

Intraoperative autologous blood recovery in prostate cancer surgery: *in vivo* validation using a tumour marker

M. Poli,¹ A. Camargo,² L. Villa,² R. Moura,² R. Colella¹ & D. Deheinzelin³

¹Banco de Sangue de São Paulo and Blood Transfusion Department at Hospital do Câncer – AC Camargo, São Paulo, Brazil

²Ludwig Institute for Cancer Research, Hospital Alemão Oswaldo Cruz, São Paulo, Brazil

³Chest Department at Hospital Sirio Libanês, São Paulo, Brazil

Vox Sanguinis

Background and Objective Intraoperative autologous blood recovery during radical retro pubic prostatectomy has the potential of contamination with tumour cells. Its safety is proved by similar survival rates between allogeneic and autologous transfusion to oncology patients without standardization. Silencing of the gene encoding pi class of glutathione-S transferase is a specific and sensitive molecular marker for prostate cancer, because it is present in more than 90% of prostate tumours. Using such tumour marker, we aimed to demonstrate that viable tumour cells could be eliminated using leucodepletion filters followed by irradiation.

Materials and Methods Fifty patients with pi class of glutathione-S transferase promoter hypermethylation in their primary prostate tumours were included in the analysis. Peripheral blood samples were collected during anaesthetic induction and recovered blood was collected throughout the surgery and then submitted to washing, leucoreduction and irradiation. Samples were analysed stepwise for the presence of promoter hypermethylation using real-time methylation-specific polymerase chain reaction.

Results Positive hypermethylation was found in recovered blood (two samples), recovered and washed blood (three samples), and recovered washed and filtered blood (two samples). After filtration and irradiation of the recovered blood, this marker could not be detected in any of the cases analysed, suggesting the absence of viable tumour cells.

Conclusion Even though the risk of disseminating tumour cells in prostate cancer surgery by intraoperative autologous blood recovery is not yet fully established, no tumour-specific gene amplification was found after the association of blood filtration and irradiation, suggesting a significant reduction of such risk.

Key words: autologous blood, cancer surgery, transfusion practices.

Received: 29 April 2008,
revised 30 July 2008,
accepted 1 September 2008

Introduction

Autologous blood transfusion avoids the adverse reactions associated with allogeneic transfusion. Intraoperative autologous blood recovery (IABR) is an attractive blood management strategy, as it is relatively inexpensive.

Moreover, different from pre-deposit strategies for autologous transfusions, presence of anaemia is not a contraindication for cancer patients. In addition to well-known complications of allogeneic blood, some data suggested that the quality of own washed blood obtained is better than a stored allogeneic unit [1]. However, there is a theoretical risk of metastasis following IABR, since the dispersal of tumour cells in the surgical field was described [2]. Nevertheless, white blood cell-depletion filters [3] or irradiation [4] was shown to be effective at removing tumour cell contamination. In the clinical ground, the safety of this procedure for tumour

Correspondence: Mônica C. C. Poli, MD, PhD, Banco de Sangue de São Paulo Avenida Ceci, 2001-apto 41, 04065-004 – São Paulo, SP, Brazil
E-mail: mccpoli@bssp.com.br

surgeries was evaluated only in retrospective studies, although with short follow-up periods [5,6]. Moreover, oncology patients were submitted to IABR without standardization in terms of the use of leucodepletion filters, irradiation, neither or both.

We have previously simulated the recovery of tumour cells from salvaged blood by adding known quantities of cultured tumour cells to blood bags. After saline washing, leucoreduction and irradiation, cell and DNA viability were determined. Failure to detect the ubiquitous β -globin gene by polymerase chain reaction (PCR) following leucoreduction and irradiation suggested that tumour cells had been removed from the blood samples [7]. To confirm this hypothesis and address experimental limitations of using cell lines, we determined to validate our findings by using tumour cells obtained by intraoperative recovery and a tumour-specific molecular marker [8].

Radical retro pubic prostatectomy (RRP) for prostate cancer is associated with blood loss up to 1500 ml determined by several factors [5,9]. Given the blood loss, transfusions are often required. Hypermethylation of the pi-class glutathione-S transferase (*GSTP-1*) gene promoter is the most frequent somatic alteration occurring during prostate cancer development, occurs at a high frequency (90–96%) in prostate tumours and is highly specific for the presence of tumour as it is not typically present in normal prostatic tissue [10]. *GSTP-1* promoter hypermethylation can be detected in a highly sensitive and reproducible manner using real-time methylation-specific PCR (MS-PCR), and able to detect a single methylated allele in 10 000 unmethylated alleles [11].

In the present work, the quantitative detection of *GSTP-1* promoter hypermethylation indirectly assessed the presence of tumour cells in IABR during RRP. Recovered blood was submitted to white blood cell-depletion filters, followed by irradiation and at each step detection of *GSTP-1* was applied as a surrogate of the presence of viable tumour cells and, therefore, risk of dissemination in prostate cancer surgery.

Materials and methods

Patients

The study included patients with localized prostate cancer who underwent RRP with simultaneous bilateral pelvic lymphadenectomy, at the Urology Division of the Pelvic Surgery Department of the Hospital do Cancer/AC Camargo, São Paulo, Brazil, between May and October 2006. Samples were collected after explicit informed consent and the study was reviewed and approved by the institution's ethics committee. At the time of surgery, tumour specimens were 'snap frozen' and submitted to histological examination to confirm the presence of tumour. Only patients with *GSTP-1*

hypermethylation in the primary tumour were considered for further analysis.

Intraoperative autologous blood recovery was performed in a Compact A® (Dideco, Mirandola, Italy) device and the recovered blood was submitted to 1000 ml saline washing. In accordance with Brazilian legislation, the recovered blood was not reinfused [12].

Blood samples (20 ml) from each patient were collected at five time-points during surgery and blood recovery: (i) whole blood during anaesthetic induction; (ii) recovered blood from the intraoperative field; (iii) recovered blood from the intraoperative field after washing; (iv) recovered blood from the intraoperative field after washing and filtration (Leukotrap® RC, Pall Medical, East Hill, NY, USA or TLR®, Pall Medical Lakewood, CO, USA), and (v) recovered blood from the intraoperative field after washing, filtration and irradiation with 25 Gy radiation (Gammacell 3000®, Nordion, Ontario, Canada). Nucleated cells in the blood samples were concentrated by density gradient centrifugation (Ficoll-Paque Plus™ Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) and frozen until DNA extraction was performed.

DNA extraction and bisulphite conversion

DNA from primary tumours and blood samples was isolated by digestion with 100 µg/ml proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) followed by standard phenol–chloroform (1 : 1) extraction and ethanol precipitation. DNA was subjected to sodium bisulphite treatment to modify unmethylated cytosine to uracil. Briefly, 0.3 M sodium hydroxide (NaOH) was added to denature DNA and incubated for 20 min at 50°C. A volume of 500 µl of freshly made bisulphite solution (2.5 M sodium metabisulfite and 125 mM hydroquinone, pH 5.0) was added to each sample and incubation was continued at 70°C for 3 h. Modified DNA was purified using Wizard DNA purification resin (Promega Corp., Madison, WI, USA) [13], according to manufacturer's recommendations and eluted in 45 µl water at 80°C. After treatment with 0.3 M NaOH for 10 min at room temperature, DNA was precipitated in the presence of 0.5 M ammonium acetate, 2.5 volumes of 100% ethanol and 10 µg of glycogen. After precipitation, the DNA was recovered by centrifugation, washed with 70% ethanol, and resuspended in 20 µl Tris-EDTA solution.

Real-time methylation-specific polymerase chain reaction

Bisulphite converted DNA was amplified by fluorescence-based real-time methylation-specific PCR in an Applied Biosystems ABI 7300® (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA). Fluorogenic probes and primers were synthesized by IDT Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA, USA). The primers were

Table 1 Presurgical clinical characteristics of 15 patients^a undergoing radical retro pubic prostatectomy

Patient identification	Age (years)	Prostate-specific antigen (ng/ml)	Biopsy Gleason score	Recovered blood (ml)
1 ^b	58	6.3	8	700
2	73	21.8	6	800
3 ^b	59	3.7	6	200
4	66	2.9	6	400
5	52	5.6	6	800
6	64	23.7	7	200
7	60	8.5	7	1000
8	62	7.1	6	700
9	47	6.1	6	200
10	41	78.8	9	400
11	63	5.6	7	200
12	61	3.7	7	400
13	68	4.2	6	400
14	71	5.4	7	200
15	75	4.6	7	1300
Mean (min–max)	61.3 (41–75)	12.8 (2.9–78.8)		526.6 (200–1300)
Standard deviation	9.3	20.0		
Median	62	5.6		400

^a*GSTP-1* promoter hypermethylation was positive in tumour samples.

^bBiochemical recurrence.

designed to amplify bisulphite-converted DNA at the 5' end of *GSTP-1* and the β -actin internal reference gene (*ACTB*). Primers and probes for the *ACTB* gene were located in an area without CpG dinucleotides, thus, allowing gene amplification independent of methylation status. The primer and probe sequences were *GSTP-1* (140 base pairs amplicon, GenBank accession M24485, position 1033–1172), 5'-AGTTGCGCG-GCGATTC-3' (sense), 6FAM-5'-CGGTCGACGTTCCGGGGTG-TAGCG-3'-TAMRA (probe) and 5'-GCCCCAATACTaaatcacgacg-3' (antisense) and *ACTB* (133 base pairs amplicon, GenBank accession Y00474, position 390–522), 5'-TGGTGATGGAG-GAGGTTTAGTAAGT-3' (sense), 6FAM-5'-CCACCACCAACAC-ACAATAACAAACACA-3'-TAMRA (probe) and 5'-AACCAATAA-AACCTACTCCTCCCTTAA-3' (antisense) [14].

The final PCR mixture consisted of 600 nM of each primer; 400 nM of probe; 1 U of Platinum Taq DNA polymerase; 1.25 mM deoxynucleoside triphosphates; 1.5 mM MgCl₂; Rox Reference Dye and 3 μ l bisulphite converted DNA, in a reaction volume of 25 μ l. PCR was performed at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 min. All samples were run in duplicate. Leucocyte DNA treated *in vitro* with SssI Methyltransferase (New England Biolabs, Inc, Beverly, MA, USA) to methylate DNA at all CpGs served as the positive amplification. Serial dilutions of this methylated DNA (90, 9, 0.9, 0.09 and 0.009 ng) were used to construct a standard curve. These values are equivalent to 10 000, 1000, 100, 10 and 1 cell,

respectively, considering a conversion factor of 9 pg DNA per diploid cell.

Results

The range of the recovered blood was 200–1300 ml until the bladder opening, with no differences between surgical staffs. Adenocarcinoma was detected in 18 fresh samples at surgery and 15 patients (83.3%) showed *GSTP-1* promoter hypermethylation in tumour specimens. Clinical characteristics of the 15 patients included are described in Table 1. Two patients (13.3%) were transfused in operating room with allogeneic red blood cells.

According to the study design, real-time PCR independently analysed 75 blood samples for *GSTP-1* and *ACTB*, in five plates, with a standard curve for both genes in each plate. Table 2 depicts the detection of positive promoter hypermethylation for *GSTP-1* in the blood tested. Five patients (33.3%) presented at least one positive sample in the following steps: recovered, recovered and washed, or washed and filtered blood. Interestingly, in patients 10 and 11 another type of leucodepletion filter was used and these were the patients with positive results in the filtered samples. All samples submitted to irradiation were negative for *GSTP-1* promoter hypermethylation, while positive for the control gene. There was no relation with the aspirated blood volume (positive 480 \pm 217 ml \times negative 550 \pm 398 ml, $P = 0.7$)

Table 2 Real-time methylation-specific-polymerase chain reaction (MS-PCR) results from patient's blood taken during radical retro pubic prostatectomy (RRP) and submitted to intraoperative autologous blood recovery

Patient/sample Identification	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5	
	ACTB	GSTP	ACTB	GSTP	ACTB	GSTP	ACTB	GSTP	ACTB	GSTP
1 ^a	5+	0	3+	0	4+	+	+	0	4+	0
2	4+	0	3+	0	3+	0	+	0	+	0
3 ^a	3+	0	3+	0	4+	0	4+	0	4+	0
4	2+	0	+	0	2+	0	+	0	+	0
5	+	0	+	0	2+	0	+	0	+	0
6	2+	0	+	0	2+	0	+	0	+	0
7	+	0	+	0	2+	0	+	0	+	0
8	2+	0	+	0	2+	+	+	0	+	0
9	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0
10	4+	0	4+	0	4+	2+	2+	2+	2+	0
11	4+	0	4+	2+	4+	0	2+	2+	2+	0
12	4+	0	4+	4+	4+	0	3+	0	+	0
13	3+	0	3+	0	2+	0	+	0	+	0
14	3+	0	3+	0	3+	0	+	0	+	0
15	3+	0	3+	0	4+	0	+	0	+	0

^aBiochemical recurrence.

Samples 1, whole blood during anaesthetic induction; sample 2, recovered blood from intraoperative field; sample 3, recovered blood from intraoperative field after washing; sample 4, recovered blood from intraoperative field after washing and filtration; sample 5, recovered blood from intraoperative field after washing; filtration and irradiation.

Representation of DNA amplification results in equivalent cells as follows: 0, undetected; +, 1–10 cells; 2+, 10–100 cells; 3+, 100–1000 cells; 4+, 1000–10 000 cells, and 5+, more than 10 000 cells. The quantification of blood sample DNA was calculated from a standard curve generated from each PCR plate.

and prostate-specific antigen level (Positive 6.3 ng/ml 3.7–78.8 × Negative 5.5 ng/ml 2.9–23.7, $P = 0.53$). Patients with *GSTP1* promoter hypermethylation in recovered blood samples had a significantly higher biopsy Gleason score (Positive 7.4 ± 1.1 × Negative 6.4 ± 0.5, $P = 0.03$).

Discussion

Previous clinical studies indirectly estimated the presence of contaminating cancer cells in IABR using disease free survival of prostate cancer patients as a surrogate [5,6,15]. These clinical studies are limited by a short follow up. It is known that 63–79% of patients submitted to radical prostatectomy remain disease free over 10 years, depending on the definition of biochemical recurrence [16]. In a prospective study using prostate-specific antigen reverse transcriptase-PCR assays, the majority of the recovered blood samples were positive, but peripheral blood samples 3–5 weeks after surgery were all negative, and again short follow-up disclosed no recurrence differences between reinfused or patients [17]. Nonetheless, this assay, unlike the use of a tumour-specific marker such as *GSTP-1* promoter hypermethylation, is unable to discriminate normal cells from prostate tumour cells [18]. Also, patients with positive *GSTP-1* hypermethylated DNA

in the recovered blood, suggestive of tumour cells contamination, had a significant higher Gleason score. This finding is in accordance with data that disclosed a significant correlation between the methylation profile and clinical features of poor prognosis [19].

Using a high-sensitive method and a very specific marker, we have shown that samples of IABR are freed from contaminating tumour cells only after filtration and irradiation. In fact, even after filtration, we were able to detect *GSTP-1* promoter hypermethylation pending on the type of filter utilized. However, comparisons on filter efficiency are premature at this point and should be avoided, as the method adopted in the present study is unsuited for quantitative filter testing and characterization. Further studies are required to assess the impact in clinical settings, as the mechanism of removing tumour cells has not yet been reported, but it may be similar to the mechanism of leucocyte reduction. Besides the filter's physical properties, filtration is influenced by process parameters and characteristics of the component to be filtered and, therefore, the optimal filtration strategy remains to be determined [20]. Therefore, the association between appropriate leucocyte filter and such irradiation doses could reduce greatly the quantity of viable cancer cells. In terms of irradiation, our recommended dose is 25 Gy that

was sufficient to eliminate viable prostate tumour cell as shown the positive control of *ACTB* which not depends of methylation.

Another interesting observation was the lack of tumour cells in washed blood of patients 11 and 12, suggesting a potential role of washing in eliminating tumour cells. However, for patient 11, viable tumour cells were detected after washing and filtration and it is more likely that the lack of detection of tumour cells in washed blood is related to sample dilution and sensibility limit of our detection method. High dose irradiation has been suggested as a fundamental procedure to eliminate tumour cells from IABR [4,7]. However, these previous results were based on methodologies with non-specific markers [4,7], and the association of leucodepletion filters and 25-Gy radiation was not to be described before *in vivo*. Using a specific tumour marker and a robust PCR assay, we were unable to detect viable contaminating cells in the recovered blood only after irradiation. In summary, no tumour-specific gene amplification was found in samples obtained by IABR in a surgical setting. The association between leucocyte filter and irradiation suggests a significant reduction of tumour cell dissemination risk and was validated using a specific marker as previously aimed [8].

