

MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DE MEDULA ÓSSEA PARA TRANSPLANTAÇÃO AUTÓLOGA

F. LEAL DA COSTA, PEDRO PIMENTEL, ALICE TAVARES, CLARA JUNCAL, J.M. FORJAZ LACERDA

Unidade de Transplantação de Medula Óssea (UTMO) do Hospital de Santa Maria (HSM), Lisboa.

RESUMO

A Autotransplantação de Medula Óssea, em que a medula do próprio doente serve de suporte para a reconstituição hematopoiética após quimiorradioterapia mieloablativa, pressupõe a necessidade de conservar a medula *ex vivo*. A duração deste período de conservação terá de variar consoante o programa terapêutico a empregar. Apesar de ser possível manter a viabilidade da medula óssea, sem congelação, por alguns dias, a conservação por períodos mais longos impõe a necessidade de criopreservação. São revistos alguns dos métodos usualmente empregues na conservação de medula óssea para transplantação, com especial destaque para a criopreservação. Descreve-se o método de congelação de medula óssea empregue na Unidade de Transplantação de Medula Óssea (UTMO) do Hospital de Santa Maria (HSM).

SUMMARY

Bone marrow preservation methods for autologous bone marrow transplantation

For Autologous Bone Marrow Transplantation (ABMT) the patient's own marrow is harvested before myelotoxic high-dose radio-chemotherapy and later returned to promote hemopoietic reconstitution. Between harvest and return the bone marrow must be preserved. The time elapsed between harvest and return depends on the intended therapy. Although — bone marrow may keep its hematopoietic potential for a few days without freezing, preservation for longer periods imposes the need for cryopreservation. Some of the current methods for marrow preservation are reviewed, with special emphasis given to cryopreservation. Hospital de Santa Maria Bone Marrow Transplant Unit cryopreservation method is described.

INTRODUÇÃO

A Autotransplantação de Medula Óssea (ATMO) consiste na utilização de medula óssea do próprio doente como suporte da recuperação hematopoiética após quimio-radioterapia mielotóxica intensiva, de alta-dose, ou mesmo mieloablativa. Nesta modalidade de transplantação de medula o enxerto é colhido antes da terapêutica e devolvido depois desta. Apesar de se ter demonstrado ser possível dar quimioterapia mielotóxica de alta-dose sem suporte medular autólogo, usando factores de crescimento hematopoiético^{1,2}, não é provável que o enxerto de células estaminais possa ser abolido quando se empreguem fármacos, ou radiações, mieloablativos. Os primeiros resultados de autotransplantação de medula óssea surgiram no fim dos anos 50 e início dos anos 60 e foram muito desencorajadores³. Resultou este facto da insuficiência das terapêuticas antitumorais empregues, do atraso relativo em outros meios de suporte nomeadamente antibióticos e das limitações dos métodos de criopreservação então aplicados. A partir de meados dos anos de 70, com o desenvolvimento de técnicas de estudo *in vitro* da hematopoiese humana e de métodos rigorosos de congelação de medula óssea, tem-se assistido a um aumento sempre crescente do número de ATMO realizados. Entre 1987 e 1989 foram efectuados mais de 6000 transplantações autólogas no conjunto da Europa e Estados Unidos, na sua maioria em doentes com Linfomas, Leucemias, Carcinomas da Mama e Neuroblastomas⁴. actualmente assiste-se a um

desenvolvimento de novos métodos de colheita de células estaminais com recurso a técnicas de citafereze para obtenção de enxertos colhidos a partir do sangue periférico em doentes em fase de saída de aplasia medular após quimioterapia citotóxica⁵. Em termos gerais podem-se considerar duas modalidades de ATMO, consoante o método de conservação da medula óssea, até à reinfusão no doente; ATMO com medula a *Fresco*, isto é, não congelada e ATMO com medula *Criopreservada*.

CONSERVAÇÃO SEM CONGELAÇÃO

Dependendo do método de avaliação de progenitores hematopoiéticos — Colony Forming Units (CFU) — a medula óssea humana mantém o seu potencial clonogénico *ex vivo*, por períodos de 48 a 96 h quando conservada a 4°, 10° ou 37°C, segundo diferentes autores, podendo afirmar-se que a 4° ou 10°C é possível obter recuperações de CFU-C, da ordem de 85% às 48 h⁶. Parece haver, no entanto, um declínio na taxa de recuperação a partir das 12 h de armazenamento⁷. Segundo alguns autores, o armazenamento à temperatura de 37°C seria vantajoso^{8,9} com recuperações aumentadas, principalmente nas taxas de CFU-C até às 48 h. As sobrevivências celulares às 72 h⁷ não parecem ser suficientes para assegurar uma reconstituição hematopoiética eficaz, sendo a linhagem megacariocítica aquela que apresenta maior perda de viabilidade a partir das 48 h. No

entanto alguns autores demonstraram a possibilidade de conservação do potencial de reconstituição hematopoiética entre 4¹⁰ e 6-8 dias¹¹. Os enxertos não manipulados *in vitro* têm seguramente um maior potencial de repovoamento e, daí, a sua utilização clínica como suporte autólogo, em particular em doentes já anteriormente sujeitos a terapêuticas citotóxicas de grande duração ou intensidade. O recurso a medula *fresca* pressupõe a utilização de fármacos de eliminação rápida cujo melhor exemplo é o Melfalan isolado ou em associação com Irradiação Corporal Total — Total Body Irradiation (TBI)^{12,13}. Realizaram-se vários ensaios clínicos com quimioterapia intensiva e suporte medular não criopreservado, embora na maioria dos casos os regimes empregues não fossem verdadeiramente mieloablativos^{6,12,14-18}. Na grande maioria destes estudos a medula foi reinfundida cerca de 48 h após a colheita. No entanto Burnett e colab.¹⁹, referem quatro casos de reconstituição hematopoiética, com medula conservada a 4°C, reinfundida até 54 h após a colheita, em doentes tratados com Ciclofosfamida e TBI.

