of clinical apheresis*. 1995;10(3):131-8.
2. Au WY, Chan EC, Lie AK, Liang R, Leung AY, Ma SK, et al. Poor engraftment after allogeneic bone marrow transplantation: role of chimerism analysis in treatment and outcome. *Annals of hematology*. 2003;82(7):410-5.
3. Carella AM, Podesta M, Frassoni F, Raffo MR, Pollicardo N, Pungolino E, et al. Collection of 'normal' blood repopulating cells during early hemopoietic recovery after intensive conventional chemotherapy in chronic myelogenous leukemia. *Bone marrow transplantation*. 1993;12(3):267-71.
4. Chung IJ, Lee JJ, Park MR, Kook H, Cho SH, Hwang TJ, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell rescue of late graft failure after bone marrow transplantation in patients with aplastic anemia. *Journal of Korean medical science*. 2002;17(4):468-74.
5. Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, et al. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Experimental hematology*. 1999;27(9):1460-6.
6. Koumakis G, Filis J, Vassilomanolakis M, Papanastasiou K, Hajichristou H, Barbounis V, et al. Relation between hematological recovery and number of transplanted mononuclear cells in patients after high dose chemotherapy with peripheral blood stem cell rescue. *Blood cells, molecules & diseases*. 1995;21(3):235-8.
7. Lee SH, Lee MH, Lee JH, Min YH, Lee KH, Cheong JW, et al. Infused CD34+ cell dose predicts long-term survival in acute myelogenous leukemia patients who received allogeneic bone marrow transplantation from matched sibling donors in first complete remission. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2005;11(2):122-8.
8. Mavroudis D, Read E, Cottler-Fox M, Couriel D, Molldrem J, Carter C, 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.

9. Mavroudis DA, Read EJ, Molldrem J, Raptis A, Plante M, Carter CS, et al. T cell-depleted granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) modified allogeneic bone marrow transplantation for hematological malignancy improves graft CD34+ cell content but is associated with delayed pancytopenia. *Bone marrow transplantation*. 1998;21(5):431-40.
10. Min CK, Kim DW, Lee JW, Min WS, Kim CC. Additional stem cell therapy for graft failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Acta haematologica*. 2000;104(4):185-92.
11. Okamura A, Yakushijin K, Inui Y, Funakoshi Y, Kawamori Y, Shimada T, et al. Successful neutrophil engraftment by reduced use of granulocyte colony-stimulating factor after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with mycophenolate mofetil for graft-versus-host disease prophylaxis. *International journal of hematology*. 2011;93(6):765-70.
12. Rahman J, Chowdhury SA. Peripheral blood cells transplantation--a review article. *Bangladesh Medical Research Council bulletin*. 1999;25(1):14-23.
13. Wiesneth M, Schreiner T, Bunjes D, Bischof C, Erne E, Maccari B, et al. Comparison of T-cell-depleted BMT and PBPC with respect to chimerism, graft rejection, and leukemic relapse. *Journal of hematotherapy*. 1999;8(3):269-74.
14. Macedo A, Orfao A, Ciudad J, Gonzalez M, Vidriales B, Lopez-Berges MC, et al. Phenotypic analysis of CD34 subpopulations in normal human bone marrow and its application for the detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1995;9(11):1896-901.
15. Monreal MB, Pardo ML, Pavlovsky MA, Fernandez I, Corrado CS, Giere I, et al. Increased immature hematopoietic progenitor cells CD34+/CD38dim in myelodysplasia. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2006;70(2):63-70.
16. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Journal of hematotherapy*. 1996;5(3):213-26.
17. Harada N, Okamura S, Kubota A, Shimoda K, Ikematsu W, Kondo S, et al. Analysis of acute myeloid leukemia cells by flow cytometry, introducing a new light-scattering classification. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1994;120(9):553-7.
18. Abbruzzese L, Michieli M, Rupolo M, Toffola RT, Da Ponte A, Rossi FM, et al. A new freezing and storage procedure improves safety and viability of

haematopoietic stem cells and neutrophil engraftment: a single institution experience. *Vox sanguinis*. 2010;98(2):172-80.

19. Grilli G, Porcellini A, Lucarelli G. Role of serum on cryopreservation and subsequent viability of mouse bone marrow hemopoietic stem cells. *Cryobiology*. 1980;17(5):516-20.

20. Rowley SD. Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques. *Journal of hematotherapy*. 1992;1(3):233-50.

21. Biancotto A, Wank A, Perl S, Cook W, Olnes MJ, Dagur PK, et al. Baseline levels and temporal stability of 27 multiplexed serum cytokine concentrations in healthy subjects. *PloS one*. 2013;8(12):e76091.

22. Anagnostakis I, Papassavas AC, Michalopoulos E, Chatzistamatiou T, Andriopoulou S, Tsakris A, et al. Successful short-term cryopreservation of volume-reduced cord blood units in a cryogenic mechanical freezer: effects on cell recovery, viability, and clonogenic potential. *Transfusion*. 2014;54(1):211-23.

23. Muramaki M, Hara I, Miyake H, Yamada Y, Okada H, Kamidono S. Long-term cryopreservation of peripheral blood stem cells in patients with advanced germ cell tumors using the dump-freezing method at -80 degrees C. *Oncology reports*. 2003;10(6):1993-8.

24. Hubel A, Carlquist D, Clay M, McCullough J. Liquid storage, shipment, and cryopreservation of cord blood. *Transfusion*. 2004;44(4):518-25.

25. Rowley SD. Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques. *Journal of hematotherapy*. 1992;1(3):233-50.

26. Butterworth BE, Chapman JR. Exposure of hematopoietic stem cells to ethylene oxide during processing represents a potential carcinogenic risk for transplant recipients. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*. 2007;49(3):149-53.

27. Akkok CA, Liseth K, Hervig T, Rynningen A, Bruserud O, Ersvaer E. Use of different DMSO concentrations for cryopreservation of autologous peripheral blood stem cell grafts does not have any major impact on levels of leukocyte- and platelet-derived soluble mediators. *Cytotherapy*. 2009;11(6):749-60.

10.2. ARTIGO 2

EFFECT OF A COMBINATION OF CRYOPROTECTOR AGENTS COMPARED TO DMSO AS A SOLE CRYOPROTECTIVE AGENT IN THE HEMATOPOIETIC STEM CELLS VIABILITY MEASURED BY FLOW CYTOMETRY OF THE HEMATOPOIETIC STEM CELLS STORED IN MECHANICAL FREEZER.

EFFECT OF A COMBINATION OF CRYOPROTECTOR AGENTS COMPARED TO DMSO AS A SOLE CRYOPROTECTIVE AGENT IN THE HEMATOPOIETIC STEM CELLS VIABILITY MEASURED BY FLOW CYTOMETRY OF THE HEMATOPOIETIC STEM CELLS STORED IN MECHANICAL FREEZER.

Gustavo Brandão Fischer^{a,B}, Ana Paula Alegretti^d, Gabrielle Dias Salton^c, Anelise Bergmann Araújo^c, Liane Marise Röhsig^c, Juliana Monteiro Furlan^c, Melissa Helena Angeli^c, Tissiana Schmalfluss^c, Maria Lúcia Scroferneker^{a,e}

^a Graduate Program in Medicine : Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^b M.d. Hematology and Hematopoietic Stem Cell Transplantation Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

^c Cellular Therapy Unity and Cord Blood Bank of Hospital de Clínicas de Porto Alegre

^d Personalized Diagnostic Unity, Flow Cytometry Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

^e Microbiology, Immunology and Parasitology Department, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Correspondence and reprints:

Gustavo Brandão Fischer, Rua Visconde Duprat 53/703 Petrópolis, Rio Grande do Sul, Brazil.

ZIP Code: 90690-430

E-Mail: Gustavo_fischer@msn.com and scrofern@ufrgs.br

Telephone Number: 55-51-98913886

ABSTRACT

Bone Marrow Transplantation (BMT) is based in the principle of hematopoietic CD34 stem cells infusion in a conditioned recipient. It is known that such cells are capable of generate a new hematopoiesis. It is known that the benefit of CD34 dose is best when it is between 2 and 5 x 10⁶ CD34 / patient's body weight. The CD34 determination is based in the total CD34 number, however it is known that only a small portion of the CD34 population is related to the marrow repopulating capacity. An alternative way of detecting such cells when compared to total CD34 dose is the cytometric analysis of cytoplasmatic granularity and size patterns.

