

**PRESENÇA DE CÉLULAS TUMORAIS EM
SANGUE RECUPERADO?**

MÔNICA CAAMAÑO CRISTOVÃO POLI

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Mestre em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**ORIENTADOR: DR. DANIEL DEHEINZELIN
CO-ORIENTADORA: DRA. LUISA LINA VILLA**

**São Paulo
2002**

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Poli, Mônica Caamaño Cristovão.

Presença de células tumorais em sangue recuperado?/ Mônica Caamaño Cristovão Poli. -- São Paulo, 2002.

58p.

Dissertação (mestrado)—Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências—Área de concentração:

Oncologia.

Orientador: Daniel Deheinzelin

Descritores: 1. TRANSFUSÃO AUTÓLOGA/efeitos adversos.
2.NEOPLASIA/sangue. 3. NEOPLASIA/cirurgia. 4. PERDA SANGUINEA
CIRURGICA.

“Sem a convicção de uma harmonia íntima do Universo, não poderia haver ciência. Esta convicção é, e continuará a ser a base de toda a criação

científica. Em toda a extensão dos nossos esforços, nas lutas dramáticas entre as velhas e as novas concepções, entrevemos a ânsia eterna de compreensão, a intuição inabalável da harmonia universal, que se robustece na própria multiplicidade dos obstáculos que se oferecem ao nosso entendimento”.

(Palavras lapidares de Einstein – Huberto Rohden)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Lourdes e Antonio, pela constante preocupação e cuidados com a minha formação.

Ao meu filho Daniel e meu esposo Vanderlei, pelo incentivo e compreensão em todos os momentos.

Ao Dr. Arthur Biancalana Junior, pela competência ao transmitir sua experiência aos hemoterapeutas da sua equipe (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Dr. Daniel Deheinzelin por sua orientação e atenção dispensadas, tornando possível a realização deste estudo.

Dra. Luisa Lina Villa por sua orientação e colaboração efetiva na metodologia deste trabalho.

Dr. Rafael Colella, Diretor do Departamento de Hemoterapia e Hematologia do Hospital do Câncer e do Banco de Sangue de São Paulo (BSSP), por sua amizade e paciência. Agradeço a oportunidade oferecida e a todos do BSSP.

Aos amigos, pela atenção e a convivência feliz que enriqueceram este período:

- Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer: Carol, Laura, Paulo, Neide, José Carlos, João e Rômulo.
- Pós-Graduação: Dr. Luíz Fernando, Ana e Márcia.
- Biblioteca: Suely, Rosi, Alessander.

A todos que oferecem o melhor de si a humanidade, incluindo aqueles que a morte foi incapaz de apagar suas contribuições para o conhecimento.

RESUMO

Poli, MCC. **Presença de células tumorais em sangue recuperado?** São Paulo, 2002. [Dissertação de mestrado – Fundação Antonio Prudente]

Introdução: O desafio da Medicina Transfusional moderna é a produção de hemocomponentes livres de agentes infecciosos e células indesejáveis contaminantes, além de desenvolver e praticar técnicas conservadoras de sangue. Neste momento, a transfusão autóloga ganha importância com o conhecimento de que algumas moléculas e células estocadas no sangue, como os leucócitos, possuem efeitos adversos no receptor da transfusão. Os pacientes oncológicos têm um grande consumo de transfusão, principalmente em cirurgia, e são impedidos de participar de programas de autotransfusão pela anemia do câncer ou pelo risco de disseminação do tumor com a utilização de recuperação autóloga intra-operatória. Entretanto, estes mesmos pacientes são submetidos a transplante autólogo de células progenitoras periféricas com o mesmo potencial de reinfusão de células tumorais. **Objetivo:** Estudar a qualidade do concentrado de hemácias, artificialmente adicionado de células tumorais, submetido a lavagem, leucorredução e irradiação, através de viabilidade celular e a presença de DNA genômico. **Materiais e métodos:** Cultura de linhagens representativas de tumores sólidos mais frequentes: carcinoma (HeLa), melanoma (SK-MEL) e sarcoma (SaOS) foram inoculadas em 10 unidades de sangue total frescas colhidas no banco de sangue do Hospital do Câncer - São Paulo, em quantidades de 10, 10^2 e 10^6 células/ml após o teste de exclusão pelo trypan blue. Cada doação foi fracionada em 4 para receber as três diferentes quantidades de células tumorais, permanecendo um controle negativo. Submetidas seqüencialmente à lavagem com 1000 ml de solução salina, leucorredução com filtro PALL, Purecell Neo e irradiadas com 25 Gy em uma fonte de césio do Gammacell 3000. A cada etapa, amostras foram coletadas para estudo em triplicata de viabilidade celular com solução equimolar de acridine orange e iodeto de propídeo e quantificadas em câmara de Neubauer ao microscópio de imunofluorescência. As amostras também foram submetidas à purificação do DNA genômico e à reações de PCR/Multiplex visando a amplificação de um gene humano (Globina). Os produtos de DNA obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%