References

- Waters JR, Meier HH, Waters JH: An economic analysis of costs associated with development of a cell salvage program. *Anesth Analg* 2007; 104:869–875
- Yaw PB, Sentany M, Link WJ, Wahle WM, Glover JL: Tumor cells carried through autotransfusion. Contraindication to intraoperative blood recovery? *JAMA* 1975; 231:490–491
- Waters JH: Indications and contraindications of cell salvage. *Transfusion* 2004; 44:40S–44S
- Hansen E, Bechmann V, Altmeppen J: Intraoperative blood salvage in cancer surgery: safe and effective? *Transfus Apher Sci* 2002; 27:153–157
- Neider AM, Carmack AJK, Sved PD, Kim SS, Manoharan M, Soloway MS: Intraoperative cell salvage during radical prostatectomy is not associated with greater biochemical recurrence rate. *Urology* 2005; 65:730–734
- Davis M, Sofer M, Gomez-Marin O, Bruck D, Soloway MS: The use of cell salvage during radical retropubic prostatectomy: does it influence cancer recurrence? *BJU Int* 2003; 91:474–476
- Poli MCC, Villa LL, Colella R, Deheinzelin D: Molecular evidence of tumour cell removal from salvaged blood after irradiation and leucocyte depletion. *Transfus Med* 2004; 14:151–155
- Poli MCC, Villa LL, Colella R, Deheinzelin D: Molecular evidence of tumour cell removal from salvaged blood after irradiation and leucocyte depletion – the search must go on. *Transfus Med* 2006; 16:215–216
- Dash A, Dunn RL, Resh J, Wei JT, Montie JE, Sanda MG: Patient, surgeon, and treatment characteristics associated with homologous blood transfusion requirement during radical retropubic prostatectomy: multivariate nomogram to assist patient counseling. *Urology* 2004; 64:117–122
- Hopkins TG, Burns PA, Routledge MN: DNA methylation of *GSTP-1* as biomarker in diagnosis of prostate cancer. *Urology* 2007; 69:11–16
- Esteller M: CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002; 21:5427–5440
- Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004, ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. D.O.U. – Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 24 de junho de 2004, Brazil; available at http://www.anvisa.gov.br/sangue/legis/sangue_componentes.htm#resolucoes
- Goldenberg D, Harden S, Masayeva BG, Ha P, Benoit N, Westra WH, Koch WM, Sidransky D, Califano JA: Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130:39–44
- Harden SV, Guo Z, Epstein JI, Sidransky D: Quantitative GSTP1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma. *J Urol* 2003; 169:1138–1142
- Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Virmani AK, Zöchbauer-Müller S, Farinas AJ, Minna JD, McConnell J, Frenkel EP, Gazdar AF: Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 2002; 8:514–519
- Gray CL, Amling CL, Polston GR, Powell CR, Kane CJ: Intraoperative cell salvage in radical retropubic prostatectomy. *Urology* 2001; 58:740–745
- Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham JA, Dotan ZA, Bianco JF, Jr, Lilja H, Scardino PT: Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. *J Clin Oncol* 2006; 24:3973–3978
- Stoffel JT, Topjian L, Libertino JA: Analysis of peripheral blood for prostate cells after autologous transfusion given during radical prostatectomy. *BJU Int* 2005; 96:313–315
- Schamhart DH, Maiazza R, Kurth KH: Identification of circulating prostate cancer cells: a challenge to the clinical implementation of molecular biology (review). *Int J Oncol* 2005; 26:565–577
- Council of Europe: *Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components*, 11th edn. Strasbourg, Council of Europe Publishing, 2005:68

**RECUPERAÇÃO AUTÓLOGA DE SANGUE
INTRA-OPERATÓRIA: VALIDAÇÃO COM
MARCADOR TUMORAL ESPECÍFICO EM
CÂNCER DE PRÓSTATA**

MÔNICA CAAMAÑO CRISTÓVÃO POLI

**Tese de Doutorado apresentada à Fundação
Antônio Prudente para a obtenção do Grau de
Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr Daniel Deheinzelin

**Co-Orientadoras: Dra Anamaria Aranha
Camargo e Dra Luisa Lina Villa**

**São Paulo
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Poli, Mônica Caamaño

**Recuperação autóloga de sangue intra-operatória: validação com
marcador tumoral específico em câncer de próstata / Mônica**

Caamaño Cristóvão Poli – São Paulo, 2007.

48p.

Tese (doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Daniel Deheinzelin

Descritores: 1. AUTOTRANSFUSÃO. 2. TRANSFUSÃO DE SANGUE
AUTÓLOGO. 3. CÂNCER DE PRÓSTATA/sangue. 4. CÂNCER/cirurgia. 5.
MARCADORES DE TUMOR. 6. GLUTATIONA TRANSFERASE/sangue.

“Pros erros há perdão; pros fracassos, chance; pros amores impossíveis, tempo. De nada adianta cercar um coração vazio ou economizar alma. O romance cujo fim é instantâneo ou indolor não é romance. Não deixe que a saudade o sufoque, que a rotina o acomode, que o medo o impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

Luis Fernando Veríssimo

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antonio e Lourdes; meu esposo Vanderlei e nosso filho Daniel. Minha família pequena, porém, imensa em sua importância, apoio e incentivo.

Ao orientador Dr Daniel, admirável por seu profissionalismo, ética e pelo conhecimento sobre pesquisa científica e principalmente, sobre a vida.

Ao Dr Rafael Colella, Diretor do Banco de Sangue de São Paulo pela oportunidade, amizade e confiança ao longo desses anos.

AGRADECIMENTOS

Dr Daniel agradeço a dedicação, a paciência e o contato com pessoas tão brilhantes quanto ele;

Dra Anamaria pela acolhida em seu laboratório (LMBG), orientação e amizade;

Dra Luisa pelo seu seguimento e constante apoio do Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer (filial São Paulo);

Aos médicos das equipes de pélvis (urologia), anestesia e anatomia patológica, pela ajuda, compreensão e incentivo durante as cirurgias;

Aos amigos do LMBG pelo aprendizado diário prático e teórico das reuniões semanais. Valéria que me ensinou a extrair DNA e Ricardo que guiou meus passos no PCR em tempo real. Confesso que já estou com muitas saudades de tudo e de todos;

Aos médicos e funcionários do Banco de Sangue de São Paulo e do Hospital A C Camargo pela colaboração em dias de intenso trabalho, enquanto eu realizava meus experimentos;

Aos fornecedores da CEI/PALL e Dideco, agradeço a gentileza do fornecimento dos filtros e dos kits, respectivamente;

A Suely, grande amiga da Biblioteca, pela dedicação e disponibilidade constantes;

Dr Luiz Fernando, Aninha e Luciana (Pós-Graduação) pelo cuidado e carinho dispensados aos alunos;

Finalmente, porém, não menos importante, a todos os pacientes que se dispuseram a participar desse estudo:

Obrigada!

RESUMO

Poli MCC. **Recuperação autóloga de sangue intra-operatória: validação com marcador tumoral específico em câncer de próstata.** São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

INTRODUÇÃO: Padrões de metilação aberrante em amostras de DNA de pacientes com câncer são marcadores moleculares sensíveis. A hipermetilação na região promotora de *GSTP-1* está presente em mais de 90% dos pacientes com câncer de próstata e pode ser avaliada através de técnicas de PCR. A recuperação autóloga intra-operatória durante cirurgia oncológica não tem sido recomendada devido ao risco de células tumorais estarem circulantes neste sangue. Nosso objetivo é demonstrar que o sangue recuperado de cirurgia oncológica pode estar livre de células tumorais após a utilização de filtros para remoção de leucócitos e irradiação, através da hipermetilação do promotor de *GSTP-1* como marcador. **MÉTODOS:** Realizamos recuperação autóloga intraoperatória em prostatectomia radical sem a reinfusão do sangue. Somente os casos com hipermetilação do promotor de *GSTP-1* nas amostras de tumor fresco foram incluídas. Uma amostra de sangue periférico foi colhida na indução anestésica. O sangue recuperado foi colhido ao longo da cirurgia e então submetido à lavagem; filtração e irradiação (25 Gy). As amostras foram estudadas em cada etapa para detectar a presença de células de tumor de próstata contaminantes, através de ensaios qualitativos e de “real time” PCR metilação específica. **RESULTADOS:** Detectamos células de tumor de próstata no sangue recuperado através da presença de metilação para *GSTP-1* nos ensaios de PCR qualitativos. Após filtração e irradiação as análises de “real time” PCR confirmaram a ausência de metilação, sugerindo a ausência de células viáveis. **DISCUSSÃO:** Utilizando uma abordagem epigenética não evidenciamos célula tumoral viável ou DNA no sangue recuperado desses pacientes após filtração e irradiação. Esses resultados apontam para a segurança da recuperação de sangue associando filtração e irradiação em cirurgia oncológica.

SUMMARY

Poli MCC. **[Intraoperative Autologous Blood Recovery: validation with a specific tumour marker in prostate cancer]**. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUCTION: Aberrant DNA methylation patterns provide a powerful sensitive detection molecular marker to cancer. *GSTP-1* hypermethylation is present in more than 90% of prostate cancer patients and can be measured by PCR-based techniques. Blood salvage during cancer surgery is limited due to the potential presence of circulating tumour cells. We aimed to show that intraoperative salvaged blood can be freed of tumour cells after leucodepletion filters and irradiation of washed blood using *GSTP-1* hypermethylation as a biomarker. **METHODS:** We performed intraoperative blood recovery in radical prostatectomy without reinfusion. Only cases with *GSTP-1* hypermethylation in the fresh tumour samples were included. A peripheral blood sample was collected during anaesthesia induction. Salvaged blood was collected throughout the surgery and then submitted to washing, leukoreduction and irradiation. Samples were studied stepwise for the presence of prostate tumour cell contamination using qualitative and real-time methylation specific PCR. **RESULTS:** Prostate tumour cells detected by positive results for *GSTP-1* in washed salvaged blood became negative after filtration and irradiation in qualitative PCR. It was confirmed by quantitative assay, thus suggesting the absence of viable cells. **DISCUSSION:** Using an epigenetic approach no tumour viable cell or DNA was found in the salvaged blood of these patients after filtration and irradiation (25Gy). These results point to the safety of blood salvage with filtration and irradiation in cancer surgery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do equipamento Dideco Compact Advanced™.	4
Figura 2	Figura do equipamento Dideco Compact Advanced™ utilizado no Hospital A.C Camargo/São Paulo.	5
Figura 3	Princípio da conversão pelo bissulfito de sódio.	12
Figura 4	Representação da sonda fluorogênica para detecção de um produto específico de PCR.	13
Figura 5	Taxas de mortalidade de câncer no período de 1979 a 2000 e projeção da incidência em 2003.	14
Figura 6	Atrofia inflamatória proliferativa como precursor da neoplasia prostática intraepitelial e câncer de próstata.	17
Figura 7	Perda da atividade de <i>GSTP1</i> em célula prostática e aumentando o dano genômico mediado por carcinógeno.	17
Figura 8	Representação da peça cirúrgica e resultado da análise histológica durante o ato operatório.	21
Figura 9	Desenho do estudo.	22
Figura 10	Halo de células após centrifugação com Ficoll-Paque™.	23
Figura 11	Análise qualitativa do DNA extraído em gel de agarose a 1%.	24
Figura 12	Análise de metilação na região promotora de <i>GSTP-1</i> nos controles positivo e negativo em gel de acrilamida a 8%.	26

Figura 13	Padronização dos pontos da curva padrão para os genes: <i>GSTP-1</i> e <i>ACTB</i> respectivamente, no equipamento ABI 7300 TM .	28
Figura 14	Análise da reação de MSP de onze tumores em gel de acrilamida a 8%.	31
Figura 15	Análise da reação de MSP com amostra A (veia periférica) do paciente 5 em gel de acrilamida a 8%.	32
Figura 16	Análise da reação de MSP com as amostras B (campo operatório) dos pacientes 18 e 19 em gel de acrilamida a 8%.33	
Figura 17	Análise da reação de MSP da mistura de células normais e PC-3 em diluições distintas em gel de acrilamida a 8%.	35
Figura 18	Análise quantitativa para metilação no promotor de <i>GSTP-1</i> na amostra C (campo operatório lavado).	37
Figura 19	Análise quantitativa para metilação no promotor de <i>GSTP-1</i> do paciente 22.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Genes envolvidos na carcinogênese prostática.	16
Tabela 2	Tabela de iniciadores para a região promotora de <i>GSTP-1</i> e suas seqüências.	24
Tabela 3	Tabela de iniciadores e sondas para <i>ACTB</i> e para a região promotora de <i>GSTP-1</i> .	26
Tabela 4	Características clínicas dos 30 pacientes incluídos submetidos à prostatectomia radical durante o período de Maio/2004 a Outubro/2006.	29
Tabela 5	Resultados das análises de MSP das amostras de sangue de 24 pacientes.	33
Tabela 6	Resultados de “real time” PCR metilação específica das amostras de sangue de 15 pacientes submetidos à prostatectomia radical e recuperação autóloga de sangue intra-operatória.	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB	β -actina
CT	cycle threshold
GSTP-1	glutathiona S-transferase Pi
Kb	kilobase
mRNA	RNA mensageiro
MSP	methylation specific PCR
PB	pares de bases
PBS	phosphate buffered saline
PSA	prostatic specific antigen
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
TE	Tris- EDTA

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
1.1	Transfusão de sangue	1
1.2	Recuperação autóloga de sangue intra-operatória (autotransfusão ou <i>cell saver</i>)	2
1.3	Autotransfusão e câncer	5
1.4	Metodologia específica: metilação	8
1.5	Câncer de próstata	13
1.5.1	Inflamação e carcinogênese prostática	15
2	OBJETIVO	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Coleta de amostras de tumor e sangue derivados de Prostatectomia radical com “cell saver”	19
3.2	Preparo e congelamento das amostras	21
3.3	Extração de DNA	22
3.4	Tratamento com bissulfito de sódio	23
3.5	Padronização da reação de MSP	24
3.6	Reação em tempo real de PCR metilação específica	25
3.6.1	Padronização	25
3.6.2	Quantificação Absoluta baseada em curva padrão	26
4	RESULTADOS	28
4.1	Análise descritiva da casuística	28
4.2	Reação de MSP dos tumores	30
4.3	Reação de MSP nas amostras de sangue	31
4.4	Estudo de sensibilidade da reação de MSP	34
4.5	Análise em tempo real de PCR metilação específica	35

5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÃO	44
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

ANEXO

Anexo 1 Artigo submetido na revista Lancet Oncology

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 TRANSFUSÃO DE SANGUE

Apesar do rigor no preparo das transfusões, elas podem causar inúmeros efeitos adversos tais como: transmissão de doença infecciosa; sobrecarga de volume e de ferro; reações imunológicas que se manifestam como hemólise, anafilaxia e urticária; entre outras. Além disso, desde 1973 a observação clínica tem nos demonstrado que a transfusão é responsável por efeitos benéficos e maléficos no sistema imune do paciente. Estes efeitos são atribuídos aos leucócitos do doador, como exemplo, pacientes politransfundidos por doença renal crônica rejeitam menos o rim transplantado, por outro lado, vários trabalhos tentam relacionar o número maior de infecções e recorrência de tumores ao número de transfusões alogênicas recebidas. Segundo VAMVAKAS e BLAJCHMAN (2001) esta síndrome clínica é conhecida como imunomodulação ou TRIM (*transfusion associated immunomodulation*).

Estratégias para reduzir a necessidade de transfusão alogênica associada à cirurgia eletiva incluem técnicas cirúrgicas aprimoradas para minimizar a perda de sangue; agentes hemostáticos para promover a coagulação (aprotinina, ácido aminocapróico e desmopressina); eritropoetina para estimular a produção de hemácias; equipamentos que recuperam o sangue do campo operatório e retornam para o paciente (*“cell saver”*);

técnicas de hemodiluição durante anestesia e a coleta pré-operatória de sangue autólogo. Estas opções diferem em sua eficácia, segurança, conveniência e custo. GRAHAM et al. (2000), investigadores canadenses do Estudo Internacional de Transfusão Peri-operatória avaliaram estas tecnologias nos hospitais do Canadá (exceto a doação de sangue autóloga pré-operatória) com o objetivo de estudarem os fatores que influenciam a sua utilização. Concluíram que a frequência do seu uso foi muito baixa, o que pode ser interpretado como falta de conhecimento sobre a eficácia destas estratégias, ao envolvimento de vários profissionais médicos nos cuidados com o paciente e ao custo. E ainda, existem poucas evidências sobre a eficácia destas tecnologias e parece mais apropriado focar técnicas cirúrgicas cuidadosas, evitar o uso indiscriminado de transfusão e reservar estas estratégias para pacientes com maior risco de receber muitas transfusões ou com dificuldades transfusionais em casos de tipo sanguíneo raro.

1.2 RECUPERAÇÃO AUTÓLOGA DE SANGUE INTRA-OPERATÓRIA (AUTOTRANSFUSÃO OU “CELL SAVER”)

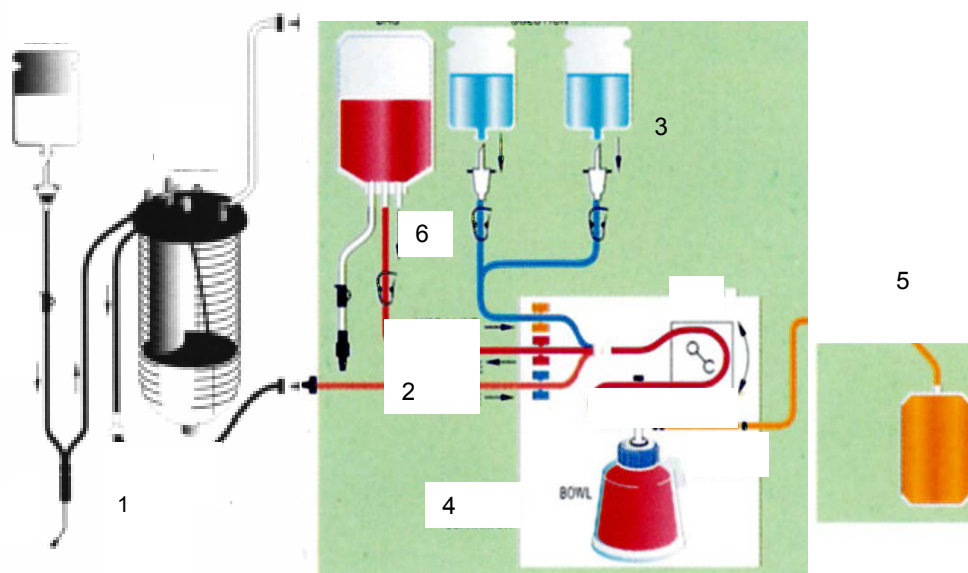
A história da autotransfusão data de 1800 quando Blundell, um médico inglês, experimentou em animais. Embora a técnica tenha sido utilizada em humanos durante um século, a era moderna começou em 1960 a partir de dois métodos: o primeiro utilizado por Klebanoff, causou complicações porque o equipamento não foi suficiente para remover estroma

de hemácias, hemoglobina livre, restos celulares, gordura e fatores de coagulação ativados. O segundo método introduzido por Wilson e Taswell, utilizava um “*bowl*” para separar as hemácias do restante do sangue e lavá-las com solução salina (RUGGERI et al. 2000). Este procedimento é ainda muito utilizado hoje, dispondo de um “*bowl*”, bolsas plásticas e de sangue além de reservatório com filtro para microagregados. Este circuito descartável permite a sua utilização em vários tipos de cirurgias como: cardiovascular, ortopédica, hepatectomias e politraumatismos, conforme esquema abaixo (Figura 1).