In the autologous BMT context and, sometimes in the allogeneic type where the graft infusion occurs more than three days after the graft harvest, the CD34 cells freezing is necessary to keep their viability. The commonest cryoprotective agent used is the DMSO. It is well known that in very low temperatures this agent protects the CD34 cells of dying, however in temperatures above 30 C it became toxic and causes adverse events in the patient that receive them. The adverse reactions in the infusion moment are linked to DMSO, so there are some different cryopreservation protocols that use different DMSO concentrations with the goal to reduce the incidence of collateral damage and at the same time keep the CD34 alive in low temperatures. Some studies conclude that CD34 viability can be maintained with the use of high mononuclear cellularity in the graft or with low DMSO concentrations. Besides DMSO, albumin and Hydroxietilstarch (HES) are cryoprotectants adjuvants. Some Cryopreservation protocols use only DMSO as cryoprotective agent, as others indicate the three agents together. There is no consensus about the ideal cryopreservation protocol. An important number of studies suggest the use of DMSO 5 to 10% with albumin and HES in grafts with cellularity number of no more than 3 x 10⁸ cells/ml, however there are some new different protocols that use DMSO alone and in lower concentrations.

The present study aimed to study the viability of CD34 cells using the Annexin-V and 7-AAD apoptosis reagents by flow cytometry in different DMSO concentration groups and in samples freeze with DMSO only and with DMSO plus cryoprotective agents cited above.

Key Words: Hematopoietic Stem Cell; CD34 positive; Flow Cytometry; Hematopoietic Stem Cell Transplantation; Cryobiology; Cellular Viability; Cytokines.

1. Introduction

The hematopoietic stem cells (HSC), by definition, express the surface antigen CD34, are not compromised with a hematopoietic lineage and are responsible by the normal hematopoietic functioning. (1-5).

There are several differences in relationship to HSC dose needed to ensure an adequate hematologic engraftment after the hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), however it is well known that the great majority of studies establishes as a safe dose to transplantation 2×10^6 CD34 by Kg of weight of the receptor.(6-18). In the same way, it is well known that there is an inverse relation between the white blood cells engraftment time and HSC CD34 dose.(19-25).

The CD34 positive cells mobilized for HSCT constitute a heterogenic population of HSC. It is well known nowadays that only a small portion of CD34 positive cells are directly responsible by the primordial hematopoietic function. These cells have immunophenotypic surface markers beyond the CD34 like the CD133, CD110 among others. Some studies already established specific cellular doses to HSCT when these markers are used together, and the results show correlation with better engraftment and lower mortality (3). However, the routine use of these markers are not used yet and therefore its use is limited to research field. In the other hand, it is possible to limit with more precision this HSC cell group by the Flow Cytometric technique using cytoplasmatic granularity and cell size (Pattern Forward scatter and Sideward Scatter). In this way, the CD34 positive HSC can be divided into high complexity and low complexity groups based on cross analysis of these two associated parameters. The former ones have low differentiation grade and high regenerative capacity while the second group shows a higher differentiation grade and lower regenerative capacity (14).

The HSCT uses CD34 positive cells to repopulate with a healthy marrow the hematopoiesis capacity. Especially in the autologous stem cell transplantation, where after the HSC harvest from peripheral blood, the patient receives a 3 to 8-day myeloablative chemotherapy regimen, it is necessary that the HSC be frozen to maintain its viability (19).

The HSC freezing have as a principle the use of cryoprotective agents needed to maintain the HSC viability under very low temperatures. It is known that exists loss

of viability of freeze HSC by some factors like as cryoinjury caused by direct cold damage, and more importantly, the loss of viability after thawing by the same cryoprotective agent Dymetilsulfoxide (DMSO) (20). Besides, this agent is associated to adverse reaction sometimes severe during the graft's infusion. The ideal DMSO dose as well the cryoprotective solution composition varies in a considerable way in the different hematopoietic stem cell centers around the world. The present state of the art is to use the lower possible DMSO dose that can maintain the HSC viability and reduce the undesirable adverse effects during the infusion period (20). Other variables, like the graft cellularity and another cryoprotective agents like HES and Human Albumin are also associated to graft viability. There is an inverse relation between graft cellularity and graft viability (22). Some studies show that grafts can maintain acceptable viabilities using the DMSO as the only cryoprotective agent (25), on the other hand a considerable number of other studies show the necessity of addittioning HES and Human Albumin to DMSO, mainly in high cellular concentration grafts for example (26;27).

This paper aimed to analyze the influence of the addition of HES and Human Albumin to DMSO in the viability rates of low and high complexity HSC.

2. Material and Methods

Experimental Study with controlled intervention and not randomized.

We allocate 19 patients candidates to HSC harvest from peripheral blood for autologous stem cell therapy in the period of December 2013 and May 2014 in two hospital centers of Porto Alegre city: Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Hemotherapy Service of Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre. Only patients with more than 18 years old were allocated. The study was approved by ethical committees in both hospitals and subscribed in the internet National Research Ethics Platform. The researches signed a confidentiality term to manipulate the patients registries, and the patients signed a consent term to enter the study.

Of the 19 total allocated patients, 3 left from the final analysis because methodological problems with the flow cytometry protocol, and 1 was used as negative control only freeze without cryoprotective agent.

The peripheral HSC were mobilized using granulocyte growth factor in a dose of 10 mcg/kg/day during 5 days. The aphaeresis harvests were initiated in the fifth day after the start of granulocyte growth factor as the local protocol guideline.

The HSC harvest was done by aphaeresis technique with the MCS+(Haemonetics, Braintree MA), Baxter CS 3000 Plus (Baxter Healthcare, Deerfield IL) or Cobe Spectra (COBE BCT Inc., Lakewood, CO), and the anticoagulant was the acid-citrate-dextrose (ACD).

2.1. Flow Cytometry

The CD34 dosing was done by flow cytometry using the double platform ISHAGE protocol.

The reagents and antibodies used were: Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I[®] (BD Pharmigen, San Diego, CA, USA) is formed by Annexin V protein conjugated to FITC fluorochrome and the intracytoplasmic vital dye named 7-AAD, owing the identification of the population of CD45 positive and CD34 positive cells in the recent apoptosis stage (Annexin V positive and 7-AAD negative), non-viable late apoptotic cells (Annexin V negative and 7-AAD positive), and viable cells (Annexin V and 7-AAD double negative).

The HSC complexity was defined by the pattern of sideward scatter and forward scatter with the criteria of cytoplasmatic granularity and cell with the flow cytometry technique. The CD45 positive population with low pattern of sideward scatter was classified as low (CD45^{Bright}) and the higher sideward scatter HSC pattern was classified as high complexity ones (CD45^{dim}).

The antibodies and reagents used in flow cytometry technique were: CD45 APC-linked (Clone H130 Biolegend), CD34 PE-linked (Clone 8G12 BD Biosciences), 7-AAD *Viability Staining Solution* (Biolegend), *Annexin V* FITC-linked (Biolegend), *Annexin Binding Buffer* (Biolegend), BD *Pharm Lyse – Lysing Buffer* diluted 1:10 (BD Biosciences).

Equipments: Hematologic Automated Analyzer SYSMEX XE-5000, Flow Cytometer BD FACSCanto II.

2.2 Processing and HSC cryopreservation

The HSC samples harvested by aphaeresis were centrifuged at 950 G during ten minutes at 4°C within 48 hours after the harvest maximum. After centrifugation, it was removed plasma to get final white mononuclear cells concentration of 6×10^8 /ml. Aliquots of 500 μ L of this concentrate were separated in cryotubes of 2 ml each. One of these aliquots, the fresh one, was sent to Personalized Diagnostic Service of HCPA to dosing the HSC CD34 positive as well the viability of them by flow cytometry. The other samples were cryopreserved into 2 different combinations of cryoprotective solutions. After the freezing period in a mechanical freezer -80°C, the samples were sent to the Flow Cytometry laboratory to do the viability tests. We used the cryoprotective agents called Hidroxyetilstarch (HES) 16, 6%, Human albumin 20% and DMSO in the 5%, 2,5% and 1,25% concentrations. In all samples we used saline to dilute the high cellular counting. A volume of 500 μ L of each cryoprotective solution was added to a cryotube with a HSC concentration of 6×10^8 /ml previously prepared. Therefore, the final cellular concentration was approximately $3 \times 10^8 \pm 0,4$ and the final cryoprotective agents concentrations were as follows: HES 4, 5%, Human Albumin 3, 5% and DMSO 5% and DMSO 5%. The samples were cryopreserved immediately in a mechanical -80°C freezer and kept during 45 ± 15 days.