corados com brometo de etídio. **Resultados:** A média em porcentagem de células nucleadas viáveis, sem qualquer tratamento, analisadas em imunofluorescência foi 83%, independente do número e do tipo de células inoculadas. Após a lavagem, a média de células viáveis foi de 64% nos diferentes inóculos. As amostras submetidas à lavagem e leucorredução apresentaram ausência de células viáveis e o mesmo ocorreu nas amostras que prosseguiram até a irradiação. As análises de PCR/Multiplex confirmaram os achados de ausência de células e DNA para fragmentos de 268 pares de bases nas várias amostras submetidas a leucorredução e irradiação com 25 Gy, independente da linhagem ou da quantidade de células inoculadas. **Conclusão:** Através do emprego de um método de alta sensibilidade, como o PCR, verificou-se a ausência de DNA de pequeno tamanho após a leucorredução e a irradiação com 25 Gy. Dada a complexidade do assunto, a diversidade dos tumores e a ausência de estudos *in vivo*, esta proposta abre a perspectiva para estudos adicionais que permitam a sua aplicação na cirurgia oncológica.

Summary

Poli, MCC. **Presença de células tumorais em sangue recuperado?** [Tumor cells in blood salvage?] São Paulo, 2002. [Dissertação de mestrado – Fundação Antonio Prudente]

Introduction: The challenge of Transfusion Medicine is to infuse high purity products without infectious agents, undesirable cells and to practice conservative techniques to save blood. The knowledge about some molecules and cells stored in blood components, like leucocytes, have effects in immune system increases the role of autologous transfusion. Oncologic patients need many transfusions and are very difficult to participate in autologous program because they are anemic patients or dissemination risk with cell saver device. Nevertheless, those same patients could be submitted to autologous peripheral stem cell collection and reinfusion with the same potential risk to return tumoral cells. **Objective:** To study the red blood cells quality with tumor cells mixed, submitted to washing, leucorreduction and irradiation by viability cell and genomic DNA analysis. **Materials and methods:** Representative cell lines of solid tumors more frequent: carcinoma (HeLa), melanoma (SK-MEL) and sarcoma (SaOS), were mixed in 10 whole fresh blood bags harvested in Hospital do Cancer blood bank, São Paulo. Each donation was shared into 4 to receive 0, 10, 10^2 and 10^6 cells/ml after trypan blue exclusion test. Submitted in sequence to saline washing, leucorreduction with PALL, Purecell Neo and 25 Gy irradiation dose with Cesium source Gammacell 3000. Each step, samples were collected for triplicate viability assays with a stock solution of acridine orange and propidium iodide, loaded into a Neubauer hemocytometer and scored with a Nikon compound fluorescence microscope. Then, genomic DNA purification and PCR/Multiplex reaction were done in all samples to amplification human gen (Globin). DNA products obtained were separated by 1% agarose gel electrophoresis stained by ethidium bromide. **Results:** The mean percentage of nuclear cells analyzed by fluorescence microscope was 83%, without any treatment, independent of number or type of tumor cells. After washing, 64% of viable nuclear cells were demonstrated in different numbers of tumor cell lines. Samples submitted to washing and leucorreduction revealed negative results and the same happened for those samples that continued until irradiation. PCR/

Multiplex confirmed the absence of cells and 268 base pairs long DNA products when leucorreduction and irradiation were completed, in all samples.