As processadoras ou “*cell saver*” utilizadas em nosso hospital em doadores de fígado são semelhantes à figura 2 e operam em fluxo intermitente, através do princípio de centrifugação, para separar as células vermelhas do plasma e da camada leucoplaquetária coletados, seguido de lavagem automática com solução salina. Desta forma, as hemácias são ressuspensas em salina normal transferidas para bolsa de sangue e transfundidas com hematócrito entre 50-55% em um volume aproximado de 200 ml, semelhante a um concentrado de hemácias lavado. Este processo leva 8 a 10 minutos para disponibilizar o sangue para o anestesista durante a cirurgia.

A recuperação intra-operatória tem vantagens e desvantagens quando comparada com alternativas para minimizar a exposição a sangue alogênico. Este procedimento não possui o risco de efeitos adversos de medicações, como anafilaxia associada à aprotinina, além de não apresentar o inconveniente do tempo necessário a pré-doação e o fato da anemia não

impedir a coleta do sangue. Desvantagens da recuperação intra-operatória incluem as recomendações para não reinfundir sangue recuperado suspeito de contaminação bacteriana e/ou de células tumorais, a utilização em anemia falciforme, risco de embolismo aéreo, nefrotoxicidade e desordens da coagulação.



Legenda: 1- conjunto descartável possibilita a montagem parcial do kit, isto é, a aspiração anticoagulada do campo operatório para um reservatório; 2- pinças para as linhas de sangue e soro fisiológico; 3- soro fisiológico 1000 mL; 4- "bowl" semelhante a uma centrífuga com fluxo intermitente; 5- bolsa de descarte do sobrenadante da lavagem e 6- retorno do concentrado de hemácias lavadas para uma bolsa a ser reinfundida durante a cirurgia.

Fonte: Adaptado de RUGGERI (2000).

Figura 1 - Esquema do equipamento DIDECO Compact Advanced™.



Figura 2 - Equipamento DIDECO Compact Advanced™ utilizado no Hospital A C Camargo/São Paulo.

1.3 AUTOTRANSFUSÃO E CÂNCER

Desde o relato de YAW et al. (1975) que identificaram células de adenocarcinoma de pulmão na processadora utilizada para recuperação intra-operatória de sangue autólogo, recomenda-se a não utilização do referido equipamento em campos cirúrgicos com células tumorais. Vinte anos após, HANSEN et al. (1995) analisou uma série de 61 cirurgias oncológicas e encontrou em 57 (93%) células tumorais em quantidades variando de 10 a 10^6 no sangue coletado do campo operatório. Entretanto, estas células tumorais estavam circulando em apenas 21% destes pacientes, utilizando análise de citoqueratina corada pelo nitrato de prata.

Tentativas para a utilização de recuperação autóloga intra-operatória associando leucofiltros em cirurgia oncológica, envolvendo número restrito de pacientes, em análises retrospectivas, não sugerem aumento de incidência de metástases para os pacientes que receberam o sangue recuperado (MILLER et al. 1991, ZULIM et al. 1993). GRAY et al. (2001) realizaram a recuperação autóloga de sangue intra-operatória em 62 pacientes submetidos a prostatectomia radical, comparando com uma coorte que recebeu 1 a 3 unidades de sangue autólogo pré-depósito (101 pacientes) e analisaram sobrevida livre de doença. Não encontraram diferença na progressão bioquímica do câncer de próstata com a utilização de filtros para remoção de leucócitos RC-400. Em estudo prospectivo MUSCARI et al. (2005) analisaram a recorrência de hepatocarcinoma após o seguimento mínimo de 12 meses em 31 pacientes que receberam a reinfusão do sangue recuperado comparando com 16 pacientes que não utilizaram a recuperação autóloga de sangue intraoperatória. Os grupos foram pareados de acordo com o tamanho do tumor e a recorrência foi semelhante (6%).

HANSEN et al. (1999) publicaram um estudo em que não utilizaram leucofiltro, apenas a “*cell saver*” e irradiação com 50Gy. Através de metabolismo de DNA demonstraram a eficácia da eliminação da célula tumoral, baseados na maior oxigenação do sangue recuperado e na dose única de irradiação que impedia os mecanismos de reparo. A partir deste estudo, a recuperação de sangue intra-operatória em pacientes oncológicos vem sendo praticada na Europa, com aproximadamente 700 casos, segundo HANSEN et al. (2002).

Os procedimentos cirúrgicos consomem mais de 40% do estoque de sangue (TORELLA et al. 2001). Considerando a disponibilidade imediata de sangue para a cirurgia aliada aos benefícios do sangue autólogo, a recuperação autóloga de sangue intra-operatória em oncologia tornou-se uma prática na Europa, embora não seja aprovada pelo FDA ou pelas Normas Técnicas Brasileiras de Hemoterapia. Sabemos que muitos pacientes que são submetidos à cirurgia oncológica apresentam células tumorais circulantes, porém esta presença não está correlacionada com a sobrevida. Estima-se que destas células que circulam somente 0,01 a 0,000001% possuem potencial para formar lesões metastáticas (WATERS 2004). Os programas de autotransfusão não excluem o paciente oncológico, isto é, as coletas de sangue autólogo pré-operatórias são realizadas desde que o paciente não possua anemia (níveis de hemoglobina menores do que 11g/dl), apesar da possibilidade de que as células tumorais e, portanto, o DNA estejam circulando. Então a importância da infusão de células tumorais através da recuperação de sangue intraoperatória nestes pacientes deve ser questionada.

Certamente, faltam estudos que provem a isenção do risco de disseminação da célula tumoral neste sangue reinfundido. Baseados em trabalho experimental, demonstramos através de PCR/Multiplex a ausência de células nucleadas e de pequenos fragmentos de DNA (268 pares de base) em amostras artificialmente misturadas a linhagens de tumores sólidos mais freqüentes, simulando um procedimento de recuperação autóloga de sangue durante cirurgia oncológica. Neste estudo, após a utilização de

leucocitos e irradiação na dose de 25 Gy não houve amplificação de produtos para o gene de globina (POLI et al., 2004), nos levando a acreditar que esta associação pode ser praticada, desde que, validada para um marcador tumoral específico (POLI et. al., 2006).

1.4 METODOLOGIA ESPECÍFICA: METILAÇÃO

Desde 1987, a metodologia de PCR pela técnica de transcriptase reversa (RT-PCR) tem sido utilizada para detectar mRNAs de proteínas circulantes originadas de tumores sólidos, por exemplo, tirosinase para melanoma, α -fetoproteína para hepatoma e citoqueratina para câncer de mama (COREY et al. 1997). Poucos marcadores têm valor no diagnóstico de câncer, como α -fetoproteína e gonadotrofina coriônica humana, a maioria tem importância no monitoramento destes pacientes.

A experiência da Universidade de Columbia (KATZ et al. 1996) sugere que a presença de células circulantes que sintetizam PSA (proteína antígeno prostático específica) está relacionada com doença extraprostática do tumor de próstata. Entretanto, a origem biológica e o potencial clínico destas células expressando PSA permanecem incertos. Quando uma célula de câncer de próstata é detectada por ensaio de RT-PCR para PSA, ela deve ter um fenótipo capaz de romper a membrana basal e migrar para a circulação, além de sobreviver neste local. Diferenças técnicas nas amostras de sangue e seu processamento, extração de RNA mensageiro, escolha de

primers, enzimas, número de ciclos e outros fatores têm influenciado a interpretação destes resultados.

As dificuldades na metodologia para avaliar expressão gênica nos direcionaram para a metilação. Este mecanismo epigenético consiste na adição de um radical metil em bases citosina (C) localizadas a 5' de guaninas (G) nos chamados dinucleotídeos CpG. As ilhas de CpG são definidas como uma região do DNA com mais de 200 pares de base. Estima-se que existam 29.000 ilhas de CpG no genoma e aproximadamente 50-60% de todos os genes apresentam uma ilha associada ao seu promotor (CLARK e MELKI 2002).

Um breve histórico desta abordagem data de 1989 por GREGER et al. com a primeira descoberta de metilação nas ilhas de CpG de um gene supressor de tumor humano de *Retinoblastoma (Rb)*. Somente após 1994 é que surgiu a idéia de que a hipermetilação na ilha de CpG na região promotora de um gene poderia ser um mecanismo para inativar genes em câncer. A introdução de técnicas como a modificação pelo bissulfato de sódio (CLARK et al. 1994) e PCR metilação específica (MSP) (HERMAN et al. 1996) permitiram inúmeros estudos aplicáveis em oncologia. Como e porque certas ilhas de CpG tornam-se hipermetiladas ainda não sabemos ao certo, talvez cada etapa deste processo seja específica para cada gene ou grupo de genes, resultando na sua atividade de transcrição silenciada.

Sabemos que o câncer é uma doença de múltiplas causas e lesões genéticas são necessárias para o desenvolvimento completo de um tumor. O mesmo acontece para as lesões epigenéticas. A presença de ilhas de CpG

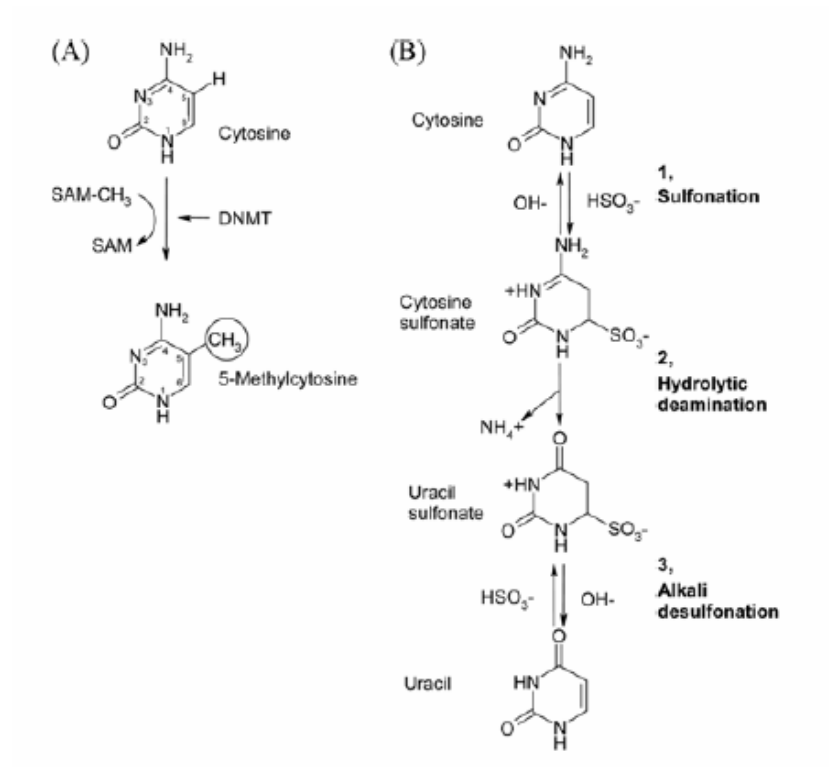
hipermetiladas em regiões promotoras afeta genes envolvidos em ciclo celular (*Rb*, *p16^{INK4a}*), reparo de DNA (*BRCA1*), metabolismo de carcinógeno (*GSTP1*), aderência celular (*CDH1*, *CDHG13*) e apoptose (*DAPK*, *TMS1*). Isto nos faz acreditar que padrões de metilação aberrantes são importantes na gênese de cada tipo de tumor (ESTELLER 2002). Segundo ESTELLER (2003) exemplos da aplicação dos estudos de expressão gênica por metilação em Oncologia são: metilação da 6-metilguanina DNA metiltransferase influencia a resposta a carmustina em gliomas e a resposta da ciclofosfamida em pacientes com linfoma difuso de grande células; metilação de *DAPK* está relacionada com a gravidade do câncer de pulmão e metilação de p16INK4a é indicativa de pior prognóstico em câncer coloretal.

As glutionas transferases têm sido historicamente denominadas de Glutionas S-transferases (GST). Estas enzimas catalizam o ataque nucleofílico reduzindo a glutationa a compostos não polares. Encontram-se expressas em células normais dos tratos urinário, respiratório e digestivo (HOPKINS et al., 2007). Seus substratos incluem halogenonitrobenzeno, quinonas entre outros. Três maiores famílias de proteínas são amplamente distribuídas na natureza e apresentam-se nas formas citosólica, mitocondrial e microsomal. Constituem alvo para terapias antiasmáticas e antitumoral, pois metabolizam agentes quimioterápicos, inseticidas, herbicidas, carcinógenos e outros produtos do stress oxidativo (HAYES et al. 2005).

A ilha de CpG promotora do gene da *Glutitiona S-transferase* (*GSTP1*) está silenciada e hipermetilada em mais de 95% de todos os

tumores de próstata (LEE et al. 1994). Ao contrário de outros genes supressores de tumor que estão silenciados por mutação ou deleção, um ou ambos os alelos de *GSTP1* estão inativados por metilação (MILLAR et al. 1999). O gene possui 7 exons, cerca de 3 kb e sua localização é 11q13.3. Encontra-se pouco expresso também em outros tumores como: mama, rim e fígado. O gene *GSTP1* é um bom exemplo de gene câncer específico, de acordo com LAIRD (2003) a sensibilidade analítica e clínica em amostras de DNA originadas de “buffy coat” de pacientes com câncer de próstata foi de 31 e 30%, respectivamente, e em DNA extraído de biópsias foi 100%, ambas com especificidade de 100%. Esta especificidade aliada à técnica de detecção de hipermetilação no gene promotor de *GSTP1* por MSP, possui a sensibilidade de 1:1000 DNA tumoral / DNA normal (GOESSL et al. 2002). A metodologia de MSP permite a amplificação do DNA tratado com bissulfito de sódio através de iniciadores desenhados para anelar em sequências metiladas e outros iniciadores para sequências não metiladas. Esse tratamento do DNA com bissulfito de sódio converte citosinas não metiladas em uracilas e mantém as citosinas metiladas como citosinas (figura 3). Outra abordagem para o estudo de metilação é a quantificação através de PCR em tempo real. Neste método, além do par de iniciadores, uma sonda interna ao segmento a ser amplificado também é hibridizada ao DNA molde da sequência metilada. Essa sonda possui um marcador fluorescente que permanece protegido, sendo liberado quando a sonda é destruída pela ação da enzima polimerase. Assim, quando ocorre a extensão dos iniciadores, a polimerase passa pelo local onde a sonda está ligada, promovendo a sua

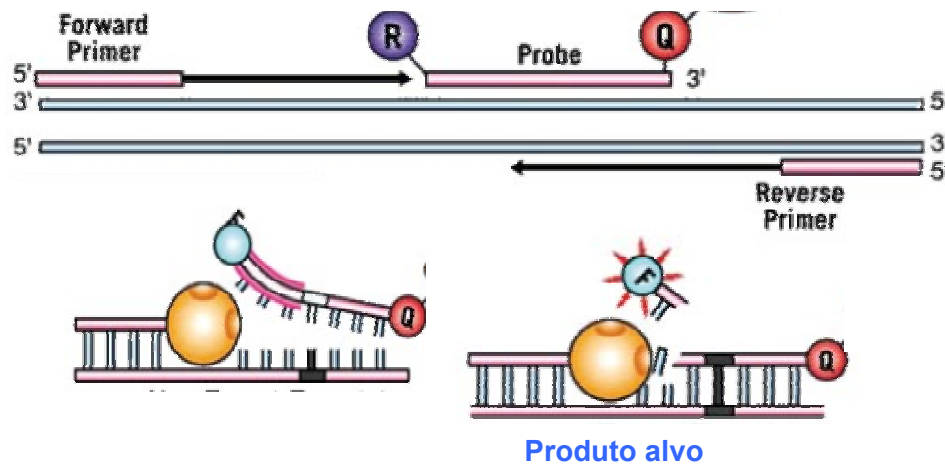
desintegração (Figura 4). Este evento pode ser acompanhado pela liberação da fluorescência (ALMEIDA et al. 2004).



Legenda: **A)** através do tratamento com bissulfito de sódio no DNA as citosinas metiladas pela ação das DNA metiltransferases (DNMT) são mantidas como citosinas. **B)** as citosinas não metiladas convertidas em uracilas e amplificadas como timinas na reação de PCR.

Fonte: ZHU (2007).

Figura 3 - Princípio químico da conversão pelo bissulfito de sódio.



Legenda: A sonda ("probe") complementar ao iniciador ("primer") possui nas suas extremidades 5' e 3' corantes F (FAM-repórter) e Q (TAMRA-quencher). Durante cada ciclo de amplificação e extensão da fita de DNA a taq polimerase cliva o corante F (azul) da sonda. Uma vez separado do Q (vermelho) o corante F emitirá sua fluorescência característica que é captada pelo equipamento e quantificada apenas no produto alvo.

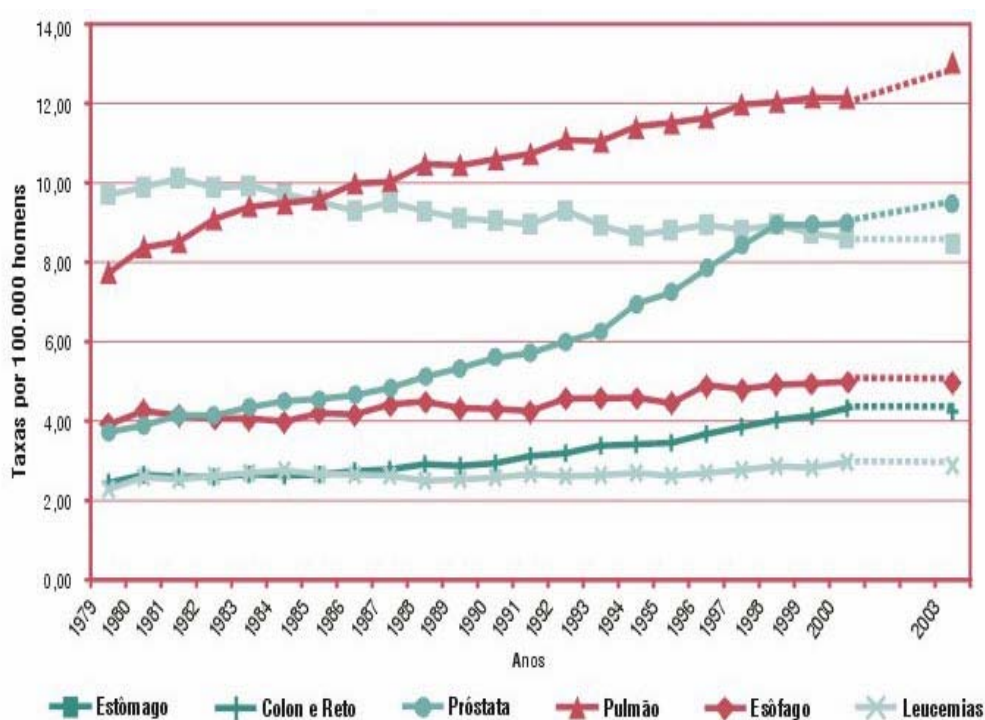
Fonte: Adaptado de KOPPAL (2004)

Figura 4 - Representação da sonda fluorogênica para detecção de um produto específico de PCR.

1.5 CÂNCER DE PRÓSTATA

Correspondendo a 6^a ocorrência mais freqüente de casos novos de neoplasia e a 2^a causa de óbitos por câncer entre homens, optamos em estudar um marcador para câncer de próstata. Representa 9,7% das neoplasias em homens (15,3% em países desenvolvidos e 4,3% em países em desenvolvimento). Superado em incidência pelo carcinoma de pele (não

melanoma) e em óbito pelo câncer de pulmão. Entre 1979 até 2000 a mortalidade aumentou de 3,73/100.000 para 8,98/100.000 (Figura 5).



Fonte: Ministério da Saúde (2003).

Figura 5 - Taxas de mortalidade de 1979 a 2000.

Segundo os dados do Instituto Nacional de Câncer-INCA era previsto 51 casos novos para cada 100 mil homens e a ocorrência de 47.280 casos novos em 2006 (Ministério da Saúde 2005). Felizmente a mortalidade é baixa e a média mundial de sobrevivência em 5 anos é de 58%. Seu

crescimento é lento, com tempo médio de duplicação de 4 a 5 anos. Estima-se que o tempo entre a transformação maligna inicial e o aparecimento de 1 cm³ de tumor (aproximadamente 10⁸ células) seja de 10 anos (SHI et al. 1999). História familiar de pai ou irmão com câncer de próstata antes dos 60 anos de idade pode aumentar o risco de câncer em 3 a 10 vezes em relação à população em geral, refletindo a influência de fatores hereditários e estilo de vida.

Ainda, quando verdadeiramente localizado este tumor pode ser curado pela cirurgia com necessidade de transfusão freqüente no ato operatório devido ao maior acometimento após os 50 anos de idade.

1.5.1 Inflamação e carcinogênese prostática

Seu desenvolvimento e progressão estão associados com alterações genéticas nas células tumorais como perda de heterozigose e ganhos genômicos, geralmente associados ao pior prognóstico. O desenvolvimento do fenótipo metastático pode ser independente do fenótipo tumorigênico e eles podem ocorrer simultaneamente. Portanto, nem todas as células tumorais são invasivas e metastáticas.

Embora várias alterações genéticas específicas tenham sido descritas em adenocarcinoma de próstata, tais como inativação do gene de P53 e PTEN, a mais comum é a metilação da região regulatória 5' do gene *GSTP1* (Quadro 1). A detecção desta alteração epigenética em fluidos corporais tem sido utilizada com sucesso com técnicas baseadas em DNA, já que está presente em mais de 90% dos tecidos de câncer de próstata e ausente nos

tecidos benignos, portanto, um evento tumor-específico (JERONIMO et al. 2002).

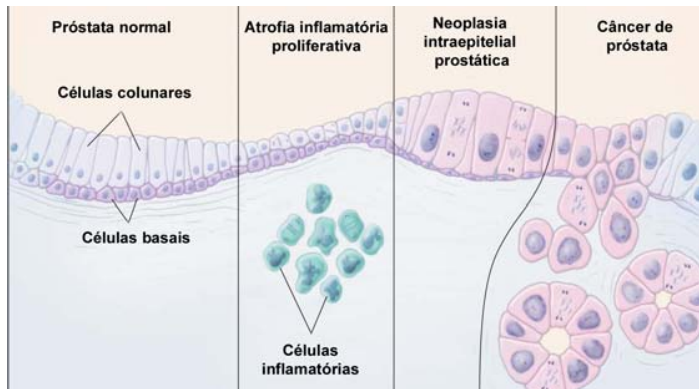
Tabela 1 – Genes envolvidos na carcinogênese prostática.

Gene	Função proposta
Mutações causando diminuição da atividade	
<i>MS</i>	Anti-infecciosa
<i>RNASEL</i>	Anti-infecciosa, apoptose
<i>ELAC2</i>	Metaldependente hidrolase
Hipermetilação do promotor resultando em silenciamento do gene	
<i>GSTP1</i>	Desintoxicação de carcinógeno
Perda de heterozigose e ponto de mutação	
<i>PTEN</i>	Sobrevida celular e proliferação
<i>Tp53</i>	Sobrevida celular, proliferação e estabilidade Genômica
Perda de heterozigose e haploinsuficiência	
<i>NKX3-1</i>	Diferenciação celular e proliferação
<i>CDKN1B(P27KIP1)</i>	Proliferação celular
Ponto de mutação	
<i>COPFR</i>	Regulador de transcrição
<i>AR</i>	Proliferação celular, sobrevivência e diferenciação
Amplificação	
<i>AR</i>	Proliferação celular, sobrevivência e diferenciação
Superexpressão de mRNA e proteína	
<i>HTERT</i>	Imortalidade celular
<i>HPN</i>	Protease transmembrana
<i>FASN</i>	Síntese de ácidos graxos
<i>AMACR</i>	Metabolismo de ácidos graxos
<i>EZH2</i>	Repressor de transcrição, proliferação celular
<i>MYC</i>	Proliferação celular
<i>BCL2</i>	Sobrevida celular
Polimorfismos afetando riscos de câncer de próstata	
<i>AR</i>	Proliferação celular, sobrevivência e diferenciação
<i>CYP17</i>	Metabolismo de andrógeno
<i>SRD5A2</i>	Metabolismo de andrógeno

Fonte: DEMARZO (2003)

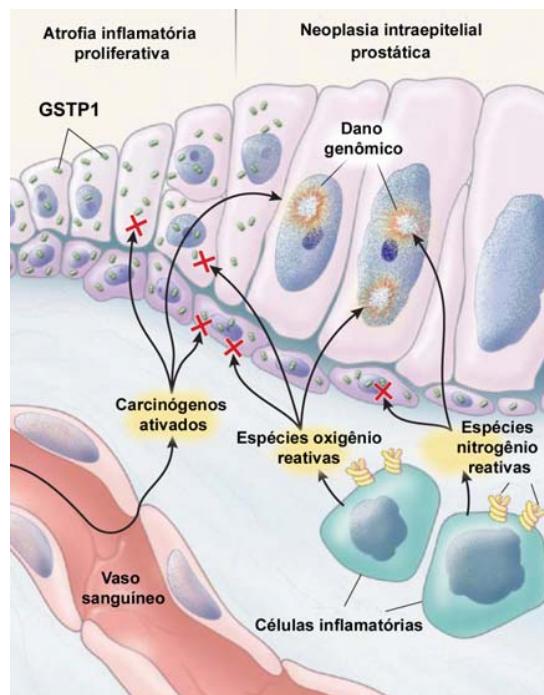
Em 2003 NELSON et al. propuseram que uma lesão chamada atrofia inflamatória proliferativa seria o precursor da neoplasia prostática intraepitelial e do câncer de próstata (Figura 6). Células epiteliais nestas lesões mostram sinais de stress com níveis elevados de *GSTP1*, glutathione S-transferase A1 (*GSTA1*) e cicloxigenase-2 (*COX-2*). Perda de *GSTP1*,

provavelmente como resultado da hipermetilação de seqüências CpG, pode definir a transição entre atrofia proliferativa inflamatória, neoplasia intraepitelial e carcinoma prostático (Figura 7).



Fonte: NELSON et al. (2003).

Figura 6 - Atrofia inflamatória proliferativa como precursor de neoplasia intraepitelial prostática e câncer de próstata.



Fonte: NELSON et al. (2003).

Figura 7 - Perda da atividade de *GSTP1* nas células prostáticas aumentando a vulnerabilidade ao dano genômico mediado por carcinógeno.

2 OBJETIVO

Validar a recuperação de sangue autóloga intra-operatória em prostatectomia, utilizando como marcador tumoral específico a metilação da região promotora do gene *GSTP-1*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DE AMOSTRAS DE TUMOR E SANGUE DERIVADOS DE PROSTATECTOMIA RADICAL COM *CELL SAVER*

Após aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa Hospital do Câncer (550/03) e obtenção de consentimento livre e esclarecido, foram coletadas amostras de tumor fresco e de sangue em pacientes submetidos a prostatectomia radical no Hospital A C Camargo/ São Paulo a partir de Maio de 2004. Caso as vesículas seminais fossem lesadas durante a dissecação da próstata, a aspiração era interrompida, evitando-se a coleta de outros fluídos que não fosse sangue. As amostras de sangue foram coletadas para a pesquisa conforme abaixo, **não sendo reinfundidas no paciente.**

Coleta de sangue e tecido para extração de DNA nas etapas:

- ✓ sangue total venoso pré cirurgia: amostra A.
- ✓ Sangue aspirado do campo operatório: amostra B.
- ✓ concentrado de hemácias lavado na *cell saver*: amostra C.
- ✓ concentrado de hemácias lavado na *cell saver* e filtrado: amostra D.
- ✓ concentrado de hemácias lavado na *cell saver*, filtrado e irradiado com 25 Gy: amostra E.

Critérios de inclusão

- ✓ Pacientes portadores de adenocarcinoma de próstata, nos três estádios da doença, que eram submetidos à cirurgia no Hospital A C Camargo – São Paulo.
- ✓ Assinarem o termo de consentimento.

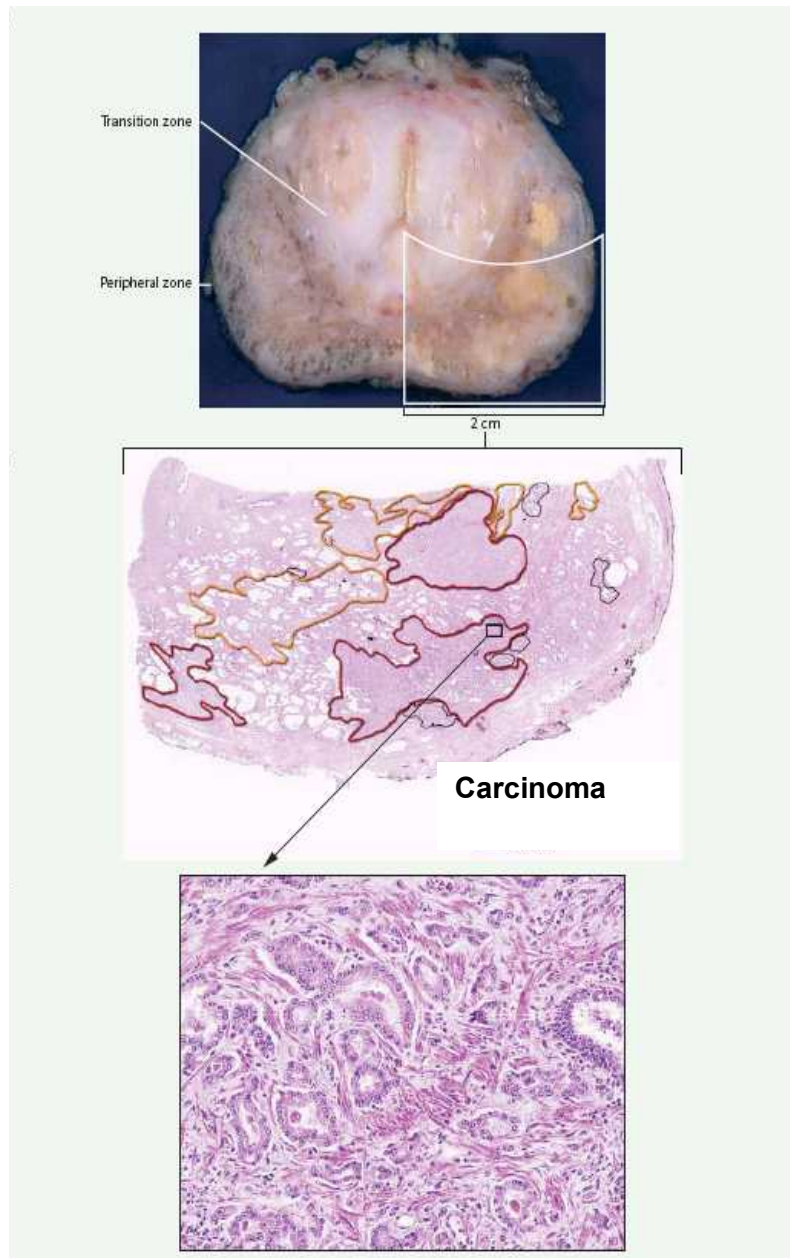
Critérios de exclusão

- ✓ Pacientes impossibilitados ou que não quiserem assinar o termo de consentimento.
- ✓ Ausência de tumor no material submetido à anatomia patológica da peça cirúrgica (Figura 8).
- ✓ Ausência de hipermetilação *GSTP1* no tecido tumoral da congelação feita no ato cirúrgico.

Cientes de que o gene *GSTP-1* está metilado na maioria dos tumores de próstata (JERONIMO et al. 2002) estimamos o tamanho da amostra (n) para o estudo em 30 casos, visto que pode ocorrer uma de duas opções não mutuamente exclusivas:

- 1 O tumor em questão não apresentar metilação na região promotora de *GSTP-1* e, portanto não se prestar ao experimento (a metilação só será verificada após a cirurgia);
- 2 Embora ocorra a metilação no gene *GSTP-1* das células tumorais, o número das mesmas no sangue recuperado for inferior ao limite de detecção do método. Em estudo piloto é suficiente a identificação de um caso com metilação e o seu acompanhamento durante todo o

processo de recuperação autóloga intra-operatória até a demonstração de sua ausência ao final, como detalhamos no esquema abaixo (Figura 9).



Fonte: NELSON et al. (2003)

Figura 8 – Representação da peça cirúrgica e resultado da análise histológica durante o ato operatório.

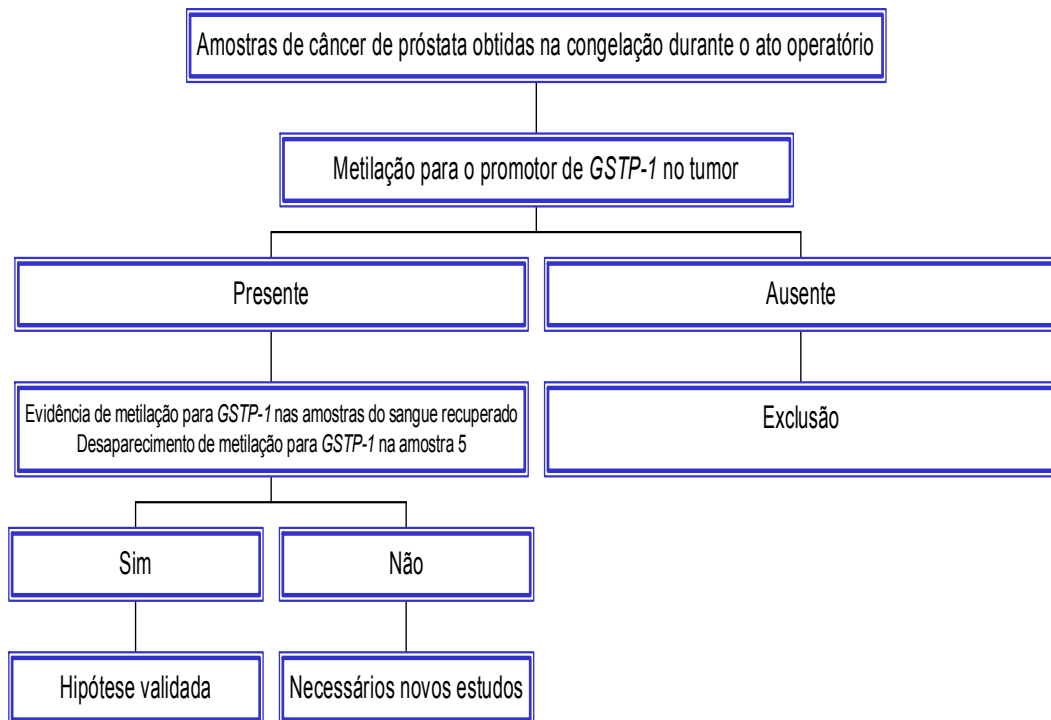


Figura 9 - Desenho do estudo.

3.2 PREPARO E CONGELAMENTO DAS AMOSTRAS

O volume das amostras B, C, D e E de sangue de cada paciente foi triplicado, isto é, foram colhidos 15 mL em tubos com EDTA, centrifugados 5 minutos a 3500 rpm e a massa de células reconstituída para um único tubo de 5 mL. Da mesma forma, as amostras A também tinham seu sobrenadante retirado. Partindo de 4 mL de massa de células acrescentamos 4mL de phosphate buffered saline (PBS). Volume igual de Ficoll-Paque Plus™

Amersham Biosciences foi adicionado em tubos falcon de 50 mL e a mistura sangue/PBS foi adicionada lentamente pela parede do tubo. A seguir, centrifugação durante 20 minutos a 10°C em 1200 rpm. O halo branco (figura 10) foi transferido para um novo tubo falcon de 15 mL e então lavado duas vezes com PBS. O “pellet” de células obtido foi congelado a -80°C para realização das análises de metilação em *GSTP1*.

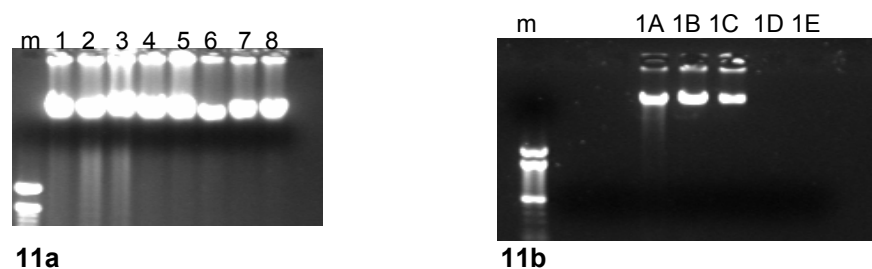


Figura 10 - Halo de células após a centrifugação com Ficoll-Paque Plus™.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA das amostras de sangue foi extraído através do método de fenol/clorofórmio. As amostras de tumores congeladas e as linhagens de tumor de próstata: PC-3 e DU 145 (CRL-1435 e HTB-81, respectivamente, (ATCC 2006) foram submetidas à extração pelo método de fenol/álcool isoamílico. Resuspensas em Tris-EDTA (TE) e mantidas em freezer -20°C. A qualidade do DNA extraído foi analisada em gel de agarose 1%.

As amostras de DNA dos tumores foram identificadas por letras e as de sangue com a letra do paciente e número. Exemplo: tumor A e as amostras de sangue: A1 (veia periférica), A2 (aspirado do campo operatório), A3 (sangue lavado), A4 (sangue lavado e filtrado) e A5 (sangue lavado, filtrado e irradiado) conforme Figura 11.



Legenda: **11a** DNA das amostras dos tumores 1-8. **11b** DNA das amostras de sangue do paciente 1 (1A-1E). Nota: As amostras D e E de todos os pacientes não aparecem no gel de agarose 1%. m = marcador de peso molecular.

Figura 11a e b - Análise qualitativa do DNA extraído em gel de agarose a 1%.

3.4 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

Inicialmente todas as amostras de tumores coletadas foram submetidas à extração de DNA e 1 μ g deste DNA extraído foi tratado com bissulfito de sódio pela técnica convencional: solução de bissulfito 2,5M; solução de hidroquinona 1M e hidróxido de sódio 2M (GOLDENBERG et al. 2004). A esta mistura adicionamos 1 μ L de DNA de esperma de arenque e incubamos por 3 horas a 70°C. Após a desnaturação as amostras foram purificadas utilizando resina Wizard (Promega Corp., Madison, Wiscosin) lavadas com 4 mL de isopropanol 80% e eluídas em 45 μ L de água a 80°C.

A desaminação das amostras foi feita com acetato de amônio 5M. Em seguida, precipitadas em etanol 100% e acrescidas de 1µL de glicogênio 20mg/mL e incubadas a -20°C durante a noite. A ressuspensão foi feita em etanol 70% e após a secagem, diluídas em 20 a 45µL de TE e armazenadas em freezer a -80°C.

3.5 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE MSP

Os iniciadores listados tabela 2 foram testados através do estudo de metilação na região promotora de *GSTP1* em sangue normal e nas linhagens acima descritas.

Tabela 2 - Tabela de iniciadores para região promotora de *GSTP-1* e suas seqüências.

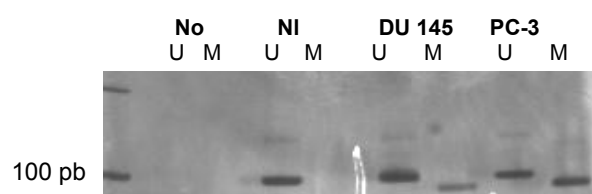
"Primer"	Seqüência
Não metilado (sense)	5`GAT GTT TGG GGT GTA GTG GTT GTT 3`
Não metilado (antisense)	5`CCA CCC CAA TAC TAA ATC ACA ACA 3`
Metilado (sense)	5`TTC GGG GTG TAG CGC TCG TC 3`
Metilado (antisense)	5`GCC CCA ATA CTA AAT CAC GAC G 3`

Fonte: ESTELLER et al. (1999).

✓ Reação de MSP:

Reagentes Invitrogen™: Tampão 10 x (2,5µL); MgCl₂ 50mM (1µL); dNTPs 1.25 Mm (4µL); iniciadores 10µM senso e antisense (0,4 µL) para cada situação, isto é, seqüências metiladas e não metiladas da região promotora de *GSTP1*; Taq DNA Polymerase Platinum (0,2µL) e água para

completar o volume final de 24 μ L. Foi adicionado 1 μ L de DNA a cada mistura metilada/não metilada. As condições da reação foram: 95°C por 10 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 59°C por 30 segundos, extensão de 30 segundos a 72 °C e extensão final de 4 minutos a 72°C. Controles: positivo para metilação PC-3 e/ou DU 145 e negativo para metilação leucócitos extraídos de amostras de sangue normal, conforme Figura 12.



Legenda: Controle negativo de metilação (NI) = leucócito normal; U = amostra não metilada com 97 pb e M= amostra metilada com 91 pb. As linhagens DU 145 e PC-3 apresentam metilação parcial e a intensidade de metilação é maior na PC-3.

Figura 12 - Análise de metilação na região promotora de *GSTP-1* dos controles positivo e negativo em gel de acrilamida a 8%.

3.6 REAÇÃO EM TEMPO REAL DE PCR METILAÇÃO ESPECÍFICA (“REAL TIME” PCR METILAÇÃO ESPECÍFICA).

3.6.1 Padronização

A reação de PCR em tempo real para o estudo de metilação na região promotora de *GSTP-1* foi padronizada em conjunto com o gene de referência para β actina (*ACTB*) cuja amplificação independe de metilação. Os iniciadores e as sondas utilizados estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3 - Tabela de iniciadores e sondas (IDT™) para a região promotora de *GSTP-1* e para β actina (*ACTB*).

<i>GSTP-1</i>	Seqüência Genbank M24485- 140 pb
(sense)	5'AGTTGCGCGGCGATTTTC 3'
antisense)	5'GCCCAATACTAAATCACGACG 3'
Sonda	6FAM - 5' CGGTGACGTTTCGGGGTGTAGCG-3'-TAMRA
<i>ACTB</i>	Seqüência Genbank Y00474- 133 pb
(sense)	5'TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT 3'
antisense)	5'AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA 3'
Sonda	6FAM - 5' ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA-3'-TAMRA

Fonte: HARDEN et al. (2003).

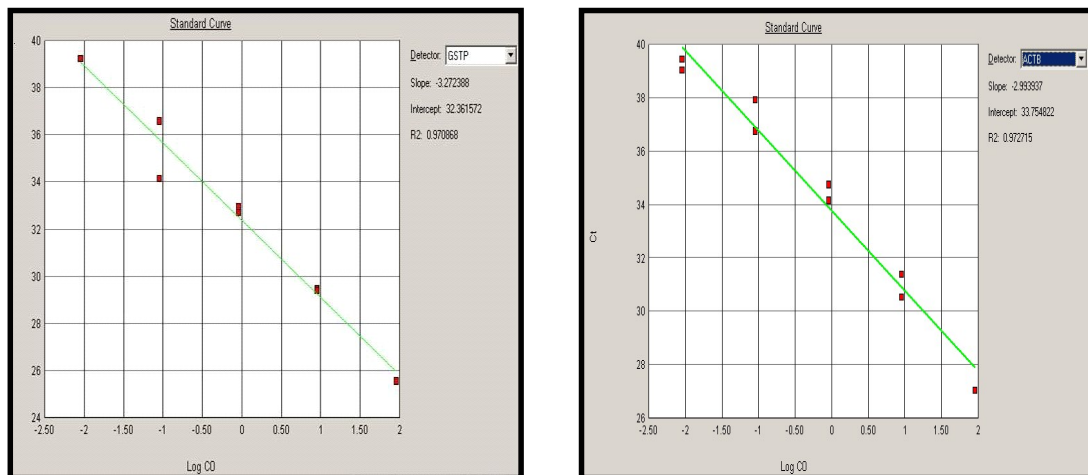
As reações foram realizadas no equipamento ABI 7300™, com reagentes Invitrogen™: Tampão 10 x (2,5µL); MgCl₂ 50mM (1µL); dNTPs 1.25 Mm (4µL); iniciadores 600nM senso e 600 nM antisenso para cada gene (2,5µL) e sondas 400 nM (5 µL) para as regiões promotoras de *GSTP1* e *ACTB*; Taq DNA Polymerase Platinum 0,2µL, Rox Reference Dye (0,4 µL) e água para completar o volume final de 25 µL. Foram adicionados 3µL de DNA em duplicata de PC-3 para ambos os genes a cada mistura da reação. E as condições foram semelhantes da reação de MSP: 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e temperatura de anelamento de 60°C por 60 segundos. Desta forma, obtivemos maior fluorescência e o início da fase logarítmica de amplificação ("cycle threshold": CT).

3.6.2 Quantificação Absoluta baseada em curva padrão

Utilizamos uma CpG metilase, M.Sss I (New England Biolabs) para metilar "in vitro" leucócitos normais e construir a curva padrão. O tratamento

com esta metil transferase consiste na incubação durante 8 horas a 37^o C de 20 µg de DNA de leucócitos com aproximadamente 40 unidades da enzima, seguida de precipitação e suspensão em 10 µL de TE. Dessa amostra, 2 µg são tratados com bissulfito de sódio (sem arenque) e quantificados como RNA (Nandrop TM) para obtenção dos seguintes pontos para a quantificação na curva padrão: 90 ng; 9 ng; 0,9 ng; 0,09 ng e 9pg. Estes pontos representam quantidades de DNA equivalentes a 10.000; 1000; 100; 10 e 1 célula respectivamente, estimando-se que uma célula possui 6 pg de DNA.

Somente desvio padrão de até 0.5 foi considerado para análise das duplicatas na construção da diluição seriada dos pontos da curva padrão para ambos os genes como demonstra a Figura 13.



Legenda: Resultado da amplificação das diluições seriadas de leucócitos normais hipermetilados "in vitro" nos 5 pontos da curva padrão para ambos os genes.

Figura 13 - Padronização dos pontos da curva padrão para os genes: *GSTP-1* e *ACTB* respectivamente, no equipamento ABI 7300 TM.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DESCRITIVA DA CASUÍSTICA

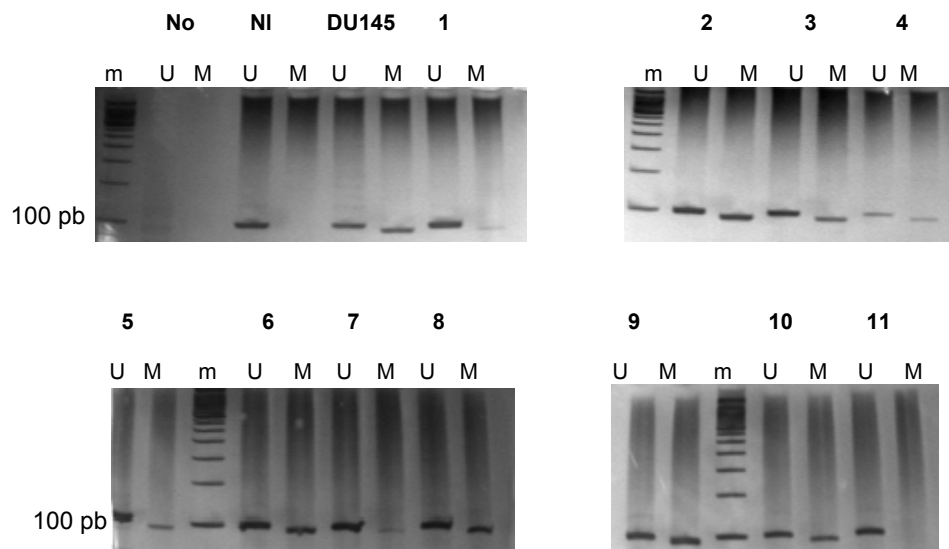
Durante o período de Maio de 2004 a Outubro de 2006 participei de 40 prostatectomias radicais no Hospital A C Camargo - São Paulo. O volume de sangue aspirado do campo operatório pelas equipes cirúrgicas variou de 200 a 1300 ml até abertura da bexiga. Nove pacientes (30%) apresentavam antecedentes de outras neoplasias, inclusive dois pacientes com recorrência bioquímica de câncer de próstata. Três pacientes receberam transfusão de concentrado de hemácias (10%) durante a cirurgia. As características clínicas pré-cirúrgicas dos 30 pacientes incluídos, isto é, que apresentaram hipermetilação de *GSTP-1* no tumor encontram-se na tabela 4. A maioria dos pacientes apresentou a soma do escore de Gleason pré-operatória maior ou igual a 6 (57%). Em 10% dos pacientes a soma do escore foi superior a 8. Em relação as equipes cirúrgicas: 9 prostatectomias foram realizadas pela equipe 2 (30%); 9 cirurgias (30%) pela equipe 3; 7 cirurgias (23,3%) pela equipe 1; 4 cirurgias (13,3%) pela equipe 4 e somente uma prostatectomia (3,3%) pela equipe 5. O critério de escolha dos pacientes para cada equipe de cirurgiões foi a agenda de cada equipe, já que todas são igualmente capacitadas para o procedimento cirúrgico.

Tabela 4 - Características clínicas dos pacientes incluídos (n=30) submetidos a prostatectomia radical durante o período de Maio/2004 a Outubro/2006.

Paciente	Equipe cirúrgica	Idade (anos)	PSA (ng/mL)	Gleason (biópsia)
1	A	60	7,1	5
2	D	60	4,7	7
3	B	54	7,6	6
4	A	50	8,1	6
5	B	47	9,2	5
6	B	58	6,3	8
7	A	73	6,9	7
8	D	60	6,1	6
9	B	61	4,4	6
10	C	54	5,9	6
11	C	56	9,6	7
12	C	69	4,1	7
13	D	64	7,5	8
14	E	72	10,4	6
15	B	73	21,9	6
16	C	59	3,7	6
17	C	66	2,9	6
18	B	52	5,6	6
19	D	65	5,3	6
20	A	64	23,7	7
21	B	60	8,5	7
22	B	62	7,1	6
23	A	58	10,6	6
24	C	47	6,1	6
25	A	41	78,8	9
26	C	63	5,6	7
27	C	61	3,7	7
28	A	68	4,2	6
29	C	71	5,4	7
30	B	75	4,6	7
Média/desvio padrão (min-max)		60,7/8,3 (41-75)	9,8 /13,8 (2,9-78,8)	
Mediana		60,5	6,2	

4.2 REAÇÃO DE MSP DOS TUMORES COLETADOS

Em 34 cirurgias a análise histológica da congelação intraoperatória foi positiva para câncer de próstata. Entre estes pacientes, 30 tumores coletados a fresco apresentaram metilação para região promotora de *GSTP-1* nas reações de MSP (88,2%), como demonstra a figura 14, portanto as respectivas amostras de sangue armazenadas foram processadas.

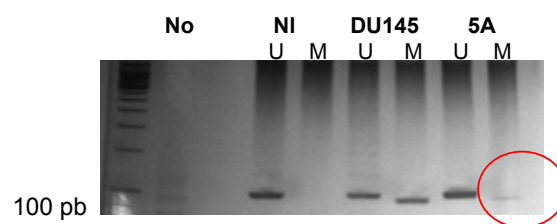


Legenda: Demonstração de metilação na maioria dos tumores estudados em diferentes intensidades e ausência da banda M no tumor 11 (NI = amostra normal; U = amostra não metilada e M= amostra metilada). m = marcador de peso molecular.

Figura 14 - Análise em gel de acrilamida a 8% da reação de MSP com os tumores1-11.

4.3 REAÇÃO DE MSP NAS AMOSTRAS DE SANGUE

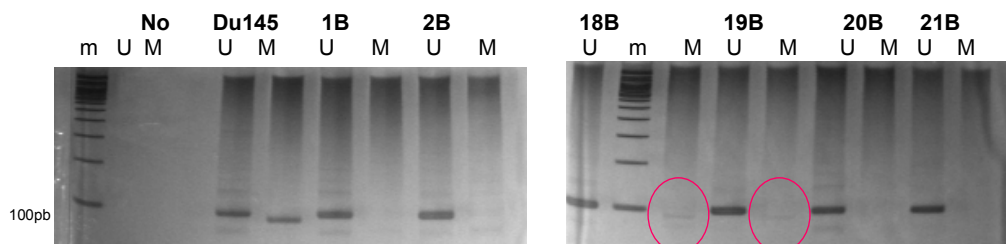
As amostras de DNA do sangue extraídas dos pacientes cujos tumores apresentavam metilação na região promotora de *GSTP-1* foram submetidas ao tratamento do DNA com bissulfito de sódio. Dentre as amostras de sangue dos primeiros 11 pacientes testados, encontramos metilação nas amostras A (veia periférica) em dois casos (18%) como demonstramos na figura 15. Para esses pacientes o resultado positivo não foi verificado nas demais amostras: campo operatório (B); campo operatório lavado (C); campo operatório lavado e filtrado (D) e campo operatório lavado, filtrado e irradiado (E). A partir desta observação, optamos pela coleta e separação das amostras com Ficoll nos casos posteriores com o objetivo de minimizar o efeito de diluição do sangue durante o ato cirúrgico. Além disso, fizemos alterações na quantidade de DNA e no número de ciclos da reação de MSP na tentativa de aumentar a sensibilidade da reação e assim identificar bandas metiladas menos intensas.



Legenda: O círculo demonstra a presença de metilação na amostra 5A (veia periférica do paciente 5). Controle negativo de metilação = NI; U = amostra não metilada e M= amostra metilada. Controle negativo e positivo de metilação = DU 145.

Figura 15 - Análise da reação de MSP com amostra A (veia periférica) do paciente 5 em gel de acrilamida a 8%.

As demais amostras de sangue coletadas a seguir foram separadas através de gradiente de Ficoll. Entre 10 amostras coletadas desse modo obtivemos 3 casos (30%) que não apresentavam evidência de metilação circulante (amostra A), porém encontramos célula/DNA tumoral na amostras do campo operatório (amostra B) como está demonstrado na Figura 16.



Legenda: O círculo demonstra a presença de metilação nas amostras 18B e 19B (campo operatório dos pacientes 18 e 19) em relação aos demais casos de amostras denominadas B. Controle negativo de metilação = NI; U = amostra não metilada; M = amostra metilada e m = marcador de peso molecular. Controle negativo e positivo de metilação = DU 145.

Figura 16 - Análise da reação de MSP com as amostras B (campo operatório) dos pacientes 18 e 19 em gel de acrilamida a 8%.

Em relação às amostras do sangue do campo operatório subsequentes, isto é, amostras lavadas, lavadas e filtradas e finalmente, lavadas; filtradas e irradiadas (amostras C-E) observamos apenas a banda não metilada nas amostras C que correspondem aos leucócitos remanescentes do sangue do campo operatório lavado. A partir do uso de filtro (amostras D e E) não observamos qualquer banda seja metilada ou não metilada. Este fato já era esperado devido ao limite de detecção do método, já que nestas amostras o número de células normais e tumorais deve ser muito inferior a 1000. As análises de MSP das amostras de sangue destes 24 pacientes estão sumarizadas na tabela 5.

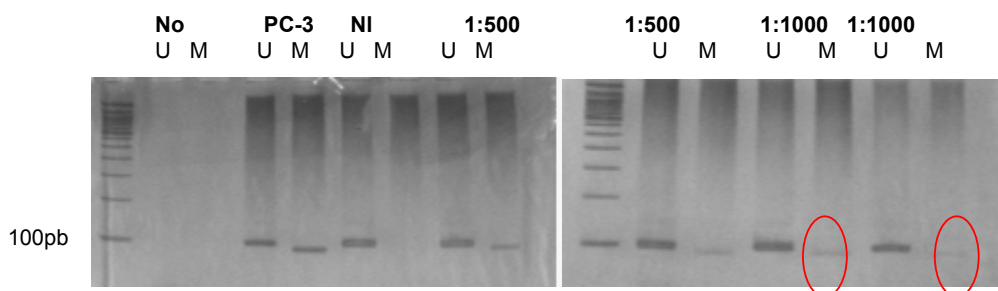
Tabela 5 – Resultados das análises de MSP das amostras de sangue de 24 pacientes.

Paciente	Veia periférica		Campo operatório		Campo operatório Lavado		Campo operatório lavado e filtrado		Campo operatório Lavado, filtrado e irradiado	
	Situação	U	M	U	M	U	M	U	M	U
1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
2	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
3	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
4	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
5	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
6	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
7	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
8	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
9	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
10	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
11	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
12	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
13	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
14	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
15 #	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
16 #	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
17 #	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
18 #	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
19 #	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
20 #	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
21 #	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
22 #	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
23 #	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
24 #	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0

Legenda: O símbolo # indica que as amostras de sangue desses pacientes foram separadas através de gradiente de Ficoll. Situação U/M = estudo da situação não metilada/situação metilada de cada amostra. Representação dos resultados 0= negativo e 1= positivo.

4.4 ESTUDO DE SENSIBILIDADE DA REAÇÃO DE MSP

Fixamos 1 μ g de leucócito normal e diluímos a célula tumoral de PC-3 nas seguintes concentrações: 1:25; 1:50; 1:75 e 1:100. Através dessa mistura de células tumorais de PC-3 com leucócitos normais, em diferentes diluições, pudemos detectar a sensibilidade do nosso ensaio. Submetemos, então, estas diluições ao tratamento de bissulfito e alteramos a quantidade de DNA na reação de MSP. Cientes da flutuação das bandas metiladas, trabalhando com mínimas concentrações de DNA, fizemos a tentativa de alterar alguns parâmetros e assim reproduzir a sensibilidade descrita para a abordagem de MSP. Inicialmente utilizamos 35 ciclos na reação de MSP e 3 μ L de DNA, depois aumentamos para 40 ciclos voltando a utilizar 1 μ L de DNA na reação (em duplicata, na Figura 17). Desta vez, testamos diluições de 1:50; 1:100; 1:500 e 1:1000 e atingimos a sensibilidade descrita por HERMAN et al. (1996).



Legenda: Os círculos destacam a presença de metilação nas duplicatas da diluição 1:1000. (NI = amostra normal; U = amostra não metilada e M= amostra metilada).

Figura 17 - Análise da reação de MSP da mistura de leucócitos normais e PC-3 em diluições distintas em gel de acrilamida a 8%.

4.5 ANÁLISE EM TEMPO REAL DE PCR METILAÇÃO ESPECÍFICA

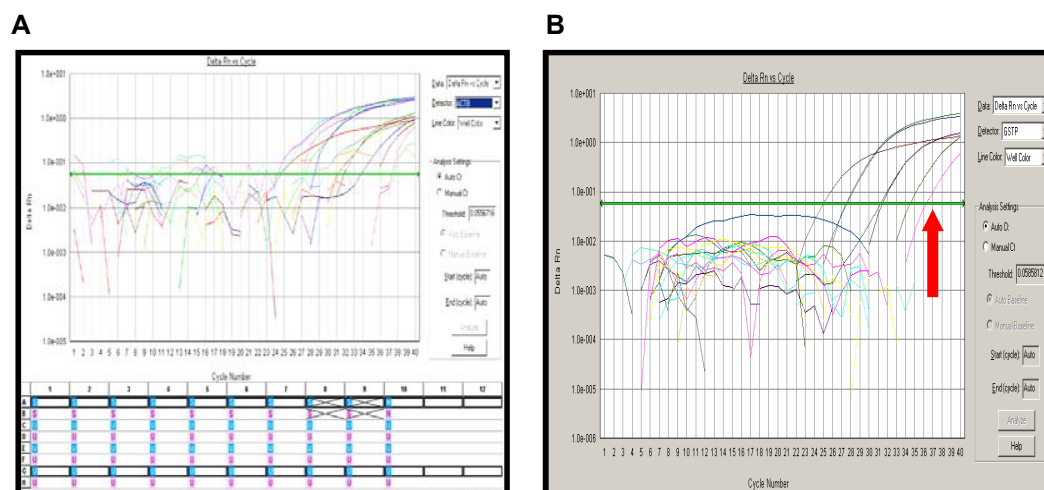
Os resultados das análises de MSP-PCR dos tumores foram confirmados pela técnica de MSP-PCR em tempo real. A metilação para o promotor de *GSTP-1* nessas amostras foi correspondente à detecção de 100 a 1000 células de adenocarcinoma de próstata. Essa variação é esperada devido a diferentes quantidades de DNA tumoral das amostras obtidas pela anatomia patológica do centro cirúrgico que não sofreram microdissecção.

Diferente das análises de MSP que foram realizadas de modo vertical, isto é, análise de resultados de todos os sangues periféricos (amostras A), seguido pelas análises de todos os sangues do campo operatório e assim, sucessivamente, estudo em tempo real de metilação foi realizado de modo horizontal. Desta forma, todas as amostras de um paciente foram estudadas em conjunto numa placa de PCR. Em cada placa foi possível estudar 3 pacientes. Apenas os casos que apresentavam massa de DNA suficiente para nova conversão pelo bissulfito de sódio foram avaliados nessa técnica, além de casos novos também concentrados com Ficoll e estão demonstrados na tabela 6.

As placas com as duplicatas dos pontos da curva padrão e as duplicatas de 3 pacientes para ambos os genes foram analisadas, totalizando 5 placas (capacidade de 96 amostras). Houve amplificação em 2 pacientes (20%) nas amostras C (campo operatório lavado). Apesar da escassez de DNA nestas amostras, os resultados podem ser validados porque notamos amplificação do gene *ACTB* em todas as situações, isto é,

nas amostras A até E dos pacientes, conforme o caso do paciente 6 da figura 18. Além disso, afastamos a possibilidade de contaminação na reação aplicando o produto da placa em gel de acrilamida a 8%. Desta forma, confirmamos a amplificação de uma célula tumoral nas amostras de sangue recuperado e lavado na “cell saver” e ausência da mesma após a filtração e irradiação nesses casos.

A Figura 19 demonstra a análise quantitativa e qualitativa do paciente 22 em que pudemos identificar uma célula de tumor de próstata no sangue recuperado e lavado com soro fisiológico, já que houve amplificação após 9 pg da curva padrão de *GSTP-1*.



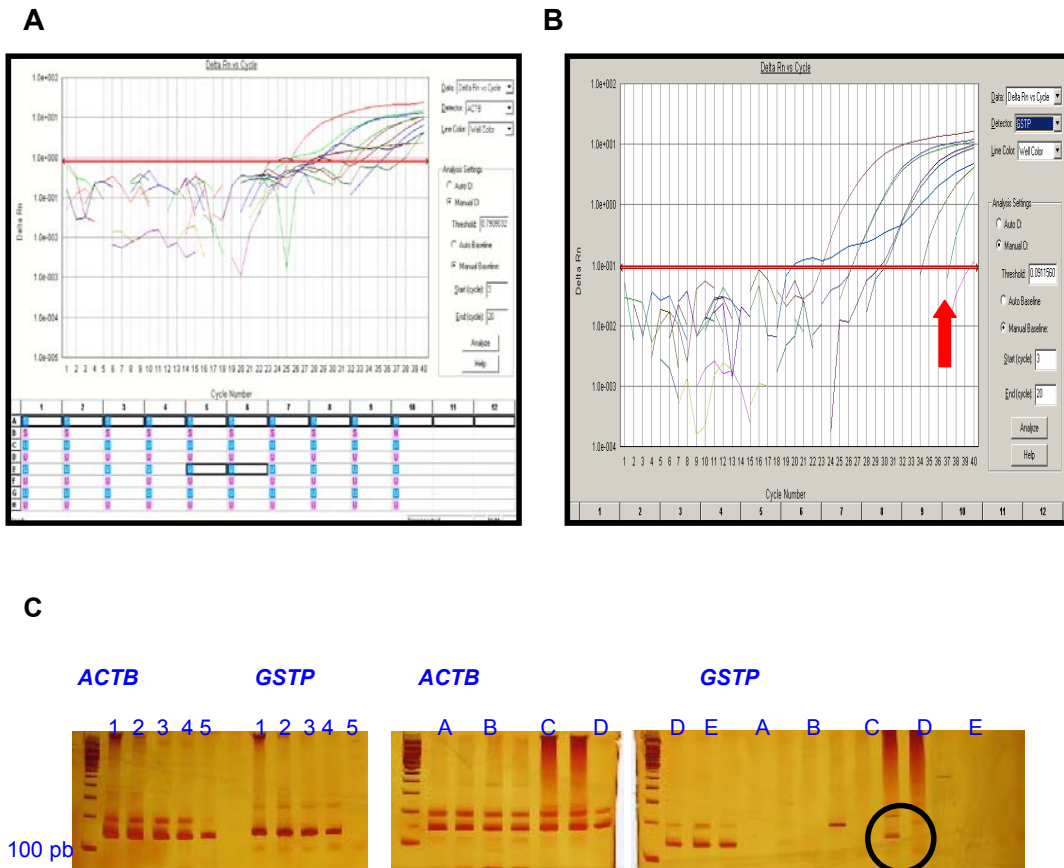
Legenda: (A) Presença de amplificação nas duplicatas das 5 amostras coletadas em diferentes momentos da cirurgia e de processamento na “cell saver” para o gene de referência da β *Actina* do paciente 6 (B) A seta indica a amplificação para *GSTP-1* em uma das duplicatas da amostra C desse caso, além dos pontos da curva padrão.

Figura 18 - Análise quantitativa para metilação no promotor de *GSTP-1* na amostra C (campo operatório lavado) do paciente 6.

Tabela 6 - Resultados de “real time” PCR metilação específica das amostras de sangue (concentradas pelo Ficoll) de 15 pacientes submetidos à prostatectomia radical e recuperação autóloga de sangue intra-operatória.

Paciente	Veia periférica		Campo operatório		Campo operatório Lavado		Campo operatório lavado e filtrado		Campo operatório Lavado, filtrado e irradiado	
	ACTB	GSTP	ACTB	GSTP	ACTB	GSTP	ACTB	GSTP	ACTB	GSTP
1#	5+	0	3+	0	4+	+	+	0	4+	0
2	4+	0	3+	0	3+	0	+	0	+	0
3#	3+	0	3+	0	4+	0	4+	0	4+	0
4##	2+	0	+	0	2+	0	+	0	+	0
5##	+	0	+	0	2+	0	+	0	+	0
6##	2+	0	+	0	2+	0	+	0	+	0
7	+	0	+	0	2+	0	+	0	+	0
8	2+	0	+	0	2+	+	+	0	+	0
9	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0
10	4+	0	4+	0	4+	2+	2+	2+	2+	0
11	4+	0	4+	2+	4+	0	2+	2+	2+	0
12	4+	0	4+	4+	4+	0	3+	0	+	0
13	3+	0	3+	0	2+	0	+	0	+	0
14	3+	0	3+	0	3+	0	+	0	+	0
15	3+	0	3+	0	4+	0	+	0	+	0

Representação dos resultados da amplificação do DNA das amostras: 0) indetectável; +) 0,009-0,09 ng; 2+) 0,09-0,9 ng; 3+) 0,9-9 ng; 4+) 9-90 ng e 5+) mais do que 90 ng. Quantificação de DNA das amostras de sangue baseada em curva padrão e dados do software do equipamento. O símbolo # indica recorrência bioquímica e ## outros tumores.



Legenda: (A) Presença de amplificação nas duplicatas das 5 amostras coletadas em diferentes momentos da cirurgia e de processamento na “cell saver” para o gene de referência da β Actina do paciente 22 (B) A seta indica a amplificação para *GSTP-1* em uma das duplicatas da amostra C desse caso, além dos pontos da curva padrão. (C) Aplicação do produto amplificado do PCR quantitativo em gel de acrilamida a 8%: (uma canaleta de cada ponto da curva e duplicatas das 5 amostras para ambos os genes). O círculo sinaliza a presença da banda metilada em uma das duplicatas (amostra C). Ressaltamos a detecção da quantidade de DNA inferior a 9 pg (com base na curva padrão: 1= 90 ng; 2= 9 ng; 3= 0,9ng; 4= 0,09ng e 5= 0,009ng) para *GSTP-1* desta amostra.

Figura 19 - Análise quantitativa para metilação no promotor de *GSTP-1* do paciente 22.

5 DISCUSSÃO

Durante o período que envolveu as cinco equipes cirúrgicas e o departamento de anestesia houve muito entusiasmo para que o volume de sangue recuperado (em média 400 ml) pudesse ser reinfundido, já que a chance de transfusão é ainda maior no pós-operatório destes pacientes. Foi possível aspirar o campo operatório sem contaminação de sêmen ou urina. O volume de sangramento nesta instituição é menor do que o descrito na literatura, segundo NEIDER et al. (2005), é de 770 a 1575 ml.

Os resultados obtidos confirmaram a hipótese de células tumorais circulantes, porém, inicialmente, não fomos capazes de demonstrar que elas estavam presentes nas amostras B que correspondem ao sangue coletado na recuperadora intraoperatória. Atribuímos este fato ao pequeno número de células tumorais que sofreram um efeito de diluição durante o ato cirúrgico prejudicando a sensibilidade da metodologia. Então, partimos para uma coleta mais concentrada de material, triplicando o volume das amostras coletadas e concentrando as células nucleadas através de um gradiente de Ficoll. O achado pela técnica de MSP de 21,4% das amostras coletadas com Ficoll demonstrar a metilação no sangue coletado do equipamento e sua ausência após a lavagem (amostra 3), lavagem seguida de leucorredução (amostra 4) e lavagem seguida de leucorredução e irradiação (amostra 5) valida nossa hipótese de trabalho. O experimento de misturas de linhagem tumoral e leucócitos foi realizado devido à dificuldade na obtenção das

bandas metiladas nas amostras dos pacientes. Obtivemos a sensibilidade descrita na literatura durante as análises qualitativas de MSP, isto é, de 1 alelo metilado para 1000 alelos não metilados (HERMAN et al. 1996). Por estas razões que apontam a complexidade do assunto, a aplicação clínica de um marcador metilado deve ser avaliada também de maneira quantitativa para garantia das análises (USHIJIMA 2005).

Novamente, através de metilação quantitativa (“real time”), pudemos validar nossa hipótese com uma maior sensibilidade: 1 célula tumoral em 10.000 células normais. Fomos capazes de detectar o equivalente a um genoma de célula tumoral no sangue recuperado após a lavagem e a ausência de amplificação do DNA na mesma amostra quando submetida à filtração e irradiação.

Outros autores têm utilizado a reinfusão do sangue recuperado, apesar da falta de validação do procedimento em câncer de próstata. Em estudo retrospectivo DAVIS et al. (2003) analisaram a recorrência do câncer de próstata após o seguimento médio de 40 meses (12-104) de 408 pacientes. Divididos em 3 grupos: 87 receberam sangue da “*cell saver*”, 264 somente transfusão autóloga e 57 não receberam transfusão. Através de análise multivariada de regressão logística os fatores independentes de recorrência foram: PSA inicial, escore de Gleason, envolvimento da vesícula seminal e das margens cirúrgicas. Desta forma, concluíram que a recuperação autóloga intra-operatória em prostatectomia radical é um procedimento seguro. Em estudo prospectivo semelhante, porém utilizando o sangue recuperado em 48 pacientes, STOFFEL et al. (2005), através de

RT-PCR para PSA, encontraram 13 % de células tumorais circulantes antes da cirurgia, porém 88 % de células tumorais no sangue do equipamento (*cell saver*). Entretanto, não associam a recorrência bioquímica ao uso do sangue autólogo da recuperação intra-operatória, mas acreditam que as células tumorais sofram danos estruturais no equipamento. E ainda não fizeram uso de filtro ou irradiação antes da administração deste sangue aos pacientes.

