

## ANALISIS DE PROGENITORES HEMOPOYETICOS EN MUESTRAS DE MEDULA OSEA Y DE SANGRE PERIFERICA EN PERIODOS VARIABLES DE CRIOPRESERVACION

CATALINA C. BIANCHI de DI RISIO, MIGUEL ANGEL SORRENTINO, HECTOR O. LONGONI, PATRICIA G. LUCHETTA, CLAUDIO D. DUFOUR, ANIBAL J. ROBINSON

*Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina; Servicio de Hematología, Hospital Naval Dr. Pedro Mallo, Buenos Aires*

**Resumen** Con el objeto de evaluar, en función del tiempo, los efectos de la criopreservación sobre los progenitores hematopoyéticos, se estudiaron muestras de médula ósea (MO) y células progenitoras de sangre periférica (SCP) de pacientes sometidos a trasplante autólogo. Se midió la viabilidad celular y utilizando cultivos de progenitores CFU-GM y BFU-E, el poder clonogénico de las mismas y para evaluar si el estroma medular estaba afectado, se utilizó el cultivo a largo término (CALT). De los 23 pacientes estudiados, 5 tenían LMA, 7 MM, 6 LNH, 3 LLA y 2 LH. De estos recibieron trasplante de MO autóloga 9 y 14 de SCP. El tiempo de congelación, previo al trasplante, varió entre 24 y 33 días, mientras que los cultivos fueron efectuados entre 16 y 40 meses posteriores a la congelación. El desarrollo *in vitro* de colonias fue positivo en el 40% de las muestras de LMA y MM, en cambio, en el resto de las muestras, tal desarrollo se observó en casi el 100%. En las enfermedades linfoides hubo buena correlación entre las células CD34+ y el número de colonias desarrolladas *in vitro*, no así en LMA y MM. Esto hizo suponer que la enfermedad previa fuese la causante del bajo desarrollo *in vitro*. En los CALT la capa adherente tuvo su mejor desarrollo con células provenientes de MO, en cambio con las de SCP solamente se observaron macrófagos y fibroblastos. Por lo tanto se desprende que la eficiencia de la criopreservación puede ser medida empleando cultivos de progenitores CFU-GM y BFU-E y que el período que las muestras permanecen congeladas no afecta la potencialidad clonogénica de las mismas.

**Abstract** *Analysis of hemopoietic progenitor cells in bone marrow and peripheral blood samples which have undergone different periods of cryopreservation.* Bone marrow (BM) and peripheral blood stem cell (PBSC) samples from patients undergoing autologous transplant were tested to evaluate the effects of cryopreservation. Cell viability was assessed as well as the proliferative capability of CFU-GM and BFU-E (myeloid and erythroid progenitors respectively). Moreover, long term culture (LTC) of stromal cells was used to test their functionality. A total of 23 samples were studied: 5 from AML patients, 7 MM, 6 NHL, 3 ALL and 2 HL. Nine patients received autologous bone marrow transplant (ABMT) and the remaining 14 PBSC. The cells were frozen during 24 to 33 days before infusion and 16 to 40 months before culture. Forty percent of AML and MM samples gave rise to colonies *in vitro* while the other hematology diseases tested showed colony growth in almost 100% of the cases. Samples from patients with lymphoid diseases exhibited a good correlation between the percentage of CD34+ cells and the number of colonies developed in culture. Nevertheless, there was no correlation when ALL and MM were tested suggesting that the underlying disease may have affected the growth in culture. The stromal layer was fully developed on BM samples, but on PBSC samples it only generated macrophages and fibroblasts. Our results suggest that the efficacy of cryopreservation of hematopoietic cells can be measured by means of CFU-GM and BFU-E culture and that the period the samples remained frozen did not affect the growth capability of the cells.

**Key words:** cryopreservation, hemopoiesis, bone marrow transplant

El trasplante autólogo de médula ósea es una práctica médica cada vez más empleada con objetivo terapéutico para malignidades hematológicas y tumores extrahematológicos.

La finalidad del trasplante es lograr restablecer una actividad medular normal a través de la reinfusión de pre-

cursores hematopoyéticos sanos, utilizando médula ósea autóloga o heteróloga o progenitores extraídos de sangre periférica, con un procedimiento directo o previamente criopreservada.

Una criopreservación es eficiente cuando logra conservar inalteradas las características biológicas, físicas y fisiológicas de las células progenitoras hematopoyéticas<sup>1</sup>.