Outra forma de realizar ATMO com medula *fresca* é a de conservá-la em sistema de cultura de células de longo prazo — Long Term Bone Marrow Culture (LTBMC)²⁰ que também pode possibilitar a depuração de células malignas^{21,22}. Apesar de ser possível conservar o potencial hematopoiético da medula óssea por períodos de até 10 semanas²³, o tempo de conservação em LTBMC, para uso clínico, não tem excedido dez dias na quase totalidade dos casos²⁴. Alguns estudos preliminares têm avaliado a aplicação clínica de LTBMC²⁴⁻²⁵ e a possibilidade de erradicação do clone com cromossoma Filadélfia em doentes com leucemia mielóide crónica (LMC) abriu novas perspectivas no tratamento de doentes com LMC sem dador HLA compatível²⁴⁻²⁶.

CONSERVAÇÃO COM CONGELAÇÃO

Várias circunstâncias levaram a que tivessem sido desenvolvidos métodos de conservação de medula óssea por períodos longos. A procura de melhores resultados para a quimioradioterapia de alta dose levou à utilização de fármacos de semi-vida mais longa, isolados ou sem associações. O emprego de fármacos de eliminação mais lenta pressupõe a reinfusão da medula óssea muito depois da sua colheita.

Para a congelação de medula óssea é preciso considerar vários passos que envolvem: 1) o processamento para concentração de células mononucleares, 2) a adição de *solução de congelação* ao produto a congelar, 3) a congelação em criopreservador programável, ou em arca congeladora, 4) o armazenamento da medula criopreservada e 5) a reinfusão nos doentes.

1) Processamento para concentração de células mononucleares.

Antes de se proceder à congelação, a medula deve ser processada para diminuição do volume, eliminação de glóbulos vermelhos e eliminação de granulócitos. A redução de volume tem como objectivo diminuir a quantidade de crioprotector a usar e o espaço necessário para a congelação e armazenamento e ainda, quando se recorre a depuração *in vivo*, diminuir os custos e aumentar a eficácia²⁴. Os glóbulos vermelhos são usualmente lisados após a descongelação e os produtos do lisado são nefrotóxicos²⁸. A lise de granulócitos que também ocorre habitualmente, leva à libertação de DNA e enzimas lisossomais que induzem a formação de agregados (*clumping*) potencialmente lesivos das células pluriopotenciais²⁹. Alguns autores defendem o uso de DNase na solução de congelação³⁰ para reduzir o *clumping*, mas esta técnica torna o processo mais caro e difícil, não parecendo ser necessária³. Vários métodos e técnicas têm sido usadas para o processamento de medula óssea com sedimentação por gravidade em gradiente^{30,31}, ou com separadores célula-

res automáticos, havendo protocolos para diversos aparelhos de separação e congelação. Os aparelhos mais usualmente empregues têm sido os IBM/COBE e Haemonetics, com os quais se têm referido taxas de perda de células mononucleadas que rondam os 20%^{27,30-36}. Na nossa Unidade temos procedido a separação de células mononucleares com recurso a sedimentação por gravidade com Hidroxiethylamido — Hydroxiethylstarch (HES), segundo método anteriormente descrito³⁷, com uma recuperação de $\pm 77,6\%$ de células mononucleares.

2) Adição de solução de congelação ao produto a congelar.

A congelação de medula óssea, como de outros tecidos vivos, só é possível, sem perda de viabilidade funcional após descongelação, com recurso a agentes crioprotectores que são misturados em determinadas concentrações com a medula a congelar. Estes agentes protegem as células dos *efeitos de solução* que se verificam quando da formação de cristais do gelo no meio extracelular com aumento da osmolaridade do meio, agravados pelo arrefecimento lento e das consequências da *recristalização*, ou seja, da reorganização de cristais durante a fusão e do *choque de diluição*, isto é, a diminuição da osmolaridade do meio extracelular que resulta da fusão progressiva dos cristais^{3,29}. O modo de acção destes agentes não está completamente elucidado, mas parece depender das suas acções na membrana celular³⁸. A solução contendo o agente crioprotector que se mistura com a amostra de medula a conservar, denomina-se de *solução de congelação*. O crioprotector mais usado é o Dimetilsulfoxido (DMSO)³. Actualmente a maioria dos autores concorda com a necessidade de também incluir, na solução de congelação, albumina a 20%, soro ou plasma autólogo. Alguns centros incluem meio de cultura, por exemplo TC 199 ou RPMI 1640 na solução de congelação, embora seja possível e mais barato proceder às diluições com plasma autólogo e soro fisiológico. O plasma autólogo fica disponível após a separação da células mononucleares e não constitui um risco infeccioso ou imunológico. O DMSO pode ser infundido directamente, sem necessidade de ser removido do enxerto, o que constitui uma vantagem, como teremos oportunidade de referir. A maioria dos autores usa DMSO nas concentrações finais de 10 a 20%, embora seja possível usar concentrações de 5%, com a mesma eficácia crioprotectora. A utilização de DMSO a 5% poderá oferecer a vantagem de diminuir a toxicidade que se exerce sobre as células estaminais, a temperaturas que vão dos 4°C à temperatura ambiente, antes da congelação e após a descongelação³⁹. Temos usado uma modificação do protocolo do The Royal Marsden Hospital, Londres, em que preparamos a *solução de congelação* com DMSO (Sigma Cat., grau analítico) e Soro Fisiológico (SF) em partes iguais, i.e. 50% de DMSO, a qual conservamos a 4°C durante o tempo em que decorrem os passos seguintes, de forma a compensar o efeito exotérmico do DMSO. A medula óssea é introduzida em sacos de congelação (Gambro DF 700), a que se adiciona pelo menos 30-50% de plasma autólogo, de forma a perfazer 108 ml de volume total do saco. Por fim introduzimos 12 ml da *solução de congelação*, previamente preparada e arrefecida, de forma a termos uma concentração final de 5% de DMSO em 120 ml. A introdução de DMSO deve ser lenta, com agitação suave do saco, para permitir uma distribuição homogénea deste agente. A diluição de medula em volumes grandes permite manter contagens de células mononucleares em torno de 20×10^6 /ml, como recomendado³. A preparação dos sacos é feita à temperatura ambiente em câmara de fluxo de ar laminar. Após a introdução do DMSO os sacos com a medula devem ser introduzidos na câmara de congelação. No Quadro I resumimos os passos de preparação dos sacos para congelação. Outros autores também têm utilizado a congelação com

QUADRO 1 — Resumo do protocolo de preparação de sacos de medula óssea para congelamento, da Utmo do HSM

- 1 — Medição do volume de *Buffy Coat Medular* a congelar e contagem de células mononucleares.
- 2 — Cálculo do n.º de sacos; 50-70 ml de medula por saco.
- 3 — Diluição do DMSO (grau analítico) com Soro Fisiológico, em partes iguais; 12 ml de solução por saco. Conservar a solução a 4°C.
- 4 — Introdução de Medula nos sacos (Gambro DF 700), seguido de plasma autólogo, até perfazer um volume total de 108 ml por saco.
- 5 — Introdução da solução de DMSO (12 ml por saco), agitando suavemente.
- 6 — Volume final por saco de 120 ml; 5% DMSO.
- 7 — Congelar de imediato.