Conclusions: A high sensibility test like PCR showed absence of small size DNA after leucorreduction and 25 Gy irradiation. As a result of subject complexity, tumors diversity and absence of *in vivo* studies, this proposal opens an expectance for another studies to allow the application in oncology surgery.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection

Gy: Gray

HPV-16:	Papilomavírus Humano 16
HPV-18:	Papilomavírus Humano 18
pb:	pares de bases
PCR:	reação em cadeia da polimerase
TAGVHD:	reação enxerto contra hospedeiro transfusional aguda
TRALI:	lesão pulmonar aguda transfusional
TRIM:	transfusão relacionada a imunomodulação
TTV:	vírus transmitidos por transfusão
UVA:	ultravioleta A

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Efeitos adversos da transfusão de hemácias e sua frequência
------------------	---

Tabela 2: *Primers* e suas seqüências.

Tabela 3: Média (%) dos resultados de viabilidade celular com acridine orange e iodeto de propídeo de células nucleadas com as diferentes linhagens e tratamentos utilizados.

Tabela 4: Análise qualitativa de reações de PCR/Multiplex para produtos de 268 pb de globina em reações com quantidades crescentes de DNA, após diferentes tratamentos e inóculos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** desenho do estudo.
- Figura 2:** viabilidade sem tratamento e após o término.
- Figura 3:** Média (%) da viabilidade e tratamento com inóculos de HeLa, SK-MEL e SaOS.
- Figura 4:** Integridade do DNA nas amostras submetidas a cada etapa do tratamento.
- Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio para produtos de PCR do gene de globina 268 e 599 pb com inóculo de HeLa.
- Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio para produtos de PCR/Multiplex do gene de β -*Globina* 268 pb com inóculos de HeLa, SK-MEL e SaOS.
- Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio para produtos de PCRMultiplex do gene de β -*Globina* 268 com inóculos de C-33 em amostras de plasma.
- Figura 8:** Filtro de leucócitos.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.	Leucodepleção	13
2.	Radiação ionizante	14
3.	Tratamento fotoquímico com luz ultravioleta A (UVA)	17
2.	JUSTIFICATIVA	18
3.	OBJETIVO	19
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	Simulação da presença de células tumorais	20
4.2	Preparo de unidades hemoterápicas	21
4.3	Tratamento realizado nas unidades e coleta de amostras	21
4.3.1	Fase 1: aplicação dos inóculos	21
4.3.2	Fase 2: lavagem	22
4.3.3	Fase 3: leucodepleção	22
4.3.4	Fase 4: irradiação	22
4.4	Estudo de viabilidade celular	23
4.5	Análise de DNA genômico	23
4.5.1	Purificação	23
4.5.2	Integridade do DNA	24
4.5.3	Análise qualitativa do DNA	24
4.5.4	Validação da reação de PCR	26
5.	RESULTADOS	28
5.1.	Viabilidade celular	28
5.2.	Análise de DNA	32

6.	DISCUSSÃO	40
7.	CONCLUSÃO	50
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ANEXO

Anexo 1 Artigo

1. INTRODUÇÃO

A descoberta da circulação sangüínea em 1613 por William Harvey chamou a atenção dos estudiosos da época para a possibilidade de transfusão de sangue. A primeira transfusão foi realizada com sangue de carneiro para um paciente com tifo. Seguiram-se tentativas de transfusão entre seres humanos, braço a braço, que não foram bem sucedidas e ficaram proibidas na Europa durante 150 anos.