Los factores de mayor significación para evaluar la eficacia del procedimiento de criopreservación son: el número de progenitores vivos y el estado de los componentes recuperados y la magnitud del daño causado a

Recibido: 6-I-1999

Aceptado: 16-VI-1999

**Dirección postal:** Dra. Catalina C.B. de Di Rasio, Suipacha 612, 1008 Buenos Aires, Argentina  
 Fax: (54-11) 4332-0753  
 E-mail: FaustoDR@bancaria.com.ar

las células hemopoyéticas, considerando los tipos de tóxicos empleados, la temperatura adecuada, el tiempo de congelación y los efectos sobre la enfermedad de base de los pacientes.

Para examinar el poder clonogénico de los progenitores recuperados, una técnica adecuada es el cultivo en medio semisólido. Si bien el número de colonias obtenido en dicho cultivo, no puede ser considerado como totalmente representativo de la potencialidad de las células para poblar la médula ósea, esta técnica es posiblemente la única que hasta la fecha se posee para observar el eventual daño producido a los progenitores durante los procedimientos utilizados. En cuanto al tiempo de congelación, hay evidencias que muestran que el mismo no es factor limitante: en un trabajo se describe que los progenitores de 31 muestras de médula ósea no pierden su capacidad vital al permanecer congelados más de 48 meses<sup>2</sup>.

A pesar que el tiempo máximo durante el cual los progenitores mantienen inalteradas sus características hemopoyéticas no ha podido aún ser establecido con exactitud, en un trabajo reciente se demostró que los precursores hematopoyéticos, luego de 10 años de congelación, no perdieron su capacidad de formar colonias *in vitro*<sup>3</sup>.

Los procesos de proliferación y diferenciación de los precursores hemopoyéticos, dentro de la médula ósea (MO), necesitan la participación del estroma medular, que juega un papel importante en su regulación hematológica. Este microambiente medular está constituido por una población heterogénea de células, como: fibroblastos, células cargadas de grasa, células endoteliales, reticulares y macrófagos. En el trasplante se consideraba que era necesario infundir estos tipos de células en el receptor para que la recuperación hematológica se efectuara con mayor rapidez y eficiencia<sup>4</sup>.

Nuestro objetivo fue evaluar, en función del tiempo, los efectos de la criopreservación sobre los progenitores hematopoyéticos, midiendo su viabilidad y su poder clonogénico a través del cultivo en medio semisólido de unidades formadoras de colonias granulocito-macrofágicas (CFU-GM) y unidades formadoras de colonias eritroides (BFU-E) y observar por medio del cultivo a largo término, si el estroma medular se encontraba preservado luego de las injurias recibidas en las muestras de médula ósea y de sangre periférica estudiadas.

## Materiales y métodos

### Criopreservación

Se estudiaron 23 muestras de pacientes (previo consentimiento informado de los mismos), con neoplasmas hematológicos, sometidos a trasplante autólogo utilizando médula ósea (MO) o bien células progenitoras movilizadas de sangre periférica

(SCP) criopreservadas; las células fueron previamente acondicionadas en bolsas de polietileno de 500 ml y pequeñas alicuotas fueron colocadas en criotubos (Nunc, Inc. Naperville Il) de 2 ml de volumen, para poder ser utilizadas en ensayos posteriores. Las muestras se conservaron en nitrógeno líquido luego de un descenso de temperatura gradual en un congelador programado. Para ello fueron puestas en un equipo Cryomed con descenso gradual de temperatura, hasta -90°C, usando la microcomputadora programable modelo 1010 con tanque de congelación modelo 2 700. Las curvas de descenso se registraron con impresora modelo 6 100. El material se mantuvo a -190°C hasta su utilización en tanque Taylor-Wharton 27 K Cryostorage System<sup>5</sup>.

### Descongelación

Fueron utilizadas muestras conservadas en los criotubos. Se extrajo una muestra del tanque de nitrógeno e inmediatamente se sumergió en baño a 37°C, agitando suavemente. Se esterilizó con alcohol etílico la superficie exterior del criotubo y se virtió el contenido en un tubo de centrifuga diluyendo 5 veces el volumen inicial con medio de cultivo, 10% SFB (suero fetal bovino) y 10 U de heparina, agregados gota a gota durante 5 minutos, centrifugando luego a velocidad moderada. Se lavaron una vez más las células y luego se suspendieron en medio de cultivo. Previo recuento se hizo control de viabilidad con azul-tripán<sup>6</sup>. Se procedió a cultivar las células en medio semisólido para obtener colonias y a cultivar a largo término.