DMSO a 5%⁴⁰ e até mesmo para congelamento de células estaminais colhidas a partir do sangue periférico⁴¹, como já foi efectuado na nossa Unidade.

3) Congelamento em criopreservador programável, ou em arca congeladora.

A conservação pelo frio ou criopreservação, pode ser efectuada com aparelhos para congelamento programada com azoto líquido e ulterior manutenção em arcas com este refrigerante^{3,29,33,42,43} ou então, com arcas frigoríficas^{44,45}. Entre os factores que têm sido considerados na avaliação do *método óptimo* de criopreservação de medula óssea humana, o programa de congelamento e o *calor de fusão* têm sido estudados em particular⁴⁶⁻⁴⁸. Actualmente há acordo geral com o princípio da congelamento a ritmo constante^{3,29,48}. Mesmo em arcas frigoríficas o ritmo de arrefecimento da medula simula aquele que é obtido com criopreservadores programáveis de azoto líquido. A congelamento em sacos de material crioresistente é fácil de executar e permite simultaneamente um armazenamento simples e a reinfusão rápida da medula logo após a descongelamento, bastando, para isso, ligar o próprio saco a um sistema de transfusão. Na realidade não existe um programa de congelamento ideal. Apenas alguns pontos parecem ser indiscutíveis, como por exemplo a necessidade de arrefecer a medula a 1-2°C/min até à temperatura de -40°C, manter o mesmo ritmo de arrefecimento lento antes e depois da libertação do *calor de fusão* e arrefecer até -140°C, pelo menos. O *calor de fusão*, energia libertada pela medula durante a mudança de fase líquida para sólida, traduz-se por um aquecimento da câmara de congelamento. A este aquecimento súbito que pode ser de vários graus centígrados sucede um aumento do ritmo de arrefecimento pela máquina, pré-programada para manter uma determinada temperatura naquele momento da congelamento. Estas variações de temperatura podem levar à formação de cristais intracelulares, com destruição da célula⁴⁷. Alguns autores têm preconizado a intervenção *manual* do operador — *override* — aumentando a entrada de azoto líquido na câmara, no momento da libertação do *calor de fusão*, contrariando assim o aquecimento rápido^{48,49}. Não nos parece que esta prática seja recomendável já que o fenómeno de libertação do *calor de fusão* é imprevisível no seu momento e intensidade, apenas observável depois de já ter acontecido e existe sempre o risco de interferir de forma mais grave ao induzir um arrefecimento mais rápido. Aliás outros autores têm procedido da mesma forma, não interferindo no processo de congelamento⁴². No Hospital de Stª Maria temos utilizado um criopreservador programável de azoto líquido (Planer Kryo 10) e uma modificação da descrição de Gilmore et al³² do programa de P. Hérve (Besançon). Temos iniciado o arrefe-

cimento, após introdução de medula, a partir da temperatura ambiente até um mínimo de -160°C. No Quadro 2 apresentamos o programa de congelamento que temos seguido.

4) Armazenamento da medula criopreservada

Em azoto líquido a medula óssea é conservada entre -140° e -196°C, consoante o armazenamento seja efectuado em fase vapor ou fase líquida do refrigerante. A congelamento em arcas congeladoras de -70° a -80°C tem a vantagem de ser menos dispendiosa e porventura mais simples. No entanto ainda não é claro que seja possível manter a viabilidade da medula conservada a -80°C por períodos superiores a quatro meses⁴⁴. Na nossa Unidade o armazenamento dos sacos de medula congelada é efectuado em azoto em fase líquida, em contentor próprio, à temperatura de -196°C, considerada ideal^{3,29}. Todas as manobras que envolvam abrir o contentor, com a consequente aceleração da perda de azoto têm de ser limitadas ao mínimo de forma a não sujeitar os produtos armazenados a grandes flutuações de temperatura.

5) Reinfusão do enxerto medular congelado

Após a descongelamento alguns autores preconizam diluições progressivas da medula a infundir ou a sua lavagem e centrifugação para remoção do DMSO^{29,49,56}. No entanto, a manipulação da medula após descongelamento, diminui o número de células pluripotenciais⁵⁷, sendo de recomendar a infusão rápida da medula óssea por catéter central, logo após a descongelamento sem outras manobras *ex vivo*^{3,32,43,52}. Consegue-se assim uma diluição adicional *in vivo* do DMSO que, sendo crioprotector, paradoxalmente é, como já vimos, tóxico para as células estaminais medulares a 37°C. Temos descongelado a medula para reinfusão com imersão em água a 37-40°C, para descongelamento rápido seguido de infusão rápida, a partir do saco Gambro, com sistemas de infusão de soros sem filtro. Num estudo recente sobre toxicidade de infusão de medula óssea criopreservada, o grupo de Johns Hopkins refere que em 53% dos casos (44 de 82 doentes) houve queixas de náuseas, dores abdominais e fenómenos vasomotores. Outros achados comuns foram bradicardia e hipertensão transitória, mas em nenhum dos casos houve complicações graves⁵³. A presença de alguns eritrócitos em *buffy coat* criopreservado leva a um aumento de hemoglobinúria, embora o risco de Insuficiência Renal, na ausência de outros factores de risco, nomeadamente insuficiência hepática ou desidratação, seja muito baixo⁵⁴. Quase todos os doentes que recebem medula criopreservada com DMSO têm um hábito desagradável nas horas seguintes, em virtude de eliminarem dimetilsulfeto pelos pulmões⁵⁵. Com uma redução do volume de medula a infundir e baixas concentrações de DMSO (5% em vez de 10 ou 20% como usualmente recomendado), os efeitos secundários da infusão de medula criopreservada tendem a

QUADRO 2 — Programa de congelamento da UTMO do HSM

Rampa	Temperatura inicial	Arrefecimento	Duração	Temperatura final
1	Ambiente	-5°C/min	Variável	+4°C
2	+4°C	0°C	15 min	+4°C
3	+4°C	-2°C/min	4,5 min	-5°C
4	-5°C	-1°C/min	35 min	-40°C
5	-40°C	-5°C/min	24 min	-160°C

desaparecer. Por outro lado, a premedicação com antihistaminicos, visto o DMSO induzir a libertação de histamina, contribui para uma ainda maior redução de efeitos secundários. Como pré-medicação temos administrado Clemastina E.V. Em casos de cólicas abdominais pode-se administrar Butilescopolamina E.V. Após a reinfusão administramos Biocarbonato de Sódio isotónico E.V., 1000cc em 4 h e iniciamos pesquisas de Hemoglobinúria.