3. Statistical Analysis

The statistical analysis was done using the *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) version 20.0. We described the mean and standard deviation and used to comparison the test analysis of variation for repeated measures with the Bonferroni correlation when realized multiple comparisons. In case of two means comparison was done the Student t test for paired samples. It was considered a significance level of 5%.

4. Results

We analyzed 15 patients in which the control was the own patient. Each patient originated one sample for flow cytometry and fresh viability, the other samples were frozen in a mechanical freezer with the DMSO concentrations: 5%, 2, 5%, 1, 25%, DMSO plus HES and Human Albumin 5%, DMSO plus HES and Human albumin 2, 5% and DMSO plus HES and Human Albumin 1, 25% and finally two samples with DMSO plus HES and Human albumin in 5% and 2, 5% concentrations to measure the cytokine concentration later. In total, each patient generated 9 analysis samples that were considered research unities, for a total of 135 research unities in the study.

The median of age was 52 years old, therefore eleven were male and 4 were women. With respect to diseases, 9 patient had Multiple Myeloma and 6 patients had Non-Hodgkin Lymphoma.

The median of CD34 positive cell was obtained in 11 of 15 patients. The other four CD34 counts were not available because technical reasons. The median was $2,6 \times 10^6$ /Kg.

The aphaeresis harvests were done during the period of December 2013 and May 2014.

The means of lymphomonocytes and granulocytes were 34, 8% and 65, 11% in the buff coat bag respectively.

The interval between aphaeresis harvesting and freezing procedure was 3 days in one patient, 2 days in another one, one day in eleven ones and in the same day in one patient.

The mean cellularity before freezing was $2,94 \times 10^8$ cells/ml.

The mean percent of HSC CD34 positives in the Buffy coat bag was 0, 75%, while the mean percent of high complexity CD34 positive was 0, 46% and 0, 27% for the low complexity population.

The mean of cryopreservation time was 49 days (28-68 days).

	Fresh/Control	DMSO 5%	DMSO5/Cryo
Mean Viability	63,20%	60,84%	62,85%
Mean LC Viability	94,3%	87,56%	96,28%
Mean HC Viability	34,14%	28,33%	29,80%
Mean LC apoptosis	Not available	6,58%	2,92%
Mean HC apoptosis	Not available	22,05%	11,78%

Table 1: Mean viabilities and mean apoptosis rates in the fresh/control group, DMSO 5% and DMSO 5% + Cryo. Cryo= cryoprotective solution with HES plus Human Albumin. HC= High complexity LC=Low complexity. Cryo = HES 5% plus Human Albumin 20% solution.

	Cryo + DMSO 5%	DMSO 5%	P Value
LC Viability	96,0±3,1	87,3±23,9	0,166
HC Viability	29,2±15,7	27,8±20,1	0,754
LC Necrosis	0	0,4±0,7	0,054
HC Necrosis	21,1±12,7	15,1±14,4	0,079
LC necrosis/apoptosis	0,1±0,3	3,2±11,3	0,290
HC necrosis/apoptosis	36,8±23,2	33,5±16,2	0,404
LC Apoptosis	2,5±2,6	6,3±7,8	0,058
HC Apoptosis	11,3±9,3	21,5±15,1	<0,001

Table 2: Four possible outcomes (Viable HSC, necrotic HSC, necrotic/apoptotic HSC and apoptotic HSC) in the low complexity and high complexity HSC groups respectively and its relationship with DMSO 5% with and without the cryoprotective solution composed by HES 6% and Human albumin 20%. Cryo= Cryopreservative solution with HES 6% and Human Albumin 20%.

5. Discussion

There are, in biomedical literature, large differences in total HSC dose necessary to assure an adequate hematopoietic engraftment in the context of HSCT, however it is well known that the majority of papers establishes as safe dose that of 2×10^6 CD34 total/Kg of patient's weight (1-12).

The CD34 positive cells mobilized for HSCT form a heterogeneous HSC population. It is known that only a small portion of CD34 positive HSC are responsible for the primordial function of hematopoiesis. It is possible to define with more precision the true HSC group using the flow cytometry technique and analyzing the size and granularity patterns forward side scatter and sideward scatter (FSC x SSC) (13,14). Therefore, the CD34 positive cells can be divided in low and high complexity by this cross analyze of this two parameters (15). The former ones have low differentiation grade and high regenerative capacity, and the others have high differentiation grade and less regenerative potential (16).

In the HSCT where the HSC are freeze before the infusion, it is necessary the use of cryoprotective solution to maintain the HSC viability in very low temperatures. There is loss of viability of freeze HSC caused by multiple factors as, more important, loss of viability after thawing caused mainly by the cryoprotective agent (17). Besides, the most important cryoprotective agent named Dimetilsulfoxide (DMSO) is associated with a considerable number of adverse reactions during the infusion time because it is a substance with high toxicity potential. The estimated composition of the cryoprotective solution varies between the world transplant centers. The principle is to use the minimal DMSO dose possible to reduce de toxic effects in infusion (18). Some Cryopreservation protocols use only DMSO as cryoprotective agent, as others indicate the three agents together. There is no consensus about the ideal cryopreservation protocol. An important number of studies suggest the use of DMSO 5 to 10% with albumin 20% and HES 6% in grafts with cellularity number of no more than 3×10^8 cells/ml, however there are some new different protocols that use DMSO alone and in lower concentrations (25).

Other variables, like graft cellularity are associated with graft viability. There is an inverse correlation between graft cellularity and cellular viability (19, 20).

This study was prospective and controlled because the great majority of studies in this area were almost ever retrospective and uncontrolled, or when they

had a control group, it was formed by previous clinical cases of different transplant centers.

The variables that could induce some bias were controlled: the length of freezing time was short (median 68 days) to avoid the bias of loss of viability due to long (more than six months) periods of freezing time (23). We can speculate that shorter freezing periods could cause some false good results in terms of viability if we consider that exist some cell mortality caused by the freeze conditions. However, the choose length of time that was approximately 45 days is the period that most part of transplantation centers uses to harvest and after infuse the HSC. In the same way, the length of time between HSC harvest and freezing was only one day in eleven of fifteen patients. This time was preferred to avoid cellular death and false negative results after thawing (24).

With respect to graft cellularity (24), the samples with numbers above 3×10^8 cells/ml were diluted with saline to obtain a mean cellular concentration of $2,94 \pm 0,4 \times 10^8$ in all samples. We used saline because some samples arrived to our laboratory without some plasma excess to dilute them as stated in many freezing protocols (26).

With respect to cellularity, initially this study was designated with the goal of measure pre-defined different cellularities in terms of viability mainly to contrast to some previous retrospective studies with different heterogeneous cellularity values. However it was not possible because technical difficulties to obtain exact cellularity numbers with dilution techniques in laboratory. So, we choose to work with pre-defined concentration of cryoprotective agents. Our decision was supported by the fact that cell death in freezing conditions is due to a lack of DMSO to protect the cell from cold temperatures, that can happen or if we have lower DMSO concentration or in an inverse way, if we have not sufficient DMSO to a high leukocyte count.

Therefore, we created two different groups with a DMSO concentration of 5%. A group with DMSO as a sole agent and another group with DMSO combined with HES 6% and Human albumin 20%. We choose the 5% concentration because the related toxicity of DMSO 10%, a number of studies revealing equivalency of viability between 10% and 5% and because it is part of our routine to cryopreserve peripheral blood cells with DMSO 5%. We did that to investigate if the DMSO alone is as effective as DMSO plus cryoprotectant agents added in term of cell viability. This hypothesis was already tested in previous studies that demonstrated similar viabilities in both groups DMSO and DMSO plus cryoprotective solution (27).

Another interesting characteristic of our study is the stratification of HSC in low and high complexity groups using the size and granularity pattern in flow cytometry. It is known that low complexity HSC are capable to generate efficient and long term engraftment, whereas the high complexity one include HSC more differentiated without true stem cell characteristics. With respect to complexity, it was surprisingly to note that low complexity HSC have much more high values of viability than the high complexity ones, and that total viability is in fact sub estimated due the high mortality rates of more differentiated cell population. This fact seems to explain that progenitor less differentiated cells are more resistant to external physical stimulus to necrosis and apoptosis as the freezing temperature as example. If we consider the HSCT context, we know that primitive HSC are more resistant to death due to physical stimuli as radiotherapy and chemotherapy, and it can explain why the reason for high doses of chemotherapy in conditioning regimens. As we can observe in table 1, the total HSC mean viability was only 63,20% in the fresh/control sample, while in this same sample but in the group of low complexity we found a viability of 94,8% compared to 34,14% in high complexity group. In the same table, when we relate viability on the two groups, we can note that total viability follow the same pattern in all groups, the low complexity HSC viability was nearly 10 percent lower in the DMSO alone group. In the linear correlation analysis, we had statistical significant results only in high complexity HSC group with DMSO 5% alone in contrast to DMSO 5% plus cryoprotective solution. We observed only a trend to statistical significance in the low complexity HSC necrosis group and low complexity HSC apoptosis. In both groups the necrosis and apoptosis rates were higher in DMSO 5% alone arm than in the DMSO 5% plus cryoprotective agents arm (Table 2). Here, we had not found any statistical significance in the difference between viability in DMSO 5% alone group and DMSO 5% plus cryoprotective solution.

Finally if we consider the clinical significance of these results, we can see that even the statistically significant results that showed lower viability rates and higher cellular death rates within the DMSO only group, the results were 2 to 9% between them, showing benefit to DMSO plus cryoprotective solution group. In clinical practice, the loss of less than 10% of graft HSC seems of little significance when compared to the possible benefit of reducing costs and adverse events in the infusion time.

Even considering a small sample size, we can note significance in some results and trend toward significance in others, therefore we believe in a strengthening in statistically power with more numbered samples.

We conclude that in cellular concentrations relatively high it seems possible to obtain acceptable viabilities with minimal losses of until 8% from those of fresh control group, regardless the use of HES and Human albumin associated to DMSO.

6. Acknowledgements

Thanks to Research and Events Incentive Found

Conflicts of interests: None

7. References

1. Anderson KC. Autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Journal of clinical apheresis*. 1995;10(3):131-8.
2. Au WY, Chan EC, Lie AK, Liang R, Leung AY, Ma SK, et al. Poor engraftment after allogeneic bone marrow transplantation: role of chimerism analysis in treatment and outcome. *Annals of hematology*. 2003;82(7):410-5.
3. Carella AM, Podesta M, Frassoni F, Raffo MR, Pollicardo N, Pungolino E, et al. Collection of 'normal' blood repopulating cells during early hemopoietic recovery after intensive conventional chemotherapy in chronic myelogenous leukemia. *Bone marrow transplantation*. 1993;12(3):267-71.
4. Chung IJ, Lee JJ, Park MR, Kook H, Cho SH, Hwang TJ, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell rescue of late graft failure after bone marrow transplantation in patients with aplastic anemia. *Journal of Korean medical science*. 2002;17(4):468-74.
5. Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, et al. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Experimental hematology*. 1999;27(9):1460-6.
6. Koumakis G, Filis J, Vassilomanolakis M, Papanastasiou K, Hajichristou H, Barbounis V, et al. Relation between hematological recovery and number of transplanted mononuclear cells in patients after high dose chemotherapy with peripheral blood stem cell rescue. *Blood cells, molecules & diseases*. 1995;21(3):235-8.
7. Lee SH, Lee MH, Lee JH, Min YH, Lee KH, Cheong JW, et al. Infused CD34+ cell dose predicts long-term survival in acute myelogenous leukemia patients who received allogeneic bone marrow transplantation from matched sibling donors in first complete remission. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2005;11(2):122-8.
8. Mavroudis D, Read E, Cottler-Fox M, Couriel D, Molldrem J, Carter C, 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.
9. Mavroudis DA, Read EJ, Molldrem J, Raptis A, Plante M, Carter CS, et al. T cell-depleted granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) modified allogeneic bone

marrow transplantation for hematological malignancy improves graft CD34+ cell content but is associated with delayed pancytopenia. *Bone marrow transplantation*. 1998;21(5):431-40.

10. Min CK, Kim DW, Lee JW, Min WS, Kim CC. Additional stem cell therapy for graft failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Acta haematologica*. 2000;104(4):185-92.

11. Okamura A, Yakushijin K, Inui Y, Funakoshi Y, Kawamori Y, Shimada T, et al. Successful neutrophil engraftment by reduced use of granulocyte colony-stimulating factor after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with mycophenolate mofetil for graft-versus-host disease prophylaxis. *International journal of hematology*. 2011;93(6):765-70.

12. Rahman J, Chowdhury SA. Peripheral blood cells transplantation--a review article. *Bangladesh Medical Research Council bulletin*. 1999;25(1):14-23.

13. Wiesneth M, Schreiner T, Bunjes D, Bischof C, Erne E, Maccari B, et al. Comparison of T-cell-depleted BMT and PBPC with respect to chimerism, graft rejection, and leukemic relapse. *Journal of hematotherapy*. 1999;8(3):269-74.

14. Macedo A, Orfao A, Ciudad J, Gonzalez M, Vidriales B, Lopez-Berges MC, et al. Phenotypic analysis of CD34 subpopulations in normal human bone marrow and its application for the detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1995;9(11):1896-901.

15. Monreal MB, Pardo ML, Pavlovsky MA, Fernandez I, Corrado CS, Giere I, et al. Increased immature hematopoietic progenitor cells CD34+/CD38dim in myelodysplasia. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2006;70(2):63-70.

16. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Journal of hematotherapy*. 1996;5(3):213-26.

17. Harada N, Okamura S, Kubota A, Shimoda K, Ikematsu W, Kondo S, et al. Analysis of acute myeloid leukemia cells by flow cytometry, introducing a new light-scattering classification. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1994;120(9):553-7.

18. Abbruzzese L, Michieli M, Rupolo M, Toffola RT, Da Ponte A, Rossi FM, et al. A new freezing and storage procedure improves safety and viability of haematopoietic stem cells and neutrophil engraftment: a single institution experience. *Vox sanguinis*. 2010;98(2):172-80.

19. Grilli G, Porcellini A, Lucarelli G. Role of serum on cryopreservation and subsequent viability of mouse bone marrow hemopoietic stem cells. *Cryobiology*. 1980;17(5):516-20.
20. Rowley SD. Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques. *Journal of hematotherapy*. 1992;1(3):233-50.
21. Biancotto A, Wank A, Perl S, Cook W, Olnes MJ, Dagur PK, et al. Baseline levels and temporal stability of 27 multiplexed serum cytokine concentrations in healthy subjects. *PloS one*. 2013;8(12):e76091.
22. Anagnostakis I, Papassavas AC, Michalopoulos E, Chatzistamatiou T, Andriopoulou S, Tsakris A, et al. Successful short-term cryopreservation of volume-reduced cord blood units in a cryogenic mechanical freezer: effects on cell recovery, viability, and clonogenic potential. *Transfusion*. 2014;54(1):211-23.
23. Muramaki M, Hara I, Miyake H, Yamada Y, Okada H, Kamidono S. Long-term cryopreservation of peripheral blood stem cells in patients with advanced germ cell tumors using the dump-freezing method at -80 degrees C. *Oncology reports*. 2003;10(6):1993-8.
24. Hubel A, Carlquist D, Clay M, McCullough J. Liquid storage, shipment, and cryopreservation of cord blood. *Transfusion*. 2004;44(4):518-25.
25. Rowley SD. Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques. *Journal of hematotherapy*. 1992;1(3):233-50.
26. Butterworth BE, Chapman JR. Exposure of hematopoietic stem cells to ethylene oxide during processing represents a potential carcinogenic risk for transplant recipients. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*. 2007;49(3):149-53.
27. Akkok CA, Liseth K, Hervig T, Rynningen A, Bruserud O, Ersvaer E. Use of different DMSO concentrations for cryopreservation of autologous peripheral blood stem cell grafts does not have any major impact on levels of leukocyte- and platelet-derived soluble mediators. *Cytotherapy*. 2009;11(6):749-60.

10.3. ARTIGO 3

**CORRELATION BETWEEN INFLAMMATORY CYTOKINE RELEASE AND
HEMATOPOIETIC STEM CELL VIABILITY AFTER STORAGE IN A MECHANICAL
FREEZER.**

**CORRELATION BETWEEN INFLAMMATORY CYTOKINE RELEASE AND
HEMATOPOIETIC STEM CELL VIABILITY AFTER STORAGE IN A MECHANICAL
FREEZER.**

**Gustavo Brandão Fischer^{a,b}, Ana Paula Alegretti^d, Gabrielle Dias Salton^c,
Anelise Bergmann Araújo^c, Liane Marise Röhsig^c, Juliana Monteiro Furlan^c,
Melissa Helena Angeli^c, Tissiana Schmalfluss^c, , Bianca Pfaffenseller^f, Maria
Lúcia Scroferneker^{a, e}**

**^a Graduate Program in Medicine : Medical Sciences, Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.**

**^b M.d. Hematology and Hematopoietic Stem Cell Transplantation Service,
Hospital de Clínicas de Porto Alegre**

**^c Cellular Therapy Unity and Cord Blood Bank of Hospital de Clínicas de
Porto Alegre**

**^d Personalized Diagnostic Unity, Flow Cytometry Service, Hospital de
Clínicas de Porto Alegre**

**^e Microbiology, Immunology and Parasitology Department, ICBS,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**^f Biochemistry Post graduation Program, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul**

Correspondence and reprints:

**Gustavo Brandão Fischer, Rua Visconde Duprat 53/703 Petrópolis, Rio Grande
do Sul, Brazil. ZIP Code: 90690-430**

E-Mail: gustavo_fischer@msn.com and scrofern@ufrgs.br

Telephone Number: 55-51-98913886

ABSTRACT

Bone Marrow Transplantation (BMT) is based in the principle of hematopoietic CD34 stem cells infusion in a conditioned recipient. It is known that such cells are capable of generate a new hematopoiesis. It is known that the benefit of CD34 dose is best when it is between 2 and 5 x 10⁶ CD34 by patient's body weight. The CD34 determination is based in the total CD34 number, however it is known that only a small portion of the CD34 population is related to the marrow repopulating capacity. An alternative way of detecting such cells when compared to total CD34 dose is the cytometric analysis of cytoplasmatic granularity and size patterns.

In the autologous BMT context and, sometimes in the allogeneic type where the graft infusion occurs more than three days after the graft harvest, the CD34 cells freezing is necessary to keep their viability. The commonest crioprotective agent used is the DMSO. It is well known that in very low temperatures this agent protects the CD34 cells of dying, however in temperatures above 30°C it became toxic and causes adverse events in the patient that receive them. The adverse reactions in the infusion moment are linked to DMSO, so there are some different cryopreservation protocols that use different DMSO concentrations with the goal to reduce the incidence of collateral damage and at the same time to keep the CD34 alive in low temperatures.

With respect to adverse events during the infusion moment, it is known that the effects are caused by DMSO. However, there are evidences that could be other causes to cause these events: cytokines released during the freezing time and infused with the graft and leukocyte micro clots caused by high cellularity in the graft. The present study studied the correlation between inflammatory cytokine release and their relationship with the hematopoietic stem cell viability after storage in a mechanical freezer.

Key Words: Hematopoietic Stem Cell; CD34 positive; Flow Cytometry; Hematopoietic Stem Cell Transplantation; Cryobiology; Cellular Viability; Cytokines.

1. Introduction

The hematopoietic stem cells (HSC), by definition, express the surface antigen CD34, are not compromised with a hematopoietic lineage and are responsible by the normal hematopoietic functioning. (1-5).

There are several differences in relationship to HSC dose needed to ensure an adequate hematologic engraftment after the hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), however it is well known that the great majority of studies establishes as a safe dose to transplantation 2×10^6 CD34 by Kg of weight of the receptor.(6-18). In the same way, it is well known that there is an inverse relation between the white blood cells engraftment time and HSC CD34 dose (19-25).

The CD34 positive cells mobilized for HSCT constitute a heterogenic population of HSC. It is well known nowadays that only a small portion of CD34 positive cells are directly responsible by the primordial hematopoietic function. These cells have immunophenotypic surface markers beyond the CD34 like the CD133, CD110 among others. Some studies already established specific cellular doses to HSCT when these markers are used together, and the results show correlation with better engraftment and lower mortality (6). However, the routine use of these markers are not used yet and therefore its use is limited to research field. In the other hand, it is possible to limit with more precision this HSC cell group by the Flow Cytometric technique using cytoplasmatic granularity and cell size (Pattern Forward scatter and Sideward Scatter). In this way, the CD34 positive HSC can be divided into high complexity and low complexity groups based on cross analysis of these two associated parameters. The former ones have low differentiation grade and high regenerative capacity while the second group shows a higher differentiation grade and lower regenerative capacity (17).

The HSCT uses CD34 positive cells to repopulate with a healthy marrow the hematopoiesis capacity. Especially in the autologous stem cell transplantation, where after the HSC harvest from peripheral blood, the patient receives a 3 to 8-day myeloablative chemotherapy regimen, it is necessary that the HSC be freeze to maintain its viability (11).

The toxicity related to HSC infusion is commonly linked to DMSO present in the graft. However, another factor that could be related to adverse effects during the

graft infusion is the inflammatory cytokines released by leucocytes during the freezing period and presents in the graft at the infusion time (27). These cytokines are related to the well known transfusion reactions and could contribute to the HSC infusion toxicity (27). This paper analyzed the relationship between cellular death during the freezing time and the inflammatory cytokines released by white blood cells stored in a mechanical freezer.

2. Material and Methods

Experimental Study with controlled intervention and not randomized.

We allocate 19 patients candidates to HSC harvest from peripheral blood for autologous stem cell therapy in the period of December 2013 and May 2014 in two hospital centers of Porto Alegre city: Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Hemotherapy Service of Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre. Only patients with more than 18 years old were allocated. The study was approved by ethical committees in both hospitals and subscribed in the internet National Research Ethics Platform. The researches signed a confidentiality term to manipulate the patient's registries, and the patients signed a consent term to enter the study.

Of the 19 total allocated patients, 3 left from the final analysis because methodological problems with the flow cytometry protocol, and 1 was used as negative control only freeze without cryoprotective agent.

The peripheral HSC were mobilized using granulocyte growth factor in a dose of 10 mcg/kg/day during 5 days. The aphaeresis harvests were initiated in the fifth day after the start of granulocyte growth factor as the local protocol guideline.

The HSC harvest was done by aphaeresis technique with the MCS+(Haemonetics, Braintree MA), Baxter CS 3000 Plus (Baxter Healthcare, Deerfield IL) or Cobe Spectra (COBE BCT Inc., Lakewood, CO), and the anticoagulant was the acid-citrate-dextrose (ACD).

2.1. Processing and HSC cryopreservation

The HSC samples harvested by aphaeresis were centrifuged at 950 G during ten minutes at 4°C within 48 hours after the harvest maximum. After centrifugation, it was removed plasma to get final white mononuclear cells concentration of 6×10^8 /ml. Aliquots of 500 μ L of this concentrate were separated in cryotubes of 2 ml each. In all of samples we used saline to dilute the high cellular counting. A volume of 500 μ L of each cryoprotective solution was added to a cryotube with a HSC concentration of 6×10^8 /ml previously prepared. Therefore, the final cellular concentration was approximately $3 \times 10^8 \pm 0,4$ and the final cryoprotective agents concentrations were as follows: 1) HES 4,5%, Human Albumin 3,5% and DMSO 2,5% and 2) HES 4,5%, Human Albumin 3,5% and DMSO 5%. Each patient originated two samples with DMSO 2, 5% and DMSO 5% as viewed before. The samples were cryopreserved immediately in a mechanical -80°C freezer and kept frozen during 45 ± 15 days.

Measurement of Inflammatory Cytokines

The cytokine concentration in serum was determined by flow cytometry using the assay named BD™ *Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokine Kit* (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). This Kit permits the detection of the following cytokines: IL-12p70, IL-6, IL-10, IL-8, IL-1 β e TNF- α . The sample processing and the data analysis were done following Biolegend instructions. Briefly, the samples were incubated with the 6 *Capture Beads* of cytokines linked to PE fluorochrome during 3 hours in ambient temperature and protected from the light. After, the samples were washed and the data acquired using the flow cytometer FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). The standard curves and results were generated with the software FCAP *Array™ 3.0* (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) with R2 under 0.99 for all the cytokines and the results were calculated using logistic equation of 5 parameters.

Statistical Analysis

The statistical analysis was done using the *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) version 20.0. We described the mean and standard deviation and used to comparison the test analysis of variation for repeated measures with the Bonferroni correlation when realized multiple comparisons. In case of two means comparison was done the Student t test for paired samples. It was considered a significance level of 5%.

3. Results

We analyzed 15 patients. Each patient originated two samples with DMSO plus HES and Human albumin in 5% and 2, 5% concentrations to measure the cytokine concentration later. In total, we analyzed 30 research unities in the study.

The median of age was 52 years old, therefore eleven were male and 4 were women. With respect to diseases, 9 patients had Multiple Myeloma and 6 patients had Non-Hodgkin Lymphoma.

The median of CD34 positive cells was obtained in 11 of 15 patients. The median was $2,6 \times 10^6$ /Kg.

The aphaeresis harvests were done during the period of December 2013 and March 2014.

The means of lymphomonocytes and granulocytes were 34, 8% and 65, 11% in the buff coat bag respectively.

The interval between aphaeresis harvesting and freezing procedure was 3 days in one patient, 2 days in another one, one day in eleven ones and in the same day in one patient.

The mean cellularity before freezing was $2,94 \times 10^8$ cells/ml.

The mean percent of HSC CD34 positives in the Buffy coat bag was 0, 75%, while the mean percent of high complexity CD34 positive was 0, 46% and 0, 27% for

the low complexity population.

The mean of cryopreservation time was 49 days (28-68 days).

	IL-12p 70	TNF- α	IL-10	IL-6	IL-1 β	IL-8
Normal						
Values <65 years (pg/ml)	42,3 \pm 10	3,21 \pm 4,04	1,32 \pm 3,06	2,91 \pm 6,45	2,04 \pm 4,93	23,9 \pm 29,7
DMSO 5% / Cryo	1,24	1,96	1,37	2,83	172,84	55,92
DMSO 2,5% / Cryo	1,21	1,96	1,38	1,71	416,44	69,65

Table 1: Plasma concentrations in pg/ml of the more common inflammatory cytokines and its relationship with the DMSO concentrations of 5% and 2, 5%. Cryo= Cryoprotective solution with HES 6% and Human Albumin 20%.

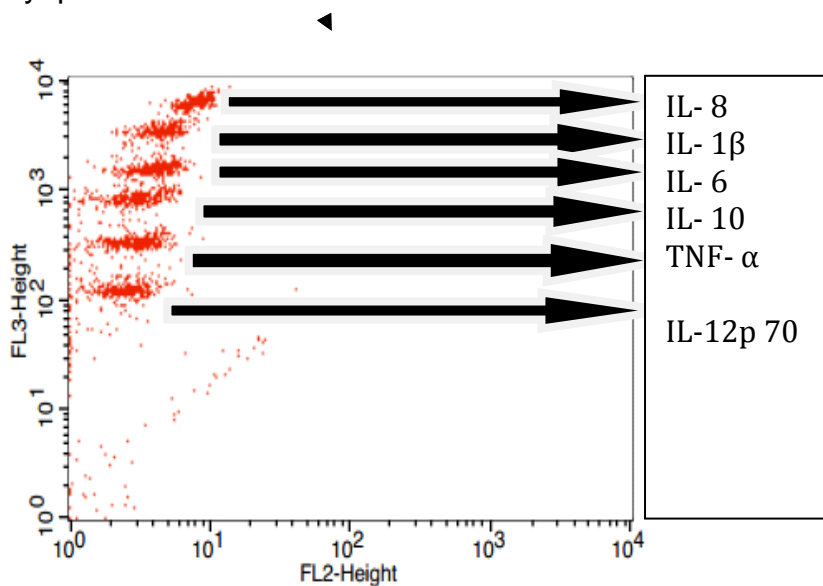


Figure 1: Inflammatory cytokines tested on BD CBA Human Inflammatory Cytokines Kit. The axis FL3-Height shows the fluorescence intensity to a particular bead conjugates to each cytokine. The FL2-Height axis shows the particular cytokine concentration. Values are higher when localized on the right.

4. Discussion

There are, in biomedical literature, large differences in total HSC dose necessary to assure an adequate hematopoietic engraftment in the context of HSCT, however it is well known that the majority of papers establishes as safe dose that of 2×10^6 CD34 total/Kg of patient's weight (1-12).

The CD34 positive cells mobilized for HSCT form a heterogeneous HSC population. It is known that only a small portion of CD34 positive HSC are responsible for the primordial function of hematopoiesis. It is possible to define with more precision the true HSC group using the flow cytometry technique and analyzing the size and granularity patterns forward side scatter and sideward scatter (FSC x SSC) (13;14). Therefore, the CD34 positive cells can be divided in low and high complexity by this cross analyze of this two parameters (15). The former ones have low differentiation grade and high regenerative capacity, and the others have high differentiation grade and less regenerative potential (16).

In the HSCT where the HSC are freeze before the infusion, it is necessary the use of cryoprotective solution to maintain the HSC viability in very low temperatures. There is loss of viability of freeze HSC caused by multiple factors as, more important, loss of viability after thawing caused mainly by the cryoprotective agent (17). Besides, the most important cryoprotective agent Dimetilsulfoxide (DMSO) is associated with a considerable number of adverse reactions during the infusion time because it is a substance with high toxicity potential. The estimated DMSO dose as the composition of the cryoprotective solution varies between the world transplant centers. The principle is to use the minimal DMSO dose possible to reduce de toxic effects in infusion (18). Other variables, like graft cellularity are associated with graft viability. There is an inverse correlation between graft cellularity and cellular viability (19,20).

The toxicity related to thawed HSC infusion is due to DMSO present in the graft. However, another factor probably involved is the inflammatory cytokine burst released by leucocytes during the freezing time. Such cytokines are already recognized in the context of non-hemolytic transfusion reactions and can contribute to the infusion-related toxicity (22).

This study was prospective because the great majority of studies in this area were almost ever retrospective, or when they had a control group, it was formed by previous clinical cases of different transplant centers.

The variables that could induce some bias were controlled: the length of freezing time was short (median 68 days) to avoid the bias of loss of viability due to long (more than six months) periods of freezing time (23). We can speculate that shorter freezing periods could cause some false good results in terms of viability if we consider that exist some cell mortality caused by the freeze conditions. However, the choose length of time that was approximately 45 days is the period that most part of transplantation centers uses to harvest and after infuse the HSC. In the same way, the length of time between HSC harvest and freezing was only one day in eleven of fifteen patients. This time was preferred to avoid cellular death and false negative results after thawing (24).

With respect to graft cellularity (9), the samples with numbers above 3×10^8 cells/ml were diluted with saline to obtain a mean cellular concentration of $2,94 \pm 0,4 \times 10^8$ in all samples. We used saline because some samples arrived to our laboratory without some plasma excess to dilute them as stated in many freezing protocols (26).

With regard to the inflammatory cytokine profile, we could note, as expected, that the IL-1 β group with more strength and the IL-8 group revealed a significative concentration elevation from the basal values principally in the DMSO 2, 5%. This finding is the direct consequence of a higher cellular death rate and also higher inflammatory cytokines release rates during the freezing time, mainly in the high complexity HSC group. It is reasonably to consider a cytokine role in the adverse reactions of the infusion day, mainly if we consider the much higher granulocyte concentrated number compared to a simple transfusion. Also, in the HSCT setting it is not used the leukocyte depletion filters for obvious reasons. Unfortunately we cannot separate the cytokine's influence that of DMSO toxicity during the infusion time. Akkok C.A. et al. (27) showed a higher adverse reactions rate in freeze and thaw HSC when compared to fresh HSC infusions, but even in this setting, we could argue that besides the DMSO in freezing group, we have more leukocyte deaths and consequently higher cytokine release during the freezing time, thus complicating the causative relation analysis of the adverse reactions.

We conclude that it was possible to demonstrate a significant increase in the inflammatory cytokines IL-1 β e IL-8, fact that can explain, at least in part, the adverse reaction of the patient in the infusion moment. However, if we consider a possible benefit with the reduction of cryoprotective agent concentration in the incidence of adverse reactions related to infusion, we cannot deny that reducing the cryoprotective concentration we will have more cellular deaths and consequently more cytokine release, fact that could mean persistent incidence of adverse reactions even with cryoprotective agent reduction.

5. Acknowledgements

Thanks to FIPE/HCPA

Conflicts of interests: None

6. References

1. Anderson KC. Autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Journal of clinical apheresis*. 1995;10(3):131-8.
2. Au WY, Chan EC, Lie AK, Liang R, Leung AY, Ma SK, et al. Poor engraftment after allogeneic bone marrow transplantation: role of chimerism analysis in treatment and outcome. *Annals of hematology*. 2003;82(7):410-5.
3. Carella AM, Podesta M, Frassoni F, Raffo MR, Pollicardo N, Pungolino E, et al. Collection of 'normal' blood repopulating cells during early hemopoietic recovery after intensive conventional chemotherapy in chronic myelogenous leukemia. *Bone marrow transplantation*. 1993;12(3):267-71.
4. Chung IJ, Lee JJ, Park MR, Kook H, Cho SH, Hwang TJ, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell rescue of late graft failure after bone marrow transplantation in patients with aplastic anemia. *Journal of Korean medical science*. 2002;17(4):468-74.
5. Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, et al. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Experimental hematology*. 1999;27(9):1460-6.
6. Koumakis G, Filis J, Vassilomanolakis M, Papanastasiou K, Hajichristou H, Barbounis V, et al. Relation between hematological recovery and number of transplanted mononuclear cells in patients after high dose chemotherapy with peripheral blood stem cell rescue. *Blood cells, molecules & diseases*. 1995;21(3):235-8.
7. Lee SH, Lee MH, Lee JH, Min YH, Lee KH, Cheong JW, et al. Infused CD34+ cell dose predicts long-term survival in acute myelogenous leukemia patients who received allogeneic bone marrow transplantation from matched sibling donors in first complete remission. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2005;11(2):122-8.
8. Mavroudis D, Read E, Cottler-Fox M, Couriel D, Molldrem J, Carter C, 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.
9. Mavroudis DA, Read EJ, Molldrem J, Raptis A, Plante M, Carter CS, et al. T cell-depleted granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) modified allogeneic bone

marrow transplantation for hematological malignancy improves graft CD34+ cell content but is associated with delayed pancytopenia. *Bone marrow transplantation*. 1998;21(5):431-40.

10. Min CK, Kim DW, Lee JW, Min WS, Kim CC. Additional stem cell therapy for graft failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Acta haematologica*. 2000;104(4):185-92.

11. Okamura A, Yakushijin K, Inui Y, Funakoshi Y, Kawamori Y, Shimada T, et al. Successful neutrophil engraftment by reduced use of granulocyte colony-stimulating factor after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with mycophenolate mofetil for graft-versus-host disease prophylaxis. *International journal of hematology*. 2011;93(6):765-70.

12. Rahman J, Chowdhury SA. Peripheral blood cells transplantation--a review article. *Bangladesh Medical Research Council bulletin*. 1999;25(1):14-23.

13. Wiesneth M, Schreiner T, Bunjes D, Bischof C, Erne E, Maccari B, et al. Comparison of T-cell-depleted BMT and PBPC with respect to chimerism, graft rejection, and leukemic relapse. *Journal of hematotherapy*. 1999;8(3):269-74.

14. Macedo A, Orfao A, Ciudad J, Gonzalez M, Vidriales B, Lopez-Berges MC, et al. Phenotypic analysis of CD34 subpopulations in normal human bone marrow and its application for the detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1995;9(11):1896-901.

15. Monreal MB, Pardo ML, Pavlovsky MA, Fernandez I, Corrado CS, Giere I, et al. Increased immature hematopoietic progenitor cells CD34+/CD38dim in myelodysplasia. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2006;70(2):63-70.

16. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Journal of hematotherapy*. 1996;5(3):213-26.

17. Harada N, Okamura S, Kubota A, Shimoda K, Ikematsu W, Kondo S, et al. Analysis of acute myeloid leukemia cells by flow cytometry, introducing a new light-scattering classification. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1994;120(9):553-7.

18. Abbruzzese L, Michieli M, Rupolo M, Toffola RT, Da Ponte A, Rossi FM, et al. A new freezing and storage procedure improves safety and viability of haematopoietic stem cells and neutrophil engraftment: a single institution experience. *Vox sanguinis*. 2010;98(2):172-80.

19. Grilli G, Porcellini A, Lucarelli G. Role of serum on cryopreservation and subsequent viability of mouse bone marrow hemopoietic stem cells. *Cryobiology*. 1980;17(5):516-20.
20. Rowley SD. Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques. *Journal of hematotherapy*. 1992;1(3):233-50.
21. Biancotto A, Wank A, Perl S, Cook W, Olnes MJ, Dagur PK, et al. Baseline levels and temporal stability of 27 multiplexed serum cytokine concentrations in healthy subjects. *PloS one*. 2013;8(12):e76091.
22. Anagnostakis I, Papassavas AC, Michalopoulos E, Chatzistamatiou T, Andriopoulou S, Tsakris A, et al. Successful short-term cryopreservation of volume-reduced cord blood units in a cryogenic mechanical freezer: effects on cell recovery, viability, and clonogenic potential. *Transfusion*. 2014;54(1):211-23.
23. Muramaki M, Hara I, Miyake H, Yamada Y, Okada H, Kamidono S. Long-term cryopreservation of peripheral blood stem cells in patients with advanced germ cell tumors using the dump-freezing method at -80 degrees C. *Oncology reports*. 2003;10(6):1993-8.
24. Hubel A, Carlquist D, Clay M, McCullough J. Liquid storage, shipment, and cryopreservation of cord blood. *Transfusion*. 2004;44(4):518-25.
25. Rowley SD. Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques. *Journal of hematotherapy*. 1992;1(3):233-50.
26. Butterworth BE, Chapman JR. Exposure of hematopoietic stem cells to ethylene oxide during processing represents a potential carcinogenic risk for transplant recipients. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*. 2007;49(3):149-53.
27. Akkok CA, Liseth K, Hervig T, Rynningen A, Bruserud O, Ersvaer E. Use of different DMSO concentrations for cryopreservation of autologous peripheral blood stem cell grafts does not have any major impact on levels of leukocyte- and platelet-derived soluble mediators. *Cytotherapy*. 2009;11(6):749-60.

11- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na literatura existem grandes diferenças em relação à dose de CTH necessária para garantir uma recuperação hematológica adequada após o Transplante de Células Hematopoiéticas periféricas (TCTH), porém sabe-se que a maioria dos estudos estabelece como dose segura aquela de 2×10^6 CD34 total/Kg de peso do receptor (6-18).

As células CD34 positivas mobilizadas para o TCTH formam uma população heterogênea de CTH. Sabe-se atualmente que apenas uma pequena porção das CD34 é responsável pela função primordial de hematopoiese. É possível definir com um pouco mais de precisão o grupo de CTH através da técnica de citometria dos padrões de tamanho e granularidade citoplasmática (FSC x SSC). Dessa forma, as CTH CD34 podem ser divididas em células de menor e maior complexidade segundo a análise cruzada desses dois parâmetros associados (*Ishage Guideline*). As primeiras apresentam baixo grau de diferenciação e elevada potencialidade regenerativa enquanto as últimas apresentam um grau maior de diferenciação assim como um menor potencial regenerativo (40).

Nos TCTH que envolvem congelamento das CTH antes da infusão, é necessário o uso de agentes crioprotetores destinados à manutenção da viabilidade das CTH em temperaturas muito baixas. Sabe-se que existe perda de viabilidade das CTH congeladas por diversos fatores entre eles, a lesão direta pelo frio denominada crioinjúria, e, mais importante, a perda de viabilidade após o descongelamento das CTH por ação do próprio agente crioprotetor (45-66). Além disso, o principal agente crioprotetor denominado DMSO (Dimetilsulfóxido) está associado com inúmeras reações adversas do receptor no momento da infusão por se tratar de ser uma substância com elevado potencial tóxico tecidual. A dose preconizada de DMSO assim como a composição da solução crioprotetora varia de

forma considerável nos diferentes centros transplantadores. A tendência atual é que se use a menor concentração possível do DMSO para que possam ser reduzidos os efeitos tóxicos no momento da infusão das CTH (67-80). Outras variáveis, como a celularidade do produto de coleta também estão associadas diretamente com a viabilidade do enxerto. Sabe-se que existe uma relação inversa entre celularidade do enxerto e viabilidade celular (81-91).

A toxicidade relacionada à infusão das CTH CD34 positivas congeladas é, em grande parte, atribuída ao DMSO presente no enxerto. Porém, outro fator possivelmente envolvido é a presença de citocinas inflamatórias liberadas pelos leucócitos durante o período de armazenamento no freezer e presentes no enxerto no momento de sua infusão(92, 93). Tais citocinas já são amplamente reconhecidas nas reações transfusionais não-hemolíticas e podem contribuir para a toxicidade da infusão no contexto do TCTH autólogo (94, 95).

O presente estudo foi desenhado de forma prospectiva e controlado pelo próprio paciente, nos quais envolvia viabilidade e crioprotetores quase sempre foram retrospectivos e sem controle, ou quando se tinha controle, eram usados resultados de protocolos realizados em outros centros.

As variáveis que puderam provocar vieses foram controladas: o período de armazenamento no freezer foi curto (no máximo 68 dias) o que evita o viés de perda celular em enxertos congelados em freezers mecânicos por mais de seis meses. Poder-se-ia dizer que o período relativamente curto de congelamento poderia influenciar nos resultados de viabilidade elevada, porém o período escolhido de cerca de 45 dias é o período que na prática do TCTH se usa na maioria dos enxertos armazenados. Da mesma forma, o intervalo de tempo entre a coleta de CTH e o seu congelamento foi de apenas um dia em 11 de 15 pacientes. Esse

período foi preferido para evitar morte celular antes do congelamento e interferência negativa nos resultados após o descongelamento.