### Cultivo en medio semisólido

Las células obtenidas luego de la descongelación de las muestras se sembraron en cajas de Petri de 10 x 35 mm en razón de 200 000 células/ml, en presencia de 40 10<sup>-9</sup> g/caja del factor estimulante: Pixy, (gentilmente donado pro el Dr. Messner, Toronto, Canadá) y 2 U/caja de eritropoyetina (Sidus, Argentina), en medio IMDM (Iscove Modified Dulbecco's Medium), 30% SFB y 0.3% de Bacto agar (Difco); se colocaron luego en estufa a 37°C, en atmósfera saturada de humedad y CO<sub>2</sub> al 5%.

A los 10 días se observaron los cultivos en microscopio invertido con aumento 20x y se contaron los agregados de células clasificándolos como colonias (mayores de 40 células) y explosión de muchas colonias eritroides cargadas de hemoglobina llamados "bursts"<sup>7-11</sup>.

### Cultivo a largo término (CALT)

El CALT se efectuó utilizando medio Eagle's Modified Medium, suplementado con 12.5% de SFB, 12.5% de suero de caballo y 10<sup>6</sup> molar de hidrocortisona (Sigma). En frasco de cultivo Corning de 25 cm<sup>2</sup> se sembraron 2.10<sup>6</sup> células mononucleares/ml en un total de 5 ml. Se incubaron en estufa a 37°C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 4 semanas, cambiando la mitad del medio cada 7 días, hasta obtener la confluencia de la monocapa<sup>12</sup>.

## Resultados

En todos los pacientes trasplantados la actividad medular se restableció entre los 14 y 16 días; (se define actividad medular cuando los recuentos de neutrófilos superan los 500 por mm<sup>3</sup> en tres tomas consecutivas y el número de plaquetas es mayor de 2000 por mm<sup>3</sup>, sin transfusiones).

En la Tabla 1 se reunieron los datos clínicos y de laboratorio de los 23 pacientes trasplantados. Los pacientes con LMA y LLA, cuando recibieron el trasplante se encontraban en remisión completa (RC). En LMA cuatro permanecían en RC a los 36 meses promedio, mientras 2 fallecieron, uno a los 12 meses por recaída de la enfermedad de base y otro a los 8 días del trasplante por síndrome hemorrágico. De los pacientes con LLA, 1 se encontraba en RC a los 3 meses post-trasplante y 2 recayeron a los 5 y 6 meses del trasplante respectivamente.

Los pacientes con MM, LNH y LH, que antes del trasplante estaban en remisión parcial (RP), recibieron muestras cuyo tiempo de congelación varió entre 24 y 32 días.

Todos los pacientes con MM se encontraban a los 15 meses promedio post-trasplante en RP. De los pacientes con LNH, 5 estaban a los 16 meses promedio en RC y 1 paciente falleció a los 12 meses del trasplante. De los 2 pacientes con LH, uno vivía en RC a los 2 años del trasplante y el otro se encontraba afecto de HIV.

Para averiguar si el número de colonias *in vitro* podía estar alterado por causas relacionadas con el proceso de criopreservación se intentó verificar la existencia de una posible relación entre el número de células CD34 existentes antes de la congelación y el promedio de células muertas al descongelar la muestra. Como resultado de ello se confeccionó la Tabla 2. En LMA el promedio de colonias granulocito-macrofágicas (GM) fue bajo, siendo nulo para las colonias eritroides (E), si bien el porcentaje inicial de células CD34 fuera elevado. En MM se obtuvo también bajo desarrollo de colonias (GM) y (E), coincidiendo con un bajo promedio de CD34 y elevado promedio de células muertas. En el resto de las enfermedades el número de colonias GM y E fue elevado coincidiendo con el bajo promedio de células muertas a la descongelación.