EXPERIÊNCIA DE CRIOPRESERVAÇÃO DA UTMO DO HOSPITAL DE SANTA MARIA

Entre Julho de 1990 e o fim de Maio de 1991 procedemos a 21 congelações de medula óssea, com o método descrito. A 16 doentes a medula óssea foi reinfundida após quimioterapia mieloablativa compreendendo Busulfan (16 mg/Kg). A um doente foi administada terapêutica com Melfalan (160 mg/m²) seguida de suporte medular *fresco* complementando com enxerto autólogo criopreservado que tinha sido considerado insuficiente para assegurar a reconstituição hematológica. Das restantes medulas, 3 mantêm-se congeladas para posterior reinfusão e 1 foi rejeitada por recaída imediatamente após a colheita. A mediana do intervalo entre a data da congelação e da reinfusão foi de 18 (8-202) dias. Durante a reinfusão apenas 1 doente teve uma reacção grave com febre com calafrio, tremores e hipotensão que cedeu à administração de Metilprednisolona E.V. e Adrenalina S.C. Três doentes tiveram hematúria macroscópica após a reinfusão da medula e 1 doente teve Hipertensão que cedeu a diuréticos. Nenhum doente teve evidência de Induficiência Renal nos 3 dias após o retorno da medula. O volume infundido foi de 240-360 ml para a maioria dos doentes. Apenas 2 doentes receberam 480 ml de medula. Dos 16 doentes, tratados com regime mieloablativo, 15 receberam suporte exclusivamente com medula óssea criopreservada (um doente recebeu enxerto medular criopreservado complementado com células colhidas a partir do sangue periférico também criopreservadas). A média de células mononucleares infundidas foi de 2,1 x 10⁸/Kg (s=0,73). Quatorze doentes têm um seguimento pós-Atmo > 60 dias (Quadro 3). Treze doentes são avaliáveis quanto à recuperação hematológica (um doente faleceu em D+7 e não é avaliável quanto à recuperação hematopoiética). Dos 13 doentes avaliáveis, um faleceu em recaída, em D+106, sem ter tido evidência de recuperação

hematopoiética e 1 doente está dependente de transfusões, com plaquetas < 25 x 10⁹/l em D+87, apesar de estar em remissão de leucemia linfoblástica aguda. Todos os restantes, 11 doentes, tiveram recuperação hematológica. Para os 13 doentes avaliáveis a mediana de dias com neutrófilos < 0,5 x 10⁹/l foi de 23 (15-106) dias e plaquetas < 25 x 10⁹/l foi de 23 (8-187+). Dez doentes atingiram plaquetas > 50 x 10⁹/l após 33 (9-121) dias do início da trombocitopenia (< 25 x 10⁹/l). Sete doentes, em remissão completa pós-ATMO, atingiram plaquetas > 100 x 10⁹/l após 39 (21-70) dias do início da trombocitopenia (< 25 x 10⁹/l). A evolução clínica de alguns destes doentes já foi alvo de apresentação⁵⁶.

CONCLUSÃO

Um levantamento dos protocolos de processamento e armazenamento de medula óssea nos Estados Unidos e Canadá⁵⁷, envolvendo 110 centros inscritos no Internacional Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR), demonstra bem a ausência de unanimidade de métodos no que respeita às práticas em estudo. Apenas 17% dos centros não usam congelador programável de azoto líquido e, este número, deverá ser menor na Europa. A maioria dos centros usa DMSO a 10% na solução de congelação, embora em 17% destes utilizem o crioprotector na concentração final de 5%. O período mais longo, entre a colheita e a administração, foi de 8 anos. Recentemente descreveu-se um período de 11 anos⁵⁸ e em termos teóricos, mantidas as mesmas condições térmicas, isto é armazenamento a -196°C, este período deverá ser muito maior.

Um dos problemas críticos em transplantação de medula óssea e em particular em autotransplantação é o de saber qual o potencial hematopoiético do enxerto⁵⁹⁻⁶¹. O único método eficaz para avaliação da qualidade do enxerto antes da transplatação, é o de cultura in vitro de progenitores hematopoiéticos, para a qual existem vários métodos descritos⁶²⁻⁶⁵. No entanto, a avaliação in vitro do potencial do enxerto tem limitações metodológicas, mais importantes nos estudos de medula criopreservada. O uso de amostras, congeladas em pequenas ampolas, terá sempre o erro inerente ao facto de as condições de congelamento e armazenamento de pequenas quantidades não reproduzirem as circunstâncias físicas do saco de congelamento de medula

QUADRO 3 — Recuperação hematológica dos doentes tratados com quimioterapia de alta-dose e suporte medular criopreservado

Nome	Sx	Id	Dg	Fase da doença	Terap	Cel. x 10 ⁸ /Kg)	Dias c/ Neut. < 0,5 x 10 ⁹ /l	Dias c/ Pla. < 25 x 10 ⁹ /l	Dias c/ Pla. < 50 x 10 ⁹ /l
PA	M	19	LNH	2. ^a RP	B/M	1	*	—	—
ML	M	44	LNH	2. ^a RC	B/M	1,7	23	101	121
MN	M	42	LNH	2. ^a RC	B/M	1,3	17	23	30+
JM	M	20	LMA	1. ^a RC	B/C	2,1	17	8	14
AM	M	41	LMA	1. ^a RC	B/M	2,4	106**	106**	—
CP	F	20	LMA	2. ^a RC	B/M	2,1	36	35	56
IN	F	25	LLA	2. ^a RC	B/M	1,4	24	23	24
LS	F	25	LLA	3. ^a RC	B/M	2,7	16	34	45
JP	M	39	LLA	2. ^a RC	B/M	1,9	48	187+	—
SM	F	17	LLA	2. ^a RC	B/M	2,6	16	21	25
ES	M	10	LLA	2. ^a RC	B/M	2,9	25	39	39
JC	M	34	DH	2. ^a RP	B/M	1,4	15	18	32
GF	M	2	Nbl	2. ^a RP	B/M/Cb	3	17	9	9
FC	F	39	CaM	RC	B/M/Cb	1,7	24	23	34

Sx — sexo; Id — idade; Dg — diagnóstico; Terap — regime de condicionamento; Neut. — neutrófilos; Pla. — plaquetas; LNH — linfoma não hodgkin; LMA — leucemia mieloblástica aguda; LLA — leucemia linfoblástica aguda; DH — doença de hodgkin; Nbl — neuroblastoma; CaM — carcinoma da mama; RC — remissão completa; RP — remissão parcial; B — busulfan; M — melfalan; C — ciclofosfamida; Cb — carboplatina; * — doente faleceu em D+7; ** — doente faleceu com doença activa em d + 106. Nota: ambos os doentes com neoplasias não hematológicas (GF e FC) foram tratados em fases avançadas, como programa de intensificação.

com volumes maiores, não devendo ser usadas amostras pequenas para monitorização de sacos de congelamento³; inclusivamente, um resultados negativo não pode excluir o potencial da medula conservada no saco. Apenas a cultura de progenitores a partir do saco, com células colhidas na altura da descongelação para administrar ao doente poderá dar resultados fiáveis. No entanto, os estudos por cultura de medula óssea após descongelação do saco, só podem dar resultados cerca de 15 dias após o início da incubação ou seja, não terão aplicabilidade, a não ser *a posteriori*, em cada caso concreto. Provavelmente com um enxerto de apenas $0,5 \times 10^8$ células mononucleadas/Kg de peso do receptor, ou até talvez menos, será possível obter uma reconstituição hematopoiética em transplantação autóloga dada a ausência de rejeição e habitualmente de reacção de enxerto-versus-hospedeiro^{3,60,61,66}. No entanto, este valor e o de 1000 CFU-GM/Kg têm de ser entendidos como referências e não como limites mínimos absolutos^{3,58,59}. Por outro lado, a definição de dose mínima de CFU a infundir dependerá do método de ensaio usado e do tipo de depuração empregue. Tem-se estudado a possível relação entre progenitores infundidos, determinados por cultura in vitro e o tempo para recuperação hematopoiética. No entanto alguns dos estudos habitualmente citados referem-se a séries com patologias diversas, regimes de quimioterapia muito dispares e até, em muitos casos, sem capacidade mieloablativa^{59,67}.

Enquanto alguns autores têm encontrado relação entre o número de progenitores em cultura de medula óssea e duração da neutropenia^{60,61,68,69}, outros estudos não têm encontrado relação significativa^{59,67}, ou até nenhuma relação⁷⁰⁻⁷², entre o número de CFU infundidas e a duração da recuperação hematopoiética. Em doentes com neoplasias linfóides, ou com cancro da mama, a recuperação hematopoiética relacionou-se mais com a intensidade e duração da terapêutica anterior à colheita do enxerto, do que com os CFU infundidos, ou, até mesmo, com n.º de células mononucleares no enxerto^{66,70,71}. O valor preditivo das culturas de precursores tem de ser, pelo menos por enquanto, encarado com alguma reserva. As determinações de CFU no enxerto têm particular interesse quando da investigação de novos métodos de conservação, depuração de enxerto e colheita de células estaminais. Também no último caso tem-se procurado desenvolver métodos com recursos a citometria de fluxo para obviar à morosidade das culturas⁷³. De acordo com o levantamento do IBMTR⁵⁷, 3% dos centros inquiridos não fazem estudos de viabilidade e 24% testam por exclusão de corante vital, método esse de valor duvidoso quando usado isoladamente. Apesar de todas as interrogações e limitações técnicas existentes⁷⁴, procedemos à avaliação, de forma sistemática nas primeiras 4 congelações consecutivas, de G e GM-CFU, em agar, seguindo uma modificação do método de Pike e Robinson⁶³ — com meio de condicionamento 5637⁷⁵ —, a partir de ampolas com 1 ml de medula congeladas em simultâneo com os sacos.

Um dos aspectos mais controversos em ATMO é o de saber o valor ou necessidade dos métodos de *depuração* medular, isto é das manobras *ex vivo* a que o enxerto poderá ser sujeito na tentativa de retirar da medula a doença residual mínima. A maioria dos métodos empregues recorre a compostos citotóxicos⁷⁶, em doses baixas, ou a anticorpos monoclonais⁷⁷. Nenhum dos métodos existentes tem-se mostrado satisfatório e alguns resultados clínicos põem em questão a sua utilidade, na maioria das doenças oncológicas. A discussão do valor da depuração in vitro está par lá do âmbito deste trabalho, no entanto parece-nos permitente referir alguns aspectos que se prendem com modificações biológicas induzidas por variações extremas de temperatura. A existência de resultados semelhantes com medula criopreservada não-depurada, ou depurada, em algumas séries de

tratamento de leucemias agudas levou a que fosse postulado um papel depurador para a criopreservação^{78,79}. Este papel é actualmente alvo de investigação e recentemente o grupo do Hospital de St. Antoine, em Paris, realizou um estudo em que testaram o efeito de seis métodos diferentes de congelação no potencial clonogénico de células leucémicas. Para qualquer dos métodos, quer com DMSO a 10% ou 20%, quer com criopreservador programável ou com congelação directa a -80°C , houve uma redução do número de colónias de leucemia, quando comparado com ensaio pré-congelação. Por outro lado confirmaram a maior sensibilidade dos clones leucemicos ao frio⁸⁰. Curiosamente também a hipertermia, com aquecimento das células a 42°C , para qual as células leucémicas são mais sensíveis também tem sido alvo de investigação, em particular por autores Japoneses⁸¹.

BIBLIOGRAFIA

- BROWN R.A., HERZIG R.H., WOLFF S.N., et al: High-Dose etoposide and cyclophosphamide without bone marrow transplantation for resistant hematologic malignancy. *Blood* 1990; 76: 437-479.
- FOUILLARD L., GORIN N.C., LAPORTE J. PH., DOUAY L., ISNARD F., NAJMAN A.: Recombinant human Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor plus the beam regimen instead of autologous bone marrow transplantation. *Lancet* (letter) 1990; 1: 1460.
- GORIN N.C.: Collection manipulation and freezing of haemopoietic stem cells. *Clin Haematol* 1986; 15: 19-46.
- ARMITAGE J., GORIN N.C.: Trends in autologous bone marrow transplantation results of the survey of ABMTR. *ABMTR Newsletter* 1990; (2): 1-2.
- HENON P.R., BUTTURINI A., GALE R.P.: Blood-derived haemopoietic cell transplants. *Blood to blood*. *Lancet* 1991; 337: 961-963.
- MANGALIK A., ROBINSON W.A., DREBING C., HARTMANN D., JOSHI J.H.: Liquid storage of bone marrow. *Exp Hematol* 1979; 7 (supp. 5): 76-94.
- MILLAR J.L., DALESIO O., SMITH I.E., editors.: *Autologous bone marrow transplantation and solid tumors*. Nova Iorque. Raven Press 1984; 9-12.
- WELLS R.J., CLINE M.J.: Preservation of granulopoietic precursors in non frozen stored human bone marrow. *Transplantation* 1976; 22: 568-571.
- NISKANEN E.: Preservation of human granulopoietic precursors following storage in the nonfrozen state. *Transplantation* 1983; 36: 341-343.
- DELFORGE A., RONGE-COLLARD E., STRYCKMANS P., et al.: Granulocyte-macrophage progenitor cell preservation at 4°C . *Brit J Haematol* 1983; 53: 49-54.
- PRETI R.A., AHMED T., HELSON L., CIAVARELLA D.: Liquid storage of bone marrow as an alternative to short-term cryopreservation for in vitro manipulation. *Asco Proceedings* 1991; 10: 286 (Abstract 999).
- MCELWAIN T.J., HEDLEY D.W., BURTON G. et al.: Marrow autotransplantation accelerates haematological recovery in patients with malignant melanoma treated with high-dose melphalan. *Brit J Cancer* 1979; 40: 72-80.
- CAREY P.J., PROCTOR S.J., TAYLOR P., et al.: Autologous bone marrow transplantation for high-grade lymphoid malignancy using melphalan/irradiation conditioning without marrow purging or cryopreservation. *Blood* 1991; 77: 1593-1598.
- ROBINSON B., EVANS B.D., HARLAND S.J., SMITH I.E.: Autologous bone marrow rescue is unnecessary after high-dose cyclophosphamide (7 g/m^2) in Mcvie JG, Dalesio O, Smith I.E., editors. *Autologous bone marrow transplantation and solid tumors*. Nova Iorque. Raven Press 1984; 131-135.
- TWELVES C., SOVHAMI R., HARPER P., GOLDSTONE A.: "Hematological recovery following high dose cyclophosphamide with autologous bone marrow transplantation". *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; 25: 213-218.
- ROBINSON W.A., HARTMANN W.D., MANGALICK A., MORTON N., JOSHI J.H.: Autologous non

- frozen bone marrow transplantation after intensive chemotherapy: "A Pilot Study". *Acta Haematol* 1981; 66: 145-153.
17. CUNNINGHAM D., BANHAM S.A., HUTCHEON A.H., et al.: High-dose cyclophosphamide and VP 16 as late dosage intensification therapy for small cell carcinoma of lung. *Cancer Chemother Pharmacol* 1985; 15: 303-306.
 18. CARELLA A.M., SANTINI G., GIORDANO D., et al.: High-dose chemotherapy and non-frozen autologous bone marrow transplantation in relapsed advanced lymphomas or those resistant to conventional chemotherapy. *Cancer* 1984; 54: 2836-2839.
 19. BURNETT A.K., TANSEY P., HILLS C., et al.: Haematological reconstitution following high dose and supralethal chemo-radiotherapy using stored, non-cryopreserved autologous bone marrow. *Brit J Haematol* 1983; 54: 309-316.
 20. GARTNER S., KAPLAN H.: Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1980; 77: 4756-4759.
 21. COULOMBEL L., EAVES C., KALOUSEK D., GUPTA C., EAVES A.: Long-term marrow culture of cells from patients with acute myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 1985; 75: 961-969.
 22. COULOMBEL L., KALOUSEK D.K., EAVES C.J., GUPTA C.M., EAVES A.C.: Long-term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patients with Philadelphia chromosome-positive myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 1983; 308: 1493-1498.
 23. COUTINHO L.H., WILL A., RADFORD J., SCHIRÓ R., TESTA N.G., DEXTER T.M.: Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (CSF), human long-term bone marrow culture. *Blood* 1990; 75: 2118-2119.
 24. COUTINHO L.H., TESTA N.G., CHANG J., MONGENSTERN G., HARRISON C., DEXTER T.M.: The use of cultured bone marrow cells in autologous transplantation. In Gross S, Gee AP Worthington-White DA, editors. *Bone marrow purging and processing*. Nova Iorque Wiley-Liss 1990; 416-433.
 25. CHANG J., MORGENSTERN G.R., COUTINHO L.H., et al.: The use of bone marrow cells grown in long-term culture for autologous bone marrow transplantation in acute myeloid leukaemia, An Update. *Bone Marrow Transplantation* 1989; 4: 5-9.
 26. BARNETT M.J., EAVES C.J., PHILLIPS G.L., et al.: Successful autografting in chronic myeloid leukaemia after maintenance of marrow in culture. *Bone Marrow Transplantation* 1989; 4: 345-352.
 27. LOPEZ M., ANDREU G., BEAUJEAN F., EHRSAM A., GEROTA J., HERVÉ P.: Human bone marrow processing in view of further in vitro treatment and cryopreservation. *Revue Française de Transfusion et Immuno-Hematologie* 1985; 28: 411-426.
 28. LANORE J.J., QUARRE M.C., AUDIBERT G., et al.: Acute renal failure following transfusion of accidentally frozen autologous red blood cells. *Vox Sang* 1989; 56: 293.
 29. SCHAEFER U.W.: Preservation of bone marrow for transplantation in, Van Bekkum DW, Lowenberg B, editors. *Bone Marrow Transplantation*. Hematology vol. 3 Nova Iorque. Marcel Dekker 1985; 513-538.
 30. WARKENTIN P.I., HILDEN J.M., KERSEY J.M., RAMSAY N.K., MCCULLOUGH J.: Transplantation of major ABO-incompatible bone marrow depleted of red cells by hydroxyethyl starch. *Vox Sang* 1985; 48: 89-104.
 31. GULATI S.C., YAHALOM J., WHITMARSH K., CLARKSON B.D., GEE T.: Factors affecting the outcome of autologous bone marrow transplantation. *Ann Oncol* 1991; 2 (Supp 1): 51-55.
 32. GILMORE M.J.M.L., PRENTICE H.G., CORRINGHAM R.E., BLACKLOCK H.A., HOFFBRAND A.V.: A technique for the concentration of nucleated bone marrow cells for in vitro manipulation or cryopreservation using the IBM 2991 blood cell processor. *Vox Sang* 1983; 45: 293-302.
 33. WELLS J.R., SULLIVAN A., CLINE M.J.: A technique for the separation and cryopreservation of myeloid stem cells from human bone marrow. *Cryobiology* 1979; 16: 201-210.
 34. DE WITTE T., VAN DEN OUWELAND F., RAYMAKERS R., et al.: Cryopreservation and reinfusion of autologous bone marrow enriched for clonogenic stem cells by discontinuous cell centrifugation. *Neth J Med* 1983; 26: 67-73.
 35. FARADJÍ A., ANDREU G., PILLIER-LORLETTE C., et al.: Separation of mononuclear bone marrow cells using the cobe 2997 blood cell separator. *Vox Sang* 1988; 55: 133-138.
 36. VAN DE OUWELAND F., DE WITTE T., GEERDINK P., et al.: Enrichement and cryopreservation of bone marrow progenitor cells for autologous reinfusion. *Cryobiology* 1982; 19: 292-298.
 37. TAVARES A., PIMENTEL P., JUNCAL C., GALVÃO M., LACERDA J.M.F.: Incompatibilidade ABO em transplantação de medula óssea — experiência do Hospital de Santa Maria In Livro de Resumos do I Congresso Português de Imuno-hemoterapia 1990; 28 de Novembro a 1 de Dezembro, Coimbra.
 38. ROWE A.W.: Biochemical aspects of cryoprotective agents in freezing and thawing. *Cryobiology* 1966; 3: 12-18.
 39. DOUAY L., GORIN N.C., DAVID R., et al.: Study of granulocyte-macrophage progenitor (CFUc) preservation after slow freezing of bone marrow in the gas phase of liquid nitrogen. *Exp Haematol* 1982; 10: 360-366.
 40. ZULIAN G.B., SELBY P., MILAN S., et al.: High-dose melphalan, BCNU and etoposide with autologous bone marrow transplantation for Hodgkin's disease. *Br J Cancer* 1989; 59: 631-635.
 41. VENTURA G.J., BARLOGIE B., HESTER J.P., et al.: High dose cyclophosphamide BCNU and VP-16 with autologous blood stem cell support for refractory multiple myeloma. *Bone Marrow Transplantation* 1990; 5: 265-268.
 42. PARKER L.M., BINDER N., GELMAN R., RICHMAN C.M., WEINER R.S., YANKEE R.A.: Prolonged cryopreservation of human bone marrow. *Transplantation* 1981; 31: 454-457.
 43. LINCH D.C., KNOTT L.J., PATTERSON K.G., COWAN D.A., HARPER P.G.: Bone marrow processing and cryopreservation. *J Clin Pathol* 1982; 35: 186-190.
 44. STIFF P.J., KOESTER A.R., WEIDNER M.K., DVORAK K., FISHER R.I.: Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing. *Blood* 1987; 70: 974-978.
 45. CLARK J. PATI A., MCCARTHY D.: Successful cryopreservation of human bone marrow does not require a controlled-rate freezer. *Bone Marrow Transplantation* 1991; 7: 121-125.
 46. NISKANEN E., PIRSCH G.: Effect of cooling rate on human and murine hemopoietic precursor cell recovery. *Cryobiology* 1983; 20: 401-406.
 47. GORIN N.C., DOUAY L., DAVID R., et al.: Delayed kinetics of recovery of haemopoiesis following autologous bone marrow transplantation. The role of excessively rapid marrow freezing rates after the release of fusion heat. *Eur J Cancer Oncol* 1983; 19: 485-491.
 48. TURNER A.R., MCGANN L.E., ALLALUNIS M.J., et al.: Optimum cooling and warming rates for the cryopreservation of autologous hematopoietic stem cells. *Asco proceedings* 1980; 440 (Abstract C-478).
 49. SPITZER G., DICKE K., LITAM , et al.: High-dose combination chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in adult solid tumors. *Cancer* 1980; 45: 3075-3085.
 50. WEINER R.S., RICHMAN C.M., YANKEE R.A.: Dilution techniques for optimum recovery of cryopreserved bone marrow cells. *Exp Hematol* 1979; 7 (Supp 5): 1-6.
 51. RAGAB A.H., GILKERSON E., MYERS M.: Factors in the cryopreservation of bone marrow cells from chil-

- dren with acute lymphocytic leukemia. *Cryobiology* 1977; 14: 125-134.
52. APPELBAUM F.R., HERZING G.P., ZIEGLER J.L., et al.: Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood* 1978; 58: 985-995.
 53. DAVIS J.M., ROWLEY S.D., BRAINE H.G., PIANTADOSI S., SANTOS G.: Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. *Blood* 1990; 75: 781-786.
 54. BURGER J., GILMORE M.J., JACKSON B., PRENTICE H.G.: Acute haemoglobinaemia associated with the reinfusion of bone marrow buffy coat for autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* (letter) 1991; 7: 322-324.
 55. YELLOWLESS P., GRENFIELD C., MCINTYRE N.: Dimethylsulfoxide induced toxicity. *Lancet* 1980; ii: 1004-1006.
 56. PIMENTEL P., COSTA F.S.L., TAVARES A., et al.: Autotransplantação de medula óssea (ATMO) — toxicidade aguda e resultados preliminares Livro de Resumos do III Congresso Ibero-Americano de Oncologia 1991; 18 a 22 de Junho, Porto: 64 (Resumo 218).
 57. AREMAN E.M., SACHER R.A., DEEG H.J.: Processing and storage of human bone marrow a survey of current practices in North America. *Bone Marrow Transplantation* 1990; 6: 203-209.
 58. FOUILLARD L., AIRD W.C., ANTIN J.H. GORIN N.C.: Long-term cryopreservation of bone marrow 17th annual EBMT meeting Abstract Book 1991; 23-31 January Cortina d'Ampezzo Abstract 365.
 59. HARTMANN O., BEAUJEAN F., BAYET S., et al.: Hematopoietic recovery following autologous bone marrow transplantation role of cryopreservation, number of cells infused and nature of high-dose chemotherapy. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985; 21: 53-60.
 60. EMMINGER W., EMMINGER-SCHIDMEIER W., HOCKER P., HINTERBERG W., GADNER H.: Myeloid progenitor cells (CFU-GM) predict engraftment kinetics in autologous transplantation in children. *Bone Marrow Transplantation* 1989; 4: 415-420.
 61. STEWART F.M., KAISER D.L., ISHITANI K.P., et al.: Progenitor cell numbers (CFU-GM, CFU-D and CFU-Mix) and hemopoietic recovery following autologous marrow transplantation. *Exp Hematol* 1989; 17: 974-980.
 62. MESSNER H.A., FAUSER A.A.: Culture studies of human pluripotent hemopoietic progenitors. *Blut* 1980; 41: 327-333.
 63. PIKE B.L., ROBINSON W.: Human bone marrow growth in agar-gel. *J Cell Physiol* 1970; 76: 77-84.
 64. GRANDE M., BERTHIER R., HOLLARD D.: Frozen human bone marrow from normal individuals: A possible control for the culture of human bone marrow in agar. *Exp Hematol* 1977; 5: 436-442.
 65. ODAVIC R., BLOM J., HARRISSON C., MINI R.L., KONWALINKA G., WAGNER H.P.: Standardization of a CFU-C Assay by the use of human cryopreserved mononuclear blood and bone marrow cells. *Stem Cells* 1982; 2: 296-307.
 66. MICK R., WILLIAMS S.F., BITRAN J.D.: Patients at increased risk for late engraftment after transplantation. A novel method for their identification. *Bone Marrow Transplantation* 1990; 6: 185-191.
 67. SPITZER G., VERMA D.S., FISHER R., et al.: The myeloid progenitor cell-Its value in predicting hematopoietic recovery after autologous bone marrow transplantation. *Blood* 1980; 55: 317-323.
 68. TRIA TIRONA M.R., ELEY J.W., OLSON A.C., VOGLER W.R.: Correlation of marrow progenitor cell with hematopoietic recovery following autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Asco Proceedings* 1990; 9: 13 (Abstract 43).
 69. ROWLEY S.D., ZUEHLSDORF M., BRAINE H.G., et al.: CFU-GM content of bone marrow graft correlates with time to hematologic reconstitution following autologous bone marrow transplantation with 4-hydroperoxycyclophosphamide-purged bone marrow. *Blood* 1987; 70: 271-275.
 70. BRANDWEIN J.M., CALLUM J., SUTCLIFFE S.B. et al.: Analysis of factors affecting hematopoietic recovery after autologous bone marrow transplantation for lymphoma. *Bone Marrow Transplantation* 1990; 6: 291-294.
 71. VISANI G., DINOTA A., VERLICCHI F., et al.: Autologous bone marrow transplantation in patients with non-hodgkin's lymphoma: Comparison of different parameters in predicting the kinetics of hematological recovery. *Bone Marrow Transplantation* 1988; 3: 599-605.
 72. ATKINSON K., NORRIE S., CHAN P., DOWNS K., BIGGS J.: Lack of correlation between nucleated bone marrow cell dose, marrow CFU-GM dose or marrow CFU-E dose and the rate of HLA-identical sibling marrow engraftment. *Brit J Haematol* 1985; 60: 245-251.
 73. SIENA S., BREGNI M., BRANDO B., et al.: Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood* 1991; 77: 400-409.
 74. DOUAY L., LOPEZ M., GORIN N.C.: A technical bias: Differences in cooling rates prevent ampoules from being a reliable index of stem cell cryopreservation in large volume. *Cryobiology* 1986; 23: 296-301.
 75. MYERS C.D., KATZ F.E., JOSHI G., MILLAR J.L.: A cell line secreting stimulating factors for CFU-GEMM culture. *Blood* 1984; 64: 152-155.
 76. HERVÉ P., CANH J.Y.: Ex vivo conditioning chemotherapy for autologous bone marrow transplantation. *Baillière's Clin Haematol* 1991; 4: 223-246.
 77. ANDERSON K.C., NADLER L.M., TAKVORIAN T., et al.: Monoclonal antibodies: Their use in bone marrow transplantation. *Progress in Hematology* 1987; XV: 137-181.
 78. HAGENBEEK A., MERTENS A.C., SCHULTZ F.W.: The chance that leukemic cells in autologous marrow grafts contribute to a leukemia relapse after bone marrow transplantation is negligible. *Blood* 1988; 72 (supp. 1): 390a.
 79. ALESSANDRINO E.P., BERNASCONI P., LAZZARINO M., et al.: Cryopreservation of marrow cells for ABMT. Is there any effect on the harvested leukemia cells? *Bone Marrow Transplantation* 1989; 4 (supp. 4): 81-84.
 80. ALLIERI M.A., LOPEZ M., DOUAY L., MARY J.Y., NGUYEN L., GORIN N.C.: Clonogenic leukemia progenitor cells in acute leukemia are highly sensitive to cryopreservation: Possible purging effect for autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1991; 7: 101-105.
 81. MORYAMA Y., NIKKUNI K., SAITO H., et al.: In vitro sensitivity of human hematopoietic progenitor cells to hyperthermia: Critical temperature for cells to survive and its application to in vitro purging. *Bone Marrow Transplantation* 1990; 6: 243-246.
- Pedido de Separatas:
 Fernando S. Leal da Costa
 Unidade de Transplantação de Medula Óssea
 Hospital de Santa Maria
 1600 Lisboa