Karl Landsteiner, em 1900, descobriu o sistema de grupo sangüíneo ABO e 40 anos depois com outros pesquisadores, o sistema RH (OBERMAN 1996). Os estudos de substâncias anticoagulantes e as necessidades de sangue durante a Segunda Guerra Mundial tornaram a Hemoterapia uma ciência capaz de oferecer suporte para o tratamento de diversas doenças. O desenvolvimento de equipamentos de separação de células (aférese) em 1960 permitiu a automatização do preparo de hemocomponentes para a transfusão.

Os primeiros casos de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, na década de 80, deslocaram a atenção dos hemoterapeutas para a importância da transmissão de doença infecciosa relacionada à transfusão. Na mesma época, surgiram indícios de que a transfusão poderia causar imunodepressão nos pacientes transfundidos, desencadeando uma série de estudos experimentais de imunomodulação.

A transfusão, nas duas últimas décadas, passou a ser considerada

prática de alto risco, determinando grandes avanços em técnicas sorológicas e metodologias para garantia da segurança na unidade hemoterápica (POPOVSKY e TRIULZI, 1996). Desde esta época, prevalece o pensamento: “A melhor transfusão é aquela que não foi realizada”.

A estratégia para evitar a transfusão de sangue homólogo inicia-se com uma correta indicação e prescrição do hemocomponente, que somente deverá ser utilizada, quando seus benefícios são mais significativos do que os seus riscos potenciais. Segundo VAMVAKAS e CARVEN (1998), a transfusão alogênica foi um fator independente responsável por maior tempo de internação, em um estudo de 487 pacientes submetidos à ressecção de câncer colorretal, sugerindo uma provável relação da transfusão com a maior incidência de complicações sépticas ou que a transfusão seja um marcador indireto de severidade da doença. Neste estudo, verificaram que 31,8% dos pacientes foram expostos a transfusão homóloga (concentrado de hemácias ou de plaquetas), com uma média de exposição a 3 doadores; 1% recebeu transfusão de plasma fresco; 16,6% albumina e 1,2% recebeu transfusão autóloga, integrados no grupo daqueles que não receberam transfusão. O grupo de pacientes transfundidos apresentava um período de internação de 16.7 ± 0.81 dias, comparado ao que não recebeu transfusão que foi de 10.3 ± 0.26 dias ($p < 0.0001$). Tentaram ajustar 20 variáveis que confundem e afetam a severidade da internação e concluíram que a transfusão alogênica foi um fator independente de associação com a maior permanência no hospital. Entretanto, não conseguiram explicar esta associação e sugeriram análises mais sensíveis

comparando transfusões autólogas, transfusões leucodepletadas para explorar o impacto dos efeitos deletérios da transfusão alogênica.

A Medicina Transfusional evolui com grandes desafios. Novas estratégias transfusionais consistem em minimizar a transfusão alogênica e maximizar a transfusão autóloga (GREENBURG 1997). Os últimos dez anos de programa de autotransfusão nos ensinam que uma maior interação de hemoterapeutas, anestesistas e cirurgiões poderá otimizar a conservação de sangue (GOODNOUGH e BRECHER 1998). O mundo inteiro tem problemas com estoque de sangue disponível. O rigor na seleção de doadores (entrevista e testes sorológicos) aliado à falta de conscientização da população que permeia as campanhas de doação, não garante o atendimento hemoterápico na maioria dos hospitais. O tratamento cirúrgico de pacientes oncológicos corresponde a 50% do movimento transfusional do Hospital do Câncer – São Paulo. Embora, o conhecimento tenha apontado os efeitos deletérios da transfusão (tabela 1), neste início de século, ainda somos dependentes do sangue humano.

Os substitutos sintéticos do sangue ainda têm uso restrito (SPENCE 1996):

- Soluções de hemoglobina modificadas quimicamente têm a desvantagem de uma alta afinidade pelo oxigênio, além de propriedades vasopressoras e nefrotóxicas.
- Produtos fluorocarbonados produzidos por meio de técnicas recombinantes de DNA parecem promissores para o transporte de oxigênio em situações de urgência, mas ainda não estão completamente

aprovados pelo FDA.