En la Figura 1, donde se muestra el porcentaje de casos cuyas muestras alcanzaron algún desarrollo *in vitro*, se observó que en LMA y MM pocas muestras de-

TABLA 1.- Datos clínicos y de laboratorio de los 23 pacientes trasplantados

Enfermedad hematológica	Número de pacientes	Edad años $\bar{x}$	Estado previo al trasplante	Tipos de muestras	Tiempo de congelación previo cultivo meses	Tiempo de congel. previo trasplante días
LMA	5	33	RC	2:SCP 3: MO	36	32
LLA	3	22	RC	3:MO	35	33
MM	7	49	RP	7:SCP	16	26
LNH	6	40.5	RP	4:SCP 2:MO	40	32
LH	2	24	RP	1:MO 1:SCP	26	24

MO = médula ósea  
SCP = células progenitoras periféricas  
RP = remisión parcial  
RC = remisión completa

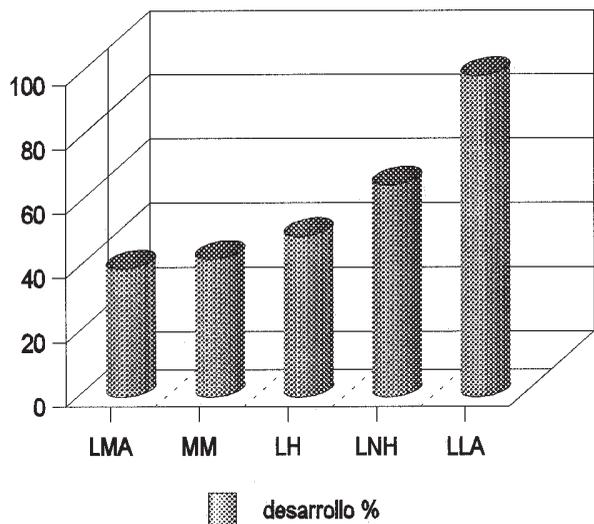
LMA = Leucemia mieloide aguda  
LLA = Leucemia linfática aguda  
MM = Mieloma múltiple  
LNH = Linfoma no Hodgkin  
LH = Linfoma Hodgkin

TABLA 2.- Desarrollo *in vitro* de progenitores granulocito-macrofágicos y eritroides de las muestras descongeladas

Enfermedad	Número de casos	Colonias $\bar{x}$ GM	E	CD34 $\bar{x}$	Células muertas al descongelar $\bar{x}$
LMA	5	44	0	1.27	37
MM	7	9	33	0.15	42
LH	2	174	-	0.29	15
LNH	6	178	56	0.52	25
LLA	3	62	51	1.79	-

Colonias  $\bar{x}$  = promedio de colonias granulocítica-macrofágicas (GM) obtenidas luego de la descongelación

CD34  $\bar{x}$  = promedio de células CD34 previo-congelación



	n°
LMA	5
MM	7
LH	2
LNH	6
LLA	3

Fig. 1.- Porcentaje de muestras de médula ósea (MO) y de células progenitoras de sangre periférica (SCP) que dieron colonias *in vitro*

Las barras indican el porcentaje de casos de las distintas enfermedades, cuyas muestras alcanzaron algún desarrollo *in vitro*.

TABLA 3.- Desarrollo del estroma medular en el cultivo a largo término de las muestras descongeladas de MO y SCP

Muestras	Número casos	Estroma medular
MO	9	Capa bien desarrollada constituida por células de diferentes morfologías (fibroblastos, macrófagos, cél. reticulares, endoteliales, de grasa)
SCP	14	Macrófagos y fibroblastos exclusivamente

MO = médula ósea. SCP = progenitores extraídos de sangre periférica

sarrollaron *in vitro*, mientras que en el resto de las enfermedades se registró un mayor número de casos que dieron colonias, alcanzando el 100% en LLA.

En la Tabla 3, donde se muestran los resultados obtenidos con los cultivos a largo término, observamos que, mientras en la mayoría de los casos donde fueron sem-

bradas muestras de MO, las capas adherentes estuvieron conformadas por tipos de células (fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, células cobertoras y de grasas), similares a lo que suele encontrarse en muestras normales, con los progenitores extraídos de sangre periférica, en la monocapa no se detectaron todos estos tipos celulares, observándose solamente macrófagos y fibroblastos en forma aislada y en escaso número.

### Discusión

La criopreservación de las células hemopoyéticas se considera exitosa si se preservan inalteradas las propiedades biofísicas de las mismas<sup>13</sup> y se evita el daño intrínseco producido por los tóxicos utilizados. Para determinar si la criopreservación ha sido eficaz es menester determinar la viabilidad celular luego de la descongelación y el poder clonogénico de los progenitores hemopoyéticos.