Estes dois estudos controlados de pacientes submetidos à prostatectomia radical (um retrospectivo e outro prospectivo) sugeriram que a recorrência do câncer não foi motivada pela reinfusão do sangue recuperado.

A importância da metilação do DNA é enfatizada pelo número crescente de doenças humanas (Inúmeras síndromes de “imprinting”, Lupus Eritematoso Sistêmico e câncer) que ocorrem quando esta informação epigenética não é adequadamente estabelecida, mantida e regulada através de modificações de histonas e pequenos RNAs (ROBERTSON 2005). Embora a hipermetilação de *GSTP-1* seja informativa em cerca de 90% dos casos de câncer de próstata, existe pouco conhecimento de como esta metilação aberrante “invade” uma ilha não metilada de CpG e como ela é mantida através das divisões celulares (ESTELLER 2005). A associação de hipermetilação em ilhas de CpG de *GSTP-1* no soro de pacientes após prostatectomia radical com recorrência bioquímica (aumento de PSA) foi determinada por BASTIAN et al. (2005). Através de metilação quantitativa, em estudo recente retrospectivo, outros autores também incluíram *GSTP-1* além de outros 5 genes (ROSENBAUM et al. 2005). Encontraram 37

pacientes (50%) com evidência de recorrência bioquímica, metástases e morte. Em análise multivariada para o tempo de progressão os fatores significativos foram: idade maior do que 60 anos, hipermetilação de *GSTP1*, *APC* e *Ciclina D2*. Concluíram que esse perfil de metilação possa ser prognóstico para o tempo de recorrência em pacientes com escore de Gleason 7 (3+4) e que deva ser validado com uma amostra maior. A grande especificidade de *GSTP1* foi o motivo da escolha desse gene para o nosso estudo. As análises qualitativas e quantitativas de metilação foram padronizadas e os resultados obtidos validaram nossa hipótese de trabalho. E a sensibilidade encontrada na metodologia utilizada está de acordo com a literatura.

As variáveis que podem influenciar nos nossos resultados são: a técnica cirúrgica, estadió pré-operatório e o perfil molecular do tumor. Além disso, o alto custo não nos possibilita uma avaliação de maior número de casos para garantir maior segurança. Entretanto, a relevância desse trabalho consiste em aplicar uma abordagem genômica específica na tentativa de elucidar as questões que envolvem a recuperação de sangue intraoperatória e câncer. Talvez um perfil de metilação para cada tumor possa ser utilizado para validar o uso do equipamento para outros tumores além do tumor de próstata. Existem poucos dados sobre o valor da metilação de *GSTP-1* como ferramenta clínica, mas trata-se de um gene com grande potencial de marcador biológico em câncer. Uma falta de padronização tem prejudicado as análises deste marcador biológico e a transferência dos resultados para a prática clínica. Uma maior consistência entre os estudos é necessária,

começando com a seleção de pacientes, técnicas para a coleta das amostras e finalmente com as análises de metilação (HOPKINS et al., 2007).

Acreditamos que esse estudo aliado ao avanço do conhecimento molecular dos tumores possa ser aplicado como modelo para outros genes e outras abordagens envolvendo tecnologias de larga escala como exemplo, o “array” de mitocôndria para o estudo de mutações e/ou inserções/deleções observadas em muitos tumores (CHATTERJEE et al. 2006).

6 CONCLUSÃO

O uso da recuperação autóloga de sangue intra-operatória foi validado com marcador tumoral específico em estudo piloto em câncer de próstata, associando filtro para remoção de leucócitos e irradiação, através de análises qualitativa e quantitativa de metilação para o promotor de *GSPT-1*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida ME, Serafin RC, Eça LPM. Apresentação de algumas técnicas utilizadas em biologia molecular. In: Eça LPM, editor. **Biologia molecular guia prático e didático**. São Paulo: Revinter; 2004. p.155.

[ATCC]. American Type Culture Collection. **Catálogo de linhagens**. Available from: <URL:<http://www.atcc.org/common/catalog/cellBiology/cellBiologyIndex.cfm>> [2006 out 6].

Bastian PJ, Palapattu GS, Lin X, et al. Preoperative serum DNA *GSTP1* CpG island hypermethylation and the risk of early prostate-specific antigen recurrence following radical prostatectomy. **Clin Cancer Res** 2005; 11:4037-43.

Chatterjee A, Mambo E, Sidransky D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. **Oncogene** 2006; 25:4663-74.

Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic Acids Res** 1994; 22:2990-7.

Clark SJ, Melki J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? **Oncogene** 2002; 21:5380-7.

Corey E, Arfman EW, Liu AY, Vessella RL. Improved reverse transcriptase-polymerase chain reaction protocol with exogenous internal competitive control for prostate-specific antigen mRNA in blood and bone marrow. **Clin Chem** 1997; 43: 443-52.

Davis M, Sofer M, Gomez-Marin O, Bruck D, Soloway MS. The use of cell salvage during radical retropubic prostatectomy: does it influence cancer recurrence? **BJU Inter** 2003; 91:474-6.

Demarzo A, Nelson WG, Isaacs WB, Epstein JI. Pathological and molecular aspects of prostate cancer: prostate cancer II. **Lancet** 2003; 361:955-64.

Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman OG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. **Cancer Res** 1999; 59:67-70.

Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene** 2002; 21:5427-40.

Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. **Lancet** 2003; 4:351-8.

Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 2005; 45:629-56.

Goessl C, Müller M, Straub B, Miller K. DNA alterations in body fluids as molecular tumor markers for urological malignancies. **Eur Urol** 2002; 41:668-76.

Goldenberg D, Harden S, Masayesva BG, et al. Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2004; 130:39-44.

Graham ID, Fergusson D, McAuley L, Laupacis A. The use of technologies to minimize exposure to perioperative allogeneic blood transfusion in elective surgery. **Int J Technol Assess Health Care** 2000; 16:229-41.

Gray CL, Amling CL, Polston GR, Powell CR, Kane CJ. Intraoperative cell salvage in radical retropubic prostatectomy. **Urology** 2001; 58:740-5.

Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. **Hum Genet** 1989; 83:155-8.

Harden SV, Guo Z, Epstein JI, Sidransky D. Quantitative GSTP-1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma. **J Urol** 2003; 169:1138-42.

Hansen E, Wolff N, Knuechel R, Ruschoff J, Hofstaedter F, Taeger K. Tumor cells in blood shed from surgical field. **Arch Surg** 1995; 130:387-93.

Hansen E, Knuechel R, Altmeyen J, Taeger K. Blood irradiation for intraoperative autotransfusion in cancer surgery: demonstration of efficient elimination of contaminating tumor cells. **Transfusion** 1999; 39:608-15.

Hansen E, Bechmann V, Altmeyen J. Intraoperative blood salvage in cancer surgery: safe and effective? **Transfus Apher Sci** 2002; 27:153-7.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 2005; 45:51-88.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation – specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:9821-6.

Hopkins TG, Burns PA, Routledge MN. DNA methylation of *GSTP-1* as a biomarker in diagnosis of prostate cancer. **Urology** 2007; 69:11-6.

Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, et al. Quantitative GSTP1 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer. **Urology** 2002; 60:1131-5.

Katz AE, Vries GM, Olsson CA, et al. Molecular staging of genitourinary malignancies. **Urology** 1996; 47:948-58.

Koppal T. Troubleshooting assay design for quantitative PCR. **Drug Discovery Dev.** [serial online] 2004; (3). Available from: <URL:<http://www.dddmag.com/ShowPR.aspx?PUBCODE=016&ACCT=1600000100&ISSUE=0403&RELTYPE=PR&ProdCode=00000000&PRODLETT=AA>> [2006 out 26]

Laird P. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:253-66.

Lee WH, Morton RA, Epstein JI, et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91:11733-7.

Millar DS, Ow KK, Paul CL, Russell PJ, Molloy PL, Clark SJ. Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer. **Oncogene** 1999; 18:1313-24.

Miller GV, Ramsden CW, Primrose JN. Autologous transfusion: an alternative to transfusion with banked blood during surgery for cancer. **Br J Surg** 1991; 78:713-5.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2003.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2006 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Muscari F, Suc B, Vigouroux D, et al. Blood salvage autotransfusion during transplantation for hepatocarcinoma: does it increase the risk of neoplastic recurrence? **Transpl Int** 2005; 18:1236-9.

Neider AM, Carmack AJK, Sved PD, Kim SS, Manoharan M, Soloway MS. Intraoperative cell salvage during radical prostatectomy is not associated with greater biochemical recurrence rate. **Urology** 2005; 65:730-4.

Nelson WG, DeMarzo AM, Isaacs WB. Mechanisms of disease-prostate cancer. **N Engl J Med** 2003; 349:366-81.

Poli MCC, Villa LL, Colella R, Deheinzelin D. Molecular evidence of tumor cell removal from salvaged blood after irradiation and leucocyte depletion. **Trans Med** 2004; 14:151-55.

Poli, MCC, Villa LL, Colella R, Deheinzelin D. Molecular evidence of tumor cell removal from salvaged blood after irradiation and leucocyte depletion-the search must go on. **Trans Med** 2006; 16:215-6.

Robertson KD. DNA methylation and human disease. **Nat Rev Genet** 2005; 6:597-609.

Rosenbaum E, Hoque MO, Cohen Y, et al. Promoter hypermethylation as an independent prognostic factor for relapse in patients with prostate cancer following radical prostatectomy. **Clin Cancer Res** 2005; 23:8321-5.

Ruggeri A, Comai G, Belloni M, Zanella A. A simulation study for the design of a control system for the blood concentration process in autotransfusion. **Ann Biomed Eng** 2000; 28:470-82.

Shi XB, Gumerlock PH, Evans CP, White RW. Prostate cancer. In: Kurzroch R, Talpaz M, editors. **Molecular biology in cancer medicine**. 2nd ed. London: Martin Dunitz; 1999. p.412-4.

Stoffel JT, Topjian L, Libertino JA. Analysis of peripheral blood for prostate cells after autologous transfusion given during radical prostatectomy. **BJU Inter** 2005; 96:313-15.

Torella F, Haynes SL, Lardi A, O'Dwyer ST, Mc Collum CN. Unchanging attitudes to autologous transfusion in the UK. **Transfus Med** 2001; 11:15-9.

Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:223-31.

Vamvakas EC, Blajchman MA. Deleterious clinical effects of transfusion-associated immunomodulation: fact or fiction ? **Blood** 2001; 97:1180-95.

Yaw PB, Sentany M, Link WJ, Wahle WM, Glover JL. Tumor cells carried through autotransfusion. Contraindication to intraoperative blood recovery? **JAMA** 1975; 231:490-1.

Waters J. indications and contraindications of cell salvage. **Transfusion** 2004; 44: 40S-44S.

Zhu J, Yao X. Use of DNA methylation for cancer detection and molecular classification. **J Biochem Mol Biol** 2007, 40:135-41.

Zulim RA, Rocco M, Goodnight JE, Smith GJ, Krag DN, Schneider PD.
Intraoperative autotransfusion in hepatic resection for malignancy. Is it safe?
Arch Surg 1993; 128:206-11.

ANEXO

Anexo 1 – Artigo submetido na revista Lancet Oncology

Intraoperative autologous blood recovery in prostate cancer surgery: *in vivo* validation using *GSTP-1* promoter hypermethylation as a tumour marker.

MCC Poli*, Camargo AA[#], LL Villa[#], RP Moura[#], R Colella* and D Deheinzelin**

Department of Transfusion Medicine* and Intensive Care Unit ** of the Hospital do Câncer, São Paulo; Ludwig Institute for Cancer Research at Hospital Alemão Oswaldo Cruz[#], São Paulo, Brazil.

Correspondence and address reprint requests to: Mônica Cristóvão Poli, MD, Hospital do Câncer / AC Camargo, Rua Professor Antonio Prudente, 211-CEP: 01509-010, São Paulo, Brasil; e-mail: mccpoli@hcancer.org.br.

Supported in part by the Banco de Sangue de São Paulo, São Paulo, Brasil.

ABSTRACT

BACKGROUND: Intraoperative autologous blood recovery (IABR) during prostate cancer surgery is rarely performed due to the potential contamination of tumour cells. Different trials to eliminate this risk are reported and the safety is proved only by similar survival between allogeneic and autologous transfusion oncology patients. *GSTP-1* promoter hypermethylation is a specific and sensitive molecular marker for prostate cancer, since it is present in more than 90% of prostate tumours and can be readily detected with PCR-based techniques. Using *GSTP-1* promoter hypermethylation as a tumour marker, we demonstrated in this study that tumour cells could be removed from IABR using leucodepletion filters and irradiation.

METHODS: We performed IABR in radical retropubic prostatectomy without reinfusion. Fifty patients with *GSTP-1* promoter hypermethylation in fresh primary prostate tumour samples were included in the analysis. Peripheral blood samples were collected during anaesthetic induction. Salvaged blood was collected throughout the surgery and then submitted to washing, leukoreduction and irradiation. Samples were analysed stepwise for the presence of *GSTP-1* promoter hypermethylation using real time methylation specific PCR. *Beta-actin* amplification was used as a positive control for PCR detection.

FINDINGS: Positive hypermethylation was found in washed salvaged blood from four patients. After filtration and irradiation of the recovered blood, *GSTP-1* promoter hypermethylation could not be detected in any of the cases analyzed, denoting the absence of viable tumour cells.

INTERPRETATION: Our results indicate that the risk of disseminating tumour cells during IABR in prostate cancer surgery can be decreased substantially by filtration and irradiation of this blood.

Key words: intraoperative blood recovery; prostate cancer; biomarker; autologous blood, *GSTP-1*, methylation.

INTRODUCTION

Any hospital, which performs surgery with a significant blood loss, may wish to consider the introduction of intraoperative autologous blood recovery (IABR) practices. Then a critical evaluation of the indications for applying this technology is required and all lost blood should be captured and returned whenever possible. In addition to well-known complications of allogeneic blood some data suggested that the quality of own washed blood obtained is better than a stored allogeneic unit.¹ Oncologic patients have been submitted to IABR without standardization in terms of the use of leucodepletion filters, irradiation, neither or both. Also, the safety of this routine is proved by relatively short follow-up in retrospective studies for tumour surgeries.²⁻³

Radical retropubic prostatectomy (RRP) may be associated with significant blood loss. Estimated blood loss, which ranges from 770 ml to 1575 ml, may be affected by: variability in anatomy; difficulty in controlling the dorsal venous complex; age; comorbidities and surgeon experience.³⁻⁴ Given the blood loss associated with RRP, blood transfusions may be required. Autologous transfusion is preferred, to avoid the potential for adverse reactions from allogeneic transfusion, and one suggested method is IABR because anaemia of cancer patients does not interfere. However, there is a theoretical risk of metastasis following IABR, since the dispersal of tumour cells during IABR has been described.⁵

With the aim of establishing tools to better determine the safety of IABR in cancer patients, we have previously simulated the recovery of tumour cells from salvaged blood by adding known quantities of cultured tumour cells to blood bags. After saline washing, leukoreduction and irradiation, cell and DNA viability were determined. Failure to detect the ubiquitous β -globin gene by PCR following leukoreduction and irradiation,⁶ suggested that tumour cells had been removed from the blood samples. To confirm this hypothesis, and address experimental limitations

of using cell lines, we determined to validate our findings using tumour cells obtained by intraoperative recovery and a tumour-specific molecular marker.⁷

Abnormal methylation of gene promoter regions is a common phenomenon in different types of tumours and is associated with gene silencing. Hypermethylation of gene promoters has been explored as both a mechanism and marker of tumorigenesis. Hypermethylation of the pi-class glutathione-S-transferase (*GSTP-1*) gene promoter is the most frequent somatic alteration occurring during prostate cancer development. *GSTP-1* promoter hypermethylation occurs at a high frequency (90-96%) in prostate tumours and has been detected in the urine and ejaculate of men with the disease. Hypermethylation of the *GTSP-1* promoter is highly specific for the presence of tumour and is not typically present in normal prostatic tissue. *GSTP-1* promoter hypermethylation can be detected with a highly sensitive and reproducible methodology named real time Methylation Specific Polymerase Chain Reaction (MS-PCR).⁸MS-PCR can detect a single methylated allele in 10000 unmethylated alleles.⁹

Although some studies have demonstrated that white blood cells (WBC) depletion filters are highly effective at removing tumour cell contamination¹⁰ or only irradiation,¹¹in Brazil, it is not a recommended routine.¹²In the present work, we have applied the quantitative detection of *GSPT-1* promoter hypermethylation to indirectly assess the presence of tumour cells in salvaged blood submitted to WBC depletion filters and irradiation and to evaluate the risk of tumour cell dissemination during IABR for prostate cancer surgery.

PATIENTS AND METHODS

Patients

The study included patients with localized prostate cancer who underwent RRP with simultaneous bilateral pelvic lymphadenectomy, at the Urology Division of the Pelvic Surgery Department of the Hospital do Cancer, São Paulo, Brazil, between May and October 2006. Samples were collected after explicit informed consent and the study was reviewed and approved by the institution's ethics committee. At the time of surgery, tumour specimens were "snap frozen" and submitted to histologic examination to confirm the presence of tumour. Only patients with *GSTP-1* hypermethylation in the primary tumour were considered for further analysis.

IABR was performed in a Compact A[®] (Dideco, Mirandola, Italy) device and the recovered blood submitted to 1000 mL saline washing. In accord with Brazilian legislation, the recovered blood was not reinfused.¹²

Blood samples (20ml) from each patient were collected at five time points during surgery and blood recovery: 1) whole blood during anaesthetic induction; 2) recovered blood from the intraoperative field; 3) recovered blood from the intraoperative field after washing; 4) recovered blood from the intraoperative field after washing and filtration (Leukotrap[®] RC-Pall, IL, NY or TLR[®], Lakewood, CO, USA) and 5) recovered blood from the intraoperative field after washing, filtration and irradiation with 25 Gy (Gammacell 3000[®], Nordion, Canada). Aspirated volumes ranged from 200 to 1300 mL, with aspiration ceased if semen and urine entered the surgical field. Nucleated cells in the blood samples were concentrated by density gradient centrifugation (Ficoll-Paque Plus[™] Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) and frozen until DNA extraction was performed.

DNA extraction and bisulfite conversion

DNA from primary tumours and blood samples was isolated by digestion with 100µg/ml proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA) followed by standard phenol-chloroform (1:1) extraction and ethanol precipitation. DNA was subjected to sodium bisulfite treatment to modify unmethylated cytosine to uracil. Briefly, NaOH was added to denature DNA (final concentration 0.3M) and incubated for 20 minutes at 50°C. A volume of 500ul of freshly made bisulfite solution (2.5M sodium metabisulfite and 125mM hydroquinone, pH5.0) was added to each sample and incubation was continued at 70°C for 3 hours. Modified DNA was purified using Wizard (Promega Corp., Madison, Wisconsin) DNA purification resin¹³ according to manufacturer recommendations and eluted in 45ul water at 80°C. After treatment with NaOH (final concentration 0.3M) for 10 minutes at room temperature isolation was continued with 75ul 5M-ammonium acetate, followed by a 5-minute incubation at room temperature. Modified DNA was precipitated by adding 2.5 volumes of 100% ethanol and 1ul of glycogen (10mg/ml). The DNA pellet was washed with 70% ethanol, dried, and eluted in 20ul TE buffer.

Real time methylation specific PCR

Bisulphite converted DNA was amplified by fluorescence based real-time methylation specific PCR in an Applied Biosystems ABI 7300® (Perkin Elmer, Foster City, California). Fluorogenic probes and primers were synthesized by IDT Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA). The primers were designed to amplify bisulphite converted DNA at the 5` end of *GSTP-1* and the β actin internal reference gene (*ACTB*). Primers and probes for the *ACTB* gene were located in an area without CpG nucleotides, thus, allowing gene amplification independent of methylation status. The primer and probe sequences were *GSTP-1* (140 bp

amplicon, Genbank accession M24485, position 1,033-1,172), 5'-AGTTGCGCGGCGATTC-3'(sense), 6FAM-5'CGGTCGACGTTTCGGGGTGTAGCG-3'-TAMRA (probe) and 5'GCCCCAATACTaaatcacgacg-3'(antisense) and ACTB (133 bp amplicon, Genbank accession Y00474, position 390-522), 5'-TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT-3'(sense), 6FAM-5'ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA-3'TAMRA (probe) and 5'-AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA-3' (antisense).¹⁴

The final PCR reaction mixture consisted of 600 nM of each primer; 400 nM of probe; 1U of Platinum Taq DNA Polymerase; 1.25 mM dNTP; 1.5 mM MgCl₂ Rox Reference Dye and 3 µL bisulphite converted DNA, in a reaction volume of 25 µL. PCR was performed at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. All samples were run in duplicate. Leucocyte DNA treated *in vitro* with Sss Methyltransferase (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA) to methylate DNA at all CpGs, served as the positive control for all genes. Serial dilutions of this methylated DNA (90 ng; 9 ng; 0.9 ng; 0.09 ng and 0.009 ng) were performed to construct a standard curve. These values are equivalent to 10,000; 1,000; 100; 10 and 1 cells, respectively, considering a conversion factor of 9 pg DNA per diploid cell.

RESULTS

The surgical staff involved 3 different teams of oncologist surgeons. The range of the aspirated volume was 200 to 1300 mL until the bladder opening. The aspiration was broke off when fluids like semen and urine shed in surgical field. Adenocarcinoma was detected in eighteen fresh samples at surgery time and fifteen patients (83,3%) showed *GSTP-1* promoter hypermethylation in tumour specimens. Presurgical clinical characteristics of patients included are described in table 1. In these fifteen patients, five had a malignancies history (33,3%) and two patients (13,3%) were transfused in operating room.

In terms of blood samples, seventy-five patient samples were analyzed by real time PCR for both genes indicating absence of *GSTP-1* methylation after irradiation in all cases and confirmed by positive *ACTB*/DNA control, as we shown in figure 1. Four patients (26,6%) presented positive promoter hypermethylation for *GSTP-1* in samples after washing and after washing and leucodepletion. In all patients this positive result was not found after irradiation as we shown in table 2. Indeed, only one patient between two biochemical recurrences was positive for *GSTP-1* promoter hypermethylation in recovered blood. However, in patients 10 and 11 another type of leucodepletion filter was used and therefore we find differences in tumour contamination levels in recovered blood. The association between leucodepletion filters and irradiation was never described before.

Table1. Presurgical clinical characteristics of patients undergoing radical retropubic prostatectomy (RRP) with *GSTP-1* promoter hypermethylation in resected tumour samples.

Patient ID	Surgical team	Age (years)	PSA (ng/mL)	Biopsy Gleason Score
1#	B	58	6,3	8
2	B	73	21,8	6
3#	C	59	3,7	6
4	C	66	2,9	6
5	B	52	5,6	6
6	A	64	23,7	7
7	B	60	8,5	7
8	B	62	7,1	6
9	C	47	6,1	6
10	A	41	78,8	9
11	C	63	5,6	7
12	C	61	3,7	7
13	A	68	4,2	6
14	C	71	5,4	7
15	B	75	4,6	7
Mean		61,3	12,8	
(Min-max)		(41-75)	(2,9-78,8)	
Standard deviation		9,3	20,0	
Median		62	5,6	
N		15	15	

Surgical teams: A = 3 surgeries, B and C = 6 surgeries.

Patient identification (ID): # = biochemical recurrence.

Table 2. Real time methylation specific PCR results from patient's blood taken during radical retropubic prostatectomy (RRP) and submitted to intraoperative autologous blood recovery (IABR).

Patient/sample ID	Whole blood during anaesthetic induction		Recovered blood from intraoperative field		Recovered blood from intraoperative field after washing		Recovered blood from intraoperative field after washing and filtration		Recovered blood from intraoperative field after washing, filtration and irradiation	
	<i>ACTB</i>	<i>GSTP</i>	<i>ACTB</i>	<i>GSTP</i>	<i>ACTB</i>	<i>GSTP</i>	<i>ACTB</i>	<i>GSTP</i>	<i>ACTB</i>	<i>GSTP</i>
1#	5+	0	3+	0	4+	+	+	0	4+	0
2	4+	0	3+	0	3+	0	+	0	+	0
3#	3+	0	3+	0	4+	0	4+	0	4+	0
4	2+	0	+	0	2+	0	+	0	+	0
5	+	0	+	0	2+	0	+	0	+	0
6	2+	0	+	0	2+	0	+	0	+	0
7	+	0	+	0	2+	0	+	0	+	0
8	2+	0	+	0	2+	+	+	0	+	0
9	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0
10	4+	0	4+	0	4+	2+	2+	2+	2+	0
11	4+	0	4+	2+	4+	0	2+	2+	2+	0
12	4+	0	4+	4+	4+	0	3+	0	+	0
13	3+	0	3+	0	2+	0	+	0	+	0
14	3+	0	3+	0	3+	0	+	0	+	0
15	3+	0	3+	0	4+	0	+	0	+	0

Representation of DNA amplification results in equivalent cells as follows: 0) undetected; +) 1-10 cells; 2+) 10-100 cells; 3+) 100-1,000 cells; 4+) 1,000-10,000 cells and 5+) more than 10,000 cells. The quantification of blood sample DNA was calculated from a standard curve generated from each PCR plate. Patient identification (ID): # = biochemical recurrence.

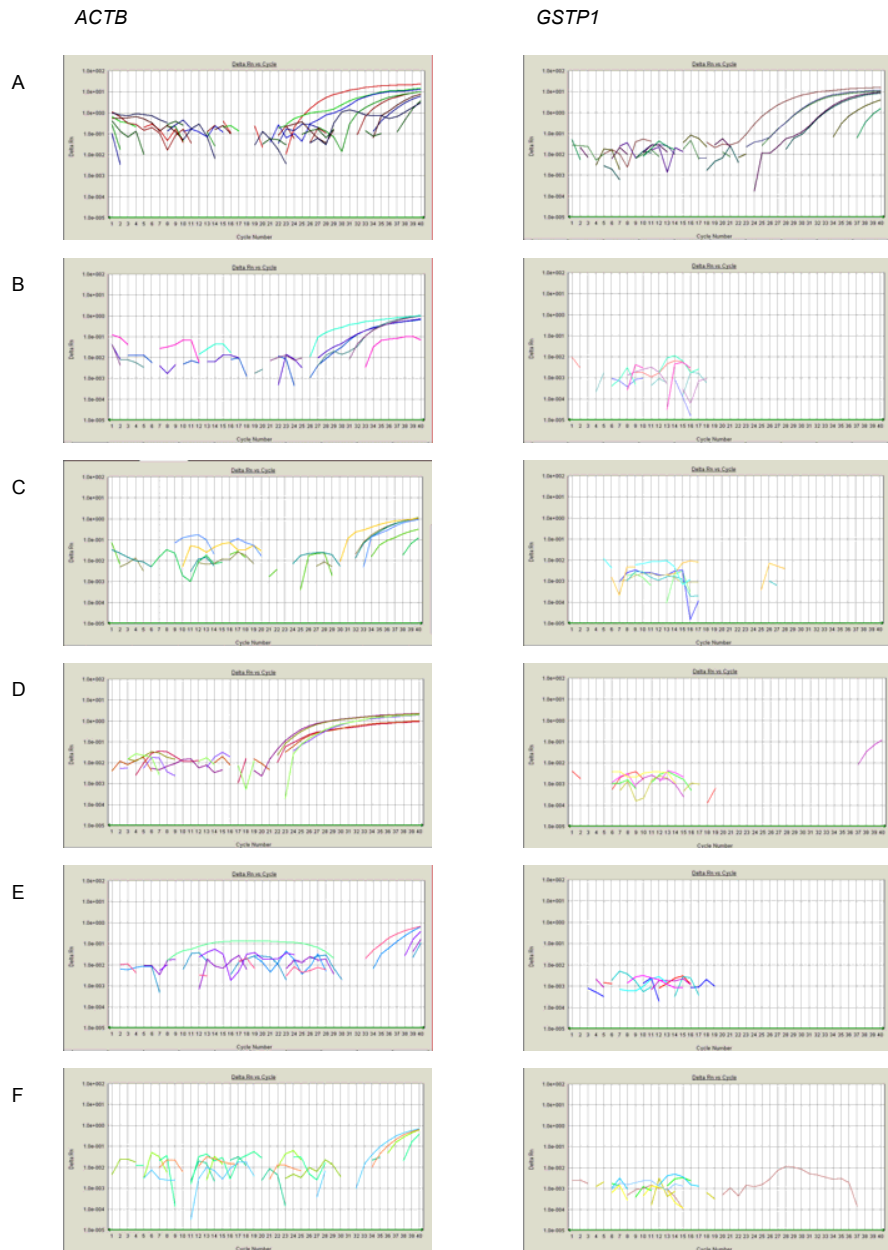


Figure 1. Standard curve and amplification results for *ACTB*/*GSTP-1* from three patients.

A) Standard curve; B) whole blood during anaesthetic induction; C) recovered blood from intraoperative field; D) recovered blood from intraoperative field after washing with a positive methylation result for *GSTP-1*; E) recovered blood from intraoperative field after washing and filtration and F) recovered blood from intraoperative field after washing, filtration and irradiation

DISCUSSION

In this study, we have shown that cells with *GSTP-1* methylation could not be detected following filtration and irradiation of recovered blood from patients with demonstrated *GSTP-1* methylation in fresh tissue specimens. As such, the final number of cases included was small. One possible explanation is the fact that we did not use laser capture micro dissection¹⁵ thus reducing our ability to detect the methylation in specimens often presenting large amounts of normal prostate tissue. Our mean of blood recovery was 400 mL is in the expected range considering the high experience of our surgical staff.⁴ Since two patients required allogeneic blood transfusion at operating room, IABR would be beneficial in this small cohort similarly to previous studies.¹⁶

Previous clinical studies indirectly estimated the presence of circulating cancer cells using survival of prostate cancer patients. Its use stands upon studies, either retrospective or prospective,¹⁷ that did not show increase in recurrence after IABR use. These clinical studies are also limited by a short follow up: 63 to 79% of patients submitted to radical prostatectomy remain disease free over 10 years, depending on the definition of biochemical recurrence.¹⁸ RT-PCR assays have been used to monitor the potential spillage of prostate cells into the circulation due to therapeutic interventions. However, this assay, unlike the use of a tumour-specific marker, such as *GSTP-1*, is unable to discriminate normal cells from prostate tumour cells. However, the clinical impact of these observations is far from clear. At present, the biology of, in particular, the metastatic potential of circulating prostate cells and their haematogenous clearance has not been established.¹⁹ RNA targets are organ but not tumour-specific, consequently, RT-PCR based detection methods appear to be of limited value as routine tumour markers for the detection of

urological malignancies in body fluids. Contrasting with mRNA based assays, DNA – based molecular tumour markers are characterized by marked tumour specificity.²⁰

Interestingly, the recovered blood from intraoperative field after washing demonstrated positive results to *GSTP-1* hypermethylation, corresponding a smaller detection of 1-10 cells at this point (patients 1 and 8).

The use of different filters was also assessed in this study. Besides the filter's physical properties (e.g. pore size), filtration is influenced by several process parameters (e.g., flow rate, temperature, priming and rising) and the characteristics of the component to be filtered (e.g., storage history of the component, number of leucocytes and number of platelets). Filtration results, even with the same filter, may vary under different conditions, thus Standard Operating Procedures (SOP) should be developed and fully validated.^{21,22} In these patients, contrariwise to the results with Leukotrap,[®] we were able to identify *GSTP-1* methylation bearer cells after filtration. These results point out to the necessity of irradiation in order to guarantee the elimination of tumour cells in the recovered blood as previously suggested.^{6, 7, 11} Again, our testing by the association of WBC depletion filters and irradiation showed differences with two types of WBC depletion filters, using real time methylation specific PCR. This data indicates that more investigation is required to assess the appropriate filter in cancer issue.

This pilot study has shown that filtration and irradiation of salvaged blood is sufficient to ensure that tumour cells are removed from IABR during radical prostatectomy.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the contribution of the surgeons from the Urology Department, anesthesiologists and pathologists from the AC Camargo Hospital; and the researchers from Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, Brazil. We are also grateful to Pall Medicals and Dideco suppliers for kindly providing WBC depletion filters and autotransfusion kits.

REFERENCES

1. Waters JR, Meier HH, Waters JH. An economic analysis of costs associated with development of a cell salvage program. *Anesth Analg* 2007; 104: 869-75.
2. Davis M, Sofer M, Gomez-Marin O, Bruck D, Soloway MS. The use of cell salvage during radical retropubic prostatectomy: does it influence cancer recurrence? *BJU Inter* 2003; 91:474-6.
3. Neider AM, Carmack AJK, Sved PD, Kim SS, Manoharan M, Soloway MS. Intraoperative cell salvage during radical prostatectomy is not associated with greater biochemical recurrence rate. *Urology* 2005; 65:730-4.
4. Dash A, Dunn RL, Resh J, Wei JT, Montie JE, Sanda MG. Patient, surgeon and treatment characteristics associated with homologous blood transfusion requirement during radical retropubic prostatectomy: multivariate nomogram to assist patient counseling. *Urology* 2004; 64:117-22.
5. Yaw PB, Sentany M, Link WJ, Wahle WM, Glover JL. Tumor cells carried through autotransfusion. Contraindication to intraoperative blood recovery? *JAMA* 1975; 231:490-1.
6. Poli, MCC, Villa LL, Colella R, Deheinzelin D. Molecular evidence of tumor cell removal from salvaged blood after irradiation and leucocyte depletion. *Transfus Med* 2004; 14:151-5.
7. Poli, MCC, Villa LL, Colella R, Deheinzelin D. Molecular evidence of tumor cell removal from salvaged blood after irradiation and leucocyte depletion- the search must go on. *Transfus Med* 2006; 16:215-6.
8. Hopkins TG, Burns PA, Routledge MN. DNA methylation of *GSTP-1* as a biomarker in diagnosis of prostate cancer. *Urology* 2007; 69:11-6.

9. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002; 21:5427-40.
10. Waters JH. Indications and contraindications of cell salvage. *Transfusion* 2004; 44:40S-44S.
11. Hansen E, Bechmann V, Altmeyden J. Intraoperative blood salvage in cancer surgery: safe and effective? *Transfus Apher Sci* 2002; 27:153-7.
12. Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004 ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 24 de junho de 2004. Brasil Available from:<URL: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>> [2007 February 08]
13. Goldenberg D, Harden S, Masayesva BG, et al. Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130:39-44.
14. Harden SV, Guo Z, Epstein JI, Sidransky D. Quantitative GSTP-1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma. *J Urol* 2003; 169:1138-42.
15. Hanson JA, Gillespie JW, Grover A, Tangrea MA, Chuaqui RF et., al Gene promoter methylation in prostate tumor-associated stromal cells. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(4):255-61.
16. Waters JH, Lee JS, Klein E, O'Hara J, Zippe C, Potter PS. Preoperative autologous donation versus cell salvage in the avoidance of allogeneic transfusion in patients undergoing radical retropubic prostatectomy. *Anesth Analg* 2004; 98: 537-42.
17. Stoffel JT, Topjian L, Libertino JA. Analysis of peripheral blood for prostate cells after autologous transfusion given during radical prostatectomy. *BJU Inter* 2005; 96:313-15.

18. Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham JA, Dotan ZA et., al. Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. *J Clin Oncol* 2006; 24:3973-8.
19. Schamhart DHJ, Maiazza R, Kurth KH. Identification of circulating prostate cancer cells: a challenge to the clinical implementation of molecular biology (review). *Intern J Oncol* 2005; 26: 565-77.
20. Goessl C, Müller M, Straub B, Miller K. DNA alterations in body fluids as molecular tumor markers for urological malignancies. *Eur Urol* 2002; 41: 668-76.
21. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components 11th ed. January 2005, Council of Europe Publishing, Strasbourg Cedex, p.68
22. Klein HG e Anstee D. Mollison`s blood transfusion in clinical medicine. 11th ed. Padstow: Blackwell Publishing 2005. Immunology of leukocytes, platelets and plasma components; p.546-610.