Entre l'atzar i la necessitat

Joan Bargay, Joan Besalduch, Toni Galmés

Servei d'Hematologia i Hemoteràpia
Hospital Universitari Son Dureta. Palma de Mallorca.

Introducció

A partir del desenvolupament dels autotrasplantaments de moll d'os, es va crear la necessitat d'emmagatzemar cèl·lules progenitores hematopoètiques (CPH) mitjançant procediments que garanteixin la supervivència i el manteniment de la integritat estructural i funcional d'aquestes cèl·lules durant períodes més o menys llargs de temps.

La conservació de les CPH a temperatures superiors a 0 °C resulta molt limitada en el temps i generalment no s'aconsella conservar el moll de l'os més de 56 hores a temperatures entre 4-10 °C. Per tant, si es vol fer un autotrasplantament de CPH utilitzant altes dosis de quimioteràpia i/o radioteràpia que durin més de 3 dies, haurem de congelar les CPH d'alguna manera.

L'any 1986 Gorin va definir els factors necessaris per a una correcta criopreservació del moll de l'os, i la va diferenciar en tres fases: congelació, conservació i descongelació. Els factors que determinaven una bona congelació eren:

1) Escassa concentració cel·lular (<20 x 10^6/ml).
2) Utilització d'un bon agent crioprotector, amb la recomanació del dimetilsulfòxid (DMSO).
3) Velocitat de congelació lenta (1-3°C/minut) i constant.
4) Anul·lació específica de la calor de fusió.
5) Utilització de bosses de plàstic no lipòfil: polilefin o teflò-capton.
6) Optimització de superfície d'intercanvi calòric mitjançant dues plaques d'alumini, per aconseguir una congelació uniforme. La conservació o emmagatzematge haurà d'ésser a la temperatura més baixa possible.

Correspondència: Dr. Joan Bargay
Servei d'Hematologia
Hospital Universitari Son Dureta
Andrea Dòria, 55
07013 - Palma de Mallorca
Tel.: 971 17 50 00 - ext. 75934
Fax: 971 17 55 00
Adreça electrònica: insahem@hsd.es

Annals de Medicina 1999; 82: 275-277.

El nostre punt de partida

Fou al voltant del gener de 1993, quan després de 2 anys de fer autotrasplantaments de moll d'os sense congelar i utilitzant drogues de ràpida eliminació, ens vàrem plantejar realitzar autotrasplantaments de CPH de sang perifèrica. Això feia necessari la utilització d'un criopreservador (aparell que fa baixar de manera lenta i programada la temperatura), perquè el mètode estàndard de congelació de CPH constava de DMSO al 10% com a agent crioprotector, congelació programada a una velocitat de 1-3°C per minut i emmagatzematge final en nitrogen líquid en fase gasosa o líquida.

Què es pot fer, doncs, quan no tens un criopreservador ni tampoc un contenidor de nitrogen líquid, i vols fer autotrasplantaments de CPH de sang perifèrica? Primer de tot, demanar-ho a la gerència de l'hospital. Quan la resposta és afirmativa, es compra, i sense cap problema pots començar a treballar. Però què passa quan hi ha silenci administratiu o la resposta no és afirmativa? Hi ha dues opcions, la primera és no fer autotrasplantaments i l'altra, que fou el nostre cas, començar a esbrinar opcions per aconseguir l'objectiu de fer els autotrasplantaments.

Doncs bé, cercant bibliografia trobàrem un article escrit per Stiff i els seus col·laboradors l'any 1987, en què mostraven mitjançant assaigs de creixement de colònies *in vitro* i empelts de 72 autotrasplantaments de moll d'os en 60 pacients, que era possible criopreservar CPH de moll d'os amb una barreja d'hidroxietil amido (HES) al 6% i DMSO al 5% sense utilitzar un congelador programat. Col·locaven directament la solució en un congelador a −80 °C i posteriorment l'emmagatzemaven en N_2 en fase gasosa.

Això ens va fer veure una petita llum, i vam posar fil a l'agulla. Vàrem intentar aconseguir les mateixes troballes que l'autor mencionat. El primer problema va ser que l'HES que utilitzava l'autor no es podia aconseguir en el nostre país; el segon problema era que l'HES que nosaltres utilitzàvem no feia possible la congelació. I va arribar la depressió..., com en tants altres experiments. Però les ganes de fer autotrasplantaments persistien i entre el treball de laboratori i la recerca bibliogràfica[3], vàrem decidir no utilitzar HES. Què va passar? Que les mostres analit-

zades tenien una alta viabilitat cel·lular, amb una recuperació d'unitats formadores de colònies granulocítiques i monocítiques postcongelació semblants a les publicades amb congelador programat.

Com es poden fer autotrasplantaments de CPH sense un aparell criopreservador, amb un congelador a –80ºC i utilitzant com a únic crioprotector DMSO?

Ja s'havia comprovat en estudis *in vitro*; ara sols calia la fase més important: fer-ho amb un pacient. Es va repetir el mètode moltíssimes vegades, fins a obtenir una completa seguretat. Fou en aquell moment que arribaren a les nostres oïdes que en un hospital de Madrid també estaven intentant fer el mateix procés. Agafarem el maletí, bolígraf i llibreta i... cap a la capital: mateixos problemes, mateixes angoixes, ja ho havien fet en algun pacient...

Tornada a Palma, i al mes de juny de 1993, férem el primer autotrasplantament sense criopreservador, i sense emmagatzematge en N_2. Ja n'hem fet més de 150 des que començàrem i continuem amb el mateix mètode. Podem dir, per tant, que el que ens va moure a desenvolupar el mètode va ésser una barreja entre l'atzar i la necessitat i així poder oferir la tècnica a tots els nostres malalts.

Resultats assolits

A les Taules 1 i 2 podem veure algunes dades dels malalts trasplantats durant els anys 1993-1998.

Segons aquestes dades, es pot observar que les característiques dels malalts i els seus diagnòstics són els d'aquests tipus de trasplantaments. Per altra banda, els temps de recuperació, així com els temps d'hospitalització, són comparables a altres sèries publicades en què s'ha emprat el sistema clàssic de criopreservació programada.

TAULA 1. **Característiques dels pacients (n = 107)**

Diagnòstics	
Càncer de mama	44
Limfoma No Hodgkin	22
Malaltia de Hodgkin	11
Mieloma múltiple	0
Leucèmia aguda mieloblàstica	9
Leucèmia aguda limfoblàstica	3
Leucèmia limfàtica crònica	2
Altres	6
Edat (anys)	
Mitjana (rang)	42 (4-62)
Sexe	
(Mascle/Femella)	36/71
Quimioteràpia prèvia	
Mitjana (rang)	2 (1-4)
Temps diagnòstic-Trasplantament (mesos)	
Mitjana (rang).	17 (3-213)
Estatus trasplantament	
Remissió completa	67
Remissió parcial	37
Refractària	3
Altres	
Sarcoma d'Ewing (2), seminoma (1), neuroblastoma (2), ependimoma (1).	

Conclusions

La nostra experiència convida a la reflexió sobre la necessitat de simplificar al màxim el treball de cada dia per facilitar la nostra tasca, reduir costos i utilitzar al millor possible els nostres esforços. En definitiva, ser més eficient. Actualment en el nostre país, quan hom ha de començar un programa de criopreservació de CPH, ja no es planteja la necessitat de comprar un criopreservador.

TAULA 2. **Recuperació hematopoètica i valors clínics**

	Global	CM	LNH	MH	MM
Dies per:					
ANC 0,5 x 10^9/l 12(7-39)	11,5(7-21)	12,5(9-22)	14(9-39)	11(9-15)	
Plaquetes >20 x10^9/l	15(3-97)	13 (3-65)	12,7(3-28)	21(10-97)	12(9-17)
Transfusions GR	3 (0-23)	3,6(0-18)	4(0-13)	2,3(0-8)	2,7(0-10)
Transfusions Pla (Unitats)	4(0-35)	4 (1-35)	4,8(1-19)	4 (0-24)	2,8(0-10)
Dies d'Hospitalització	16(9-43)	14,8(10-29)	16(11-27)	17(13-43)	14 (9-21)

CM: Càncer de mama; LNH: Limfoma No Hodgkin; MH: Malaltia de Hodgkin; MM: Mieloma múltiple; ANC: Neutròfils; GR: Glòbuls vermells.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. Gorin NC. Collection, manipulation and freezing of haemopoietic stem cell. In: Clin Haematol 1986; 15: 19-48.
2. Stiff PJ, Koester AR, Weidner MK, Dvorak K, Fisher R. Autologous Bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimetylsulfoxide and hydroxyethyl starch witout controlled-rate freezing. Blood 1987; 70: 974-78.
3. ClarkJ., Pati A, McCarthyD. Successful cryopreservation of human bone marrow does not require a controlle-rate freezer. Bone Marrow Transplant 1991; 4: 121-25.
4. BargayJ, Besalduch J. Criopreservación de células progenitoras heamotpoyéticas: ¿Una técnica en proceso de simplificación? Sangre 1994; 39: 325-328.
5. GalmésA, Besalduch J, Bargay J et.al. Simplified Method for cryopresevation of hematopoietic stem cells with −80ºC mechanical freezer with Dimethy Sulfoxide as the sole cryoprotectant. Leukemia and Lymphoma 1995; 17: 181-184.
6. Galmés A, Besalduch J, Bargay J et al. Cryopreservation of hematopoietic blood cells with 5% dimethilsulfoxide at −80ºC without rate-controlled freezing. Tranfusion 1996; 36: 794-797.
7. Galmés A, Besalduch J, Bargay J et al. Long-term storage at -80ºC of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant. Tansfusion 1999; 39: 70-73.