Com relação à variável celularidade do enxerto, com conhecida interferência na viabilidade celular, as amostras com celularidade acima de 3×10^8 células/ml foram diluídas com solução salina de forma a obter a concentração celular média de $2,94 \pm 0,4 \times 10^8$ em todas as amostras. Salina foi usada nas amostras que chegaram ao laboratório sem plasma excedente para a diluição, conforme é preconizado no congelamento de CTH.

Com relação à celularidade, inicialmente este estudo foi elaborado com a intenção de testar diferentes celularidades pré-definidas presentes no enxerto e sua relação com a viabilidade celular, como forma de se opor aos estudos de viabilidade relacionada à concentração celular, retrospectivos e sem concentração pré-definida. Porém, não foi possível, por motivos técnicos, obter grupos exatos de celularidades obtidas através de técnicas de concentração no laboratório. Então, optamos por trabalhar com grupos de concentrações de agentes crioprotetores pré definidas. Tal decisão decorreu da consideração de que a apoptose e necrose celulares induzida pelas baixas temperaturas envolve o mesmo mecanismo de perda de barreira física tanto pela escassez absoluta de DMSO nas baixas concentrações quanto pela escassez relativa do mesmo crioprotetor nas celularidades muito altas.

Portanto, foram criados três grupos de diferentes concentrações do DMSO como único agente crioprotetor e três grupos de diferentes concentrações de DMSO em conjunto com HES 6% e Albumina Humana 20%. Isso foi feito para tentar investigar não apenas a questão de qual a quantidade mínima de DMSO capaz de garantir um enxerto viável e evitar efeitos adversos freqüentes na infusão, mas para saber se o papel adjuvante exercido pelo HES e pela Albumina Humana com o

DMSO influencia na viabilidade final do enxerto congelado. Essa segunda hipótese já foi testada em estudos que demonstraram viabilidades semelhantes em enxertos congelados apenas com DMSO em comparação com enxertos congelados com a solução crioprotetora completa.

Outra novidade desse estudo é que as CTH foram estratificadas nos grupos de alta e baixa complexidade a partir do seu padrão citométrico. Sabe-se que as CTH de baixa complexidade compreendem a população de CTH capazes de gerar hematopoiese eficaz e em longo prazo, enquanto que aquelas de alta complexidade compreendem CTH mais diferenciadas e sem as características de células troncas propriamente ditas da população anteriormente citada. Com relação a isso, ficamos surpresos ao perceber que as CTH de baixa complexidade possuem viabilidades muito maiores que aquelas de alta complexidade, e que a viabilidade total quando mensurada na população de CTH é subestimada às custas da morte celular de CTH mais diferenciadas. Isso parece significar que as CTH primitivas progenitoras possuem maior resistência ao estímulo físico externo de apoptose e necrose como o frio por exemplo. Se considerarmos o contexto do TCTH, sabe-se que tais células possuem, da mesma forma, maior resistência à morte celular pro estímulos químicos como os regimes quimioterápicos e a própria justificativa da intensidade de dose dos regimes de condicionamento. Como podemos observar na tabela 1, a viabilidade total das CTH CD34 positivas foi de apenas 63,20% na amostra controle a fresco, enquanto que nessa mesma amostra a viabilidade das CTH de baixa complexidade foi de 94,8% comparada a 34,14% das CTH de alta complexidade. Na mesma tabela, quando relacionamos a viabilidade com os diferentes grupos de DMSO e solução crioprotetora, percebemos que a viabilidade total foi semelhante em todos os grupos, a viabilidade da população de CTH de baixa complexidade foi cerca de

10% menor no grupo do DMSO como agente único e, da mesma forma, o percentual de CTH apoptóticas precoces que marcaram Anexina V foi maior no grupo do DMSO 1,25%.

Na análise de correlação linear, obtivemos resultados estatisticamente significantes apenas no percentual de CTH de alta complexidade apoptóticas superior (21,5%) no grupo do DMSO 5% como único agente crioprotetor comparado com o grupo do DMSO 5% associado ao HES e à albumina (11,3%). Observamos apenas uma tendência à significância estatística na necrose de CTH de baixa complexidade e na apoptose das CTH de baixa complexidade, ambos superiores no grupo do DMSO 5% como crioprotetor isolado comparado com o grupo do DMSO 5% associado ao HES e à albumina (Tabela 3). Aqui, o que vale salientar é a ausência de significância estatística na diferença entre as viabilidades dos grupos de DMSO 5% como agente crioprotetor único e associado ao HES e albumina.

Os resultados da tabela 4 (DMSO 2,5%) mostram significância estatística na viabilidade das CTH de alta complexidade (maior no grupo do DMSO associado ao HES e albumina), assim como nas taxas de necrose e apoptose das CTH de baixa e alta complexidade (maior no grupo do DMSO como único crioprotetor).

No grupo do DMSO 1,25% demonstrado na tabela 5, obtivemos resultados estatisticamente significantes na viabilidade de CTH baixa complexidade, e nas taxas de necrose e apoptose das CTH de baixa complexidade, maiores no grupo do DMSO associado ao HES e albumina e maiores no grupo do DMSO como crioprotetor único respectivamente. Da análise global dos grupos de DMSO 5%, 2,5% e 1,25% podemos concluir que no último grupo as maiores taxas de morte celular assim como as menores viabilidades foram encontradas no grupo constituído do DMSO como único agente crioprotetor.

Na tabela 6 apresentamos viabilidade das CTH de baixa complexidade menores no grupo do DMSO 1,25% comparado com o grupo controle, porém apenas com uma tendência à significância estatística.

Com relação ao perfil de citocinas inflamatórias, pudemos observar como já era esperado, que o grupo da citocinas IL-1 β com mais força e o grupo da IL-8 revelaram uma elevação significativa a partir dos valores basais e na direção da menor concentração de DMSO 2,5%. Isso é o resultado direto de uma maior taxa de morte celular, sobretudo das CTH de alta complexidade e por conseqüência maior liberação de citocinas inflamatórias durante o período de armazenamento no freezer. É provável que tais citocinas tenham papel na incidência de reações adversas na infusão do enxerto, sobretudo se considerarmos que o número de granulócitos selecionados na centrifugação é muito superior àquele de um hemocomponente e que não usamos filtro de leucócitos no TCTH. Infelizmente não temos como separar a influência das citocinas daquele do DMSO durante a infusão.

Finalmente, se considerarmos a significância clínica desses resultados, podemos observar que mesmo com resultados estatisticamente significantes que mostram menor viabilidade e maior taxa de morte celular com DMSO como crioprotetor único, os valores são muito próximos e traduzem mínima perda na qualidade do enxerto. Por exemplo, no grupo do DMSO como único agente crioprotetor, a menor viabilidade encontrada na concentração de 1,25% ficou seis pontos percentuais abaixo do grupo controle (64 x 58% respectivamente). Se nos detivermos apenas na população de baixa complexidade, a diferença percentual fica em apenas sete pontos percentuais nos extremos. Da mesma forma, a diferença entre os grupos de comparação DMSO e DMSO com HES e albumina, as diferenças percentuais ficaram entre dois e 9 % com benefício ao grupo do DMSO associado

aos demais crioprotetores. Na prática do transplante, a perda de menos de dez por cento de CTH no enxerto se torna menos significativa que o possível benefício tanto financeiro como do ponto de vista de reações adversas ao paciente.

Mesmo considerando um estudo com uma amostra pequena, já pudemos perceber em alguns casos tendência e em outros, significância estatística entre as variáveis, portanto acreditamos que o aumento da amostra se traduziria num fortalecimento dos resultados encontrados.

Concluimos que em concentrações celulares relativamente elevadas parece ser possível a obtenção de viabilidades de CTH com perdas mínimas de no máximo 8% daquelas do grupo controle analisadas a fresco após a coleta independentemente do uso de HES E albumina associados ao DMSO. Além disso, os mesmos resultados parecem se repetir quando analisamos as CTH congeladas apenas com DMSO em três diferentes concentrações. Confirmando a maior taxa de necrose e apoptose nas CTH congeladas com solução crioprotetora e DMSO 2,5%, foi possível demonstrar um aumento significativo na concentração das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-8, fato que pode explicar, ao menos em parte, as reações adversas do paciente no momento da infusão do enxerto. Porém, se considerarmos um possível benefício da redução do crioprotetor na incidência de reações adversas na infusão do enxerto, não podemos ignorar que a redução do crioprotetor está associada a uma maior concentração de citocinas inflamatórias no enxerto, fato que pode significar uma persistência dos efeitos adversos na infusão, mesmo considerando a redução do crioprotetor.