En este trabajo nos propusimos observar la viabilidad celular luego de la descongelación y el número de colonias desarrolladas *in vitro* y evaluar además si el tiempo podría ser una variable significativa. Hubo muestras que luego de ser criopreservadas durante 40 meses, al ponerlas en el cultivo *in vitro* produjeron abundantes colonias, lo cual evidenció que el tiempo prolongado de congelación no había alterado su potencial hemopoyético. Sin embargo se observó que algunas enfermedades eran presuntamente limitativas para el desarrollo de colonias *in vitro*. Supusimos que el bajo rendimiento del desarrollo *in vitro* de las muestras de LMA y MM, podría deberse a que los progenitores estuviesen alterados en sus propiedades biológicas y físicas y que estas alteraciones persistirían aún durante la remisión clínica de los pacientes.

En las otras enfermedades linfoides, en cambio, dado que la serie linfática se encontraba afectada, los progenitores mieloides y eritroides no estarían intrínsecamente comprometidos y por lo tanto desarrollarían *in vitro* normalmente.

Por otro lado algunos autores postulan que el uso de criotubos, para que sea correcto, requiere una protección adecuada a fin de evitar el contacto con el nitrógeno líquido, puesto que dicho contacto por un largo período de tiempo, puede dañar al material criopreservado. En las bolsas de mayor volumen, el material estaría menos expuesto<sup>5</sup>.

En cuanto al cultivo a largo término, se observó en las muestras de MO que los componentes celulares del estroma medular estaban preservados luego de la congelación, mientras que de los movilizados de sangre periférica, las únicas células del estroma que proliferaron *in vitro* fueron los fibroblastos y los macrófagos que son células asociadas a los progenitores hematopoyéticos<sup>14</sup>.

Por lo tanto no es necesaria la presencia de células del microambiente medular para que el trasplante sea exitoso, dado que todos estos pacientes habían sido precedentemente trasplantados con óptimos resultados.

Los datos que aquí consignamos, no han podido ser comparados con otros de la bibliografía por no haber encontrado ningún trabajo que tratase este tema.

Podemos concluir que células progenitoras con muy alta capacidad proliferativa pueden ser conservadas en buen estado por largos períodos de tiempo, dependiendo su rendimiento de la enfermedad de base más que de la duración de la congelación.

## Bibliografía

1. Donaldson C, Armitage WJ, Denning-Kendal PA, et al. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplantation* 1996; 18: 725-31.
2. Lemoli RM, Visani G, Motta MR, 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: 101-4.
3. Broxmeyer HE, Cooper S. High efficiency recovery of immature haematopoietic progenitor cells with extensive proliferative capacity from human cord blood cryopreserved for 10 years. *Clin Exp Immunol* 1997; 1: 45-53.
4. Tavassoli M. Radiosensitivity of stromal cells responsible for *in vitro* maintenance of hemopoietic stem cells in continuous long-term marrow culture. *Exp Hematol* 1982; 10: 435-42.
5. Regidor C, Posada M, Monteagudo D, et al. Umbilical cord blood banking for unrelated transplantation: Evaluation of cell separation and storage methods. *Exp Hemat* 1999; 27: 380-85.
6. Attarian H, Feng Z, Buckner CD, MacLeod B, Rowley SD. Long term cryopreservation of bone marrow for autologous transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1996; 17: 425-30.
7. Hubel A. Parameters of cell freezing implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfus Med Rev* 1977; 3: 224-33.
8. Messner HA, Izaguirre CA, Jamal N. Identification of T lymphocytes in human mixed hemopoietic colonies. *Blood* 1981; 58: 402-5.
9. Freshley Ian R. Culture of animal cells. A manual of basic technique. New York: Alan R. Liss, 1987.
10. Broxmeyer HE, Benninger L, Cooper S, Hague N, Benjamin RS, Vadhan-Raj S. Effects of *in vivo* treatment with Pixy 321 (GM-CSF/IL3 fusion protein) on proliferation kinetics of bone marrow and blood myeloid progenitor cells in patients with sarcoma. *Exp Hemat* 1995; 23: 335-40.
11. Gronda M, Di Risio CCB. Regulación de la hemopoyesis. *Medicina (Buenos Aires)* 1993; 53: 167-75.
12. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. *J Cell Physiol* 1997; 91: 335-9.
13. Aird W, Labopin M, Gorin NC, Antin JH. Long term cryopreservation of human stem cells. *Bone Marrow Transplantation* 1992; 9: 487-90.
14. Zuckerman KS, Prince CW, Rhodes RK, Ribadeneira M. Resistance of the stroma cells in murine long-term bone marrow cultures to damage by ionizing radiation. *Exp Hematol* 1986; 14: 1056-62.