Portanto, ainda perseguimos o objetivo da produção de hemocomponentes e hemoderivados livres de agentes infecciosos (métodos de inativação viral e bacteriana) e de células indesejáveis contaminantes (métodos de leucodepleção, seleção de células CD 34+ ou a depleção de células T).

Tabela 1 - Frequência dos efeitos adversos da transfusão de hemácias (SIMON)

et al. 1998):

1. Efeitos imunológicos	Efeito/número de transfusões
1.1 Agudos	
Reação hemolítica Morte Incompatibilidade ABO	1 : 633. 000 1: 33. 000
Reação febril	1: 200
Aloimunização	1: 100
Reação alérgica	1: 333
TRALI*	1: 5. 000
Anafilaxia	1: 20. 000 a 1: 50. 000
1.2 Crônicos	
Reação hemolítica Hemólise	1: 4. 000
Formação de novo anticorpo	1: 1.500
Purpura pós-transfusional	Rara
TAGVHD*	Desconhecida
Imunomodulação	Desconhecida
2. Efeitos não imunológicos	
2.1 Agudos	
Sobrecarga circulatória	1: 100 a 1:200
Contaminação bacteriana	1: 1. 000. 000
2.2 Crônicos	
Hemossiderose	Rara
Virose: CMV *	3 a 12: 100
HBV*	1: 60. 000
HVC *	1: 100. 000
HTLV/II *	1: 600. 000
HIV-1*	1:450. 000 a 660. 000

HIV-2*	Rara
Parasitas: <i>Plasmodium</i> , <i>Babesia</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania</i>	Rara

* Legenda: TRALI = *Transfusion Reaction Acute Lung Injury*; TAGVHD = *Transfusion Acute Graft Versus Host Disease*; CMV= Citomegalovírus; HBV= Hepatite Vírus B; HCV = Hepatite Vírus C; HTLV = *Human T Lymphotropic Virus*; HIV= *Human Immunodeficiency Virus*.

A interpretação de estudos sobre infecção e recorrência de câncer associado à transfusão é complicada pela natureza do hemocomponente transfundido, a definição de infecção e o estado de imunodepressão que estes pacientes oncológicos possuem independente da transfusão (VAMVAKAS e BLAJCHMAN 2001).

As estratégias desenvolvidas para diminuir o uso de sangue homólogo são:

- Utilização de eritropoetina;
- Desenvolvimento de aférese peri-operatória;
- Autotransfusão pré-depósito;
- Hemodiluição normovolêmica aguda;
- Autotransfusão pós-operatória;
- Autotransfusão intra-operatória;

Segundo PRICE et al. (1996) o uso de eritropoetina estimula a eritropoese, permitindo a estocagem de mais unidades autólogas em pacientes com baixos

hematócritos, que serão submetidos à cirurgia ortopédica. Sugerem a necessidade de outros estudos a fim de determinar o esquema mais adequado, a via de administração e a relação custo benefício da terapia. Outros estudos descrevem a importância da produção de cola de fibrina autóloga, através de técnicas de aférese peri-operatória que possibilitam a coleta de plasma autólogo, para a produção de gel de fibrina e conseqüente redução das necessidades de sangue homólogo (ALVING et al. 1995).

Em Oncologia não estão excluídos os programas de autotransfusão pré-depósito, embora muitos pacientes tenham anemia pelos efeitos da doença e do seu tratamento. A coleta de unidades pré-depósito tem sido aplicada em cistectomias, prostatectomias radicais, colectomias, além de cirurgias para câncer de pulmão, mama, rim e estômago visando reduzir os níveis de sangue homólogo transfundido. Devemos ponderar, entretanto, o número de unidades coletadas em relação ao possível descarte em cirurgias inoperáveis, isto é, a eficácia do programa, além do custo (VALBONESI et al. 1999).

Discute-se, ainda, o risco de retransfundir células tumorais viáveis circulantes no momento da coleta da unidade pré-depósito. Segundo HANSEN et al. (1995), células tumorais foram identificadas na circulação em 20 a 30% de pacientes com câncer. Os autores não consideram esta observação relevante porque não houve diferença na sobrevida comparada com outros pacientes sem células tumorais circulantes. Esta população de células tumorais circulantes pode representar uma subpopulação com invasividade limitada (VALBONESI et al. 1999). Podemos concluir que a autotransfusão pré-

operatória tem eficácia restrita para suprir as necessidades transfusionais destes pacientes, se não estiver associada a outros procedimentos que complementem o programa: hemodiluição e/ou a recuperação de sangue intra-operatória.

A hemodiluição poderá ser aplicada como técnica conservadora de uso de sangue homólogo, desde que o paciente não apresente contra-indicação para a retirada aguda de 500 a 1000 ml antes da cirurgia. É recomendável para pacientes com níveis de hematócrito elevados, acima de 40%, que não tiveram tempo para a coleta pré -depósito. É descrita com sucesso para prostatectomias radicais (GOODNOUGH et al. 1996).

A recuperação pós-operatória tem sido utilizada para cirurgias cardiopulmonares e ortopédicas em que o maior volume de sangramento ocorre no período pós -operatório. Esta técnica inclui a coleta asséptica da drenagem da parede, geralmente, nas primeiras 6 horas do período pós-operatório imediato, seguido da sua reinfusão, com ou sem lavagem do sangue (GOODNOUGH et al. 1996).

Em cirurgia geral o uso de recuperação autóloga intra-operatória (*cell saver*) será indicado sempre que houver sangramento maior que 500 ml. Este método é seguro, capaz de recuperar hemácias lavadas, livres de debris celulares, potássio e heparina. Em cirurgia cardíaca concentra-se o volume do circuito extracorpóreo, retirando a heparina do sistema. É indicada também nas reoperações de troca de valvas, com maior potencial de sangramento. VIEIRA et al. (1992) compararam 70 casos de cirurgia cardíaca com o uso de

recuperadores celulares automatizados com um grupo controle (que não utilizou o equipamento). Concluíram que o procedimento é seguro e eficaz, reduzindo em 50% a utilização de sangue homólogo. Nas demais cirurgias de grande porte, como aneurisma de aorta, enxertos vasculares, transplante hepático e politraumas, a sua utilização garante 30% de economia dos estoques de sangue, além dos benefícios do uso de sangue autólogo. As contra-indicações para o seu uso correspondem a campos cirúrgicos com substâncias não laváveis, isto é, contaminações bacterianas (POPOVSKY et al 1985), fúngicas, neoplásicas (HOMANN et al. 1984), líquido amniótico, cola de fibrina e cimento ósseo. Nestas situações, seu uso é ainda controverso, embora alguns serviços realizem o procedimento até certo momento da cirurgia e com alguns cuidados.

YAW et al. (1975) relataram um caso de recuperação de 1000 ml de sangue autólogo durante uma toracotomia. O laudo de congelação durante a cirurgia foi de carcinoma e desta forma, não retornaram o sangue recuperado. As análises citológicas do sangue processado no equipamento foram compatíveis com o diagnóstico da peça cirúrgica de carcinoma pulmonar pouco diferenciado de grandes células. Ao longo destes 25 anos, a segurança para o uso de autotransfusão intra-operatória em pacientes com neoplasia permanece sem confirmação.

KLIMBERG et al. (1986) acompanharam 49 pacientes submetidos à auto-transfusão devido ao câncer genito-urinário. Concluíram que a baixa incidência de metástases e o padrão de evolução da doença não estavam relacionados à autotransfusão como possível causa de disseminação do tumor.

MILLER et al. (1991) demonstraram que o filtro de 40 μ para microagregados não eliminava as células tumorais, diferentemente de situações em que se utilizava o filtro para redução de leucócitos (RC100, Pall Biomedical).

Os filtros para leucodepleção evoluíram e os estudos experimentais de EDELMAN et al. (1996) demonstraram redução do risco em reinfundir células tumorais de pacientes com neoplasias urológicas com filtro RC-400 (Pall).

ZULIM et al. (1993) reviram 39 pacientes submetidos a hepatectomia devido à neoplasia e não encontraram diminuição da sobrevida ou recorrência nos casos de autotransusão intra-operatória, quando comparados com os que receberam somente sangue alogênico.

HANSEN et al. (1995) detectaram células tumorais em sangue recuperado de 57 pacientes (n= 61) durante cirurgia oncológica. Identificaram estas células através de citocentrifugação e pelo estudo de citoqueratina e organização nucleolar (nitrito de prata), com uma sensibilidade de 10 células em 500 ml de sangue. Demonstraram a capacidade proliferativa destas células em ensaios de cultura e pelo fato de originarem metástases em modelos de camundongo nude. O número total de células tumorais identificadas variou de 10 a 7×10^6 , sem relação com a quantidade de sangue perdida.

HANSEN et al. (1999), propõem o retorno do sangue recuperado com base na radiosensibilidade das células tumorais. Através de um estudo *in vitro*, com 10 linhagens diferentes de tumor, testaram a capacidade proliferativa destas células, antes e após a irradiação. Encontraram células tumorais viáveis

após a dose de 50 Gy, mas sem metabolismo de DNA (incorporação com 5` bromodesoxiuridina). Acreditaram, assim, que esta dose é suficiente para inativar células tumorais do sangue recuperado. E esta foi a base experimental para a aplicação clínica de sangue irradiado em cirurgias de câncer com recuperação intra-operatória. Não é conhecido, no entanto, se esta prática altera o risco de recorrência do tumor ou de metástase, ou se diminui a sobrevida livre de tumor. Considerando que uma grave contaminação seja 10^9 células tumorais (equivalente a 1 grama de massa tumoral), a dose preconizada eliminaria a proliferação de células em 99,9% dos casos. Ainda neste estudo, os autores demonstraram que tumores de diferentes origens apresentavam Do (definida como a dose necessária para reduzir a fração de células sobreviventes para 37% do valor original) de 1 a 2,2 Gy. Aliada a maior radiosensibilidade decorrente de uma maior oxigenação do sangue recuperado, e ao fato de ser a dose única. Os autores notaram uma maior eficácia e atribuíram à falta de mecanismo de reparo do DNA que ocorre nos tratamentos radioterápicos convencionais com doses fracionadas. Em relação à qualidade da unidade hemoterápica irradiada, resultados de viabilidade e função destas hemácias eram superiores ao sangue estocado, autólogo ou alogênico. A partir destes resultados, estes autores recomendaram a utilização de recuperação autóloga intraoperatória, utilizando lavagem e irradiação, seguida de reinfusão em alguns hospitais oncológicos da Europa, por acreditar que ofereciam melhor atendimento a estes pacientes.

VALBONESI et al. (1999), relataram experiência com irradiação de

sangue recuperado para pacientes oncológicos. Utilizaram várias técnicas para otimizar o programa de autotransfusão: administração de ferro, eritropoetina, procedimento de aférese denominado seqüestro e irradiaram as unidades desde a coleta pré-operatória. Este grupo italiano, estudou 153 pacientes transfundidos com sangue autólogo pré-depósito e recuperação intra-operatória, no período de março de 1997 a abril de 1999, submetidos à cirurgia de linfomas de abdomen (n=9); tumor de bexiga (n=14); rim (n=8); pulmão (n=29); fígado (n= 13); transplante de fígado (n=11); reconstrução de mama (n=29); tumor de estômago(n=5); pâncreas (n=6) e outros (n=29). Em 77 pacientes utilizou somente sangue autólogo. Concordando com a experiência alemã de Hansen, não foi atribuído qualquer efeito adverso à recuperação intra-operatória ou à irradiação.

Freqüentemente, como hemoterapeutas, realizamos coletas de medula para transplantes autólogos de medula óssea, coletas de células progenitoras periféricas e de sangue autólogo pré-depósito com a possibilidade teórica de reinfundir células tumorais. Entretanto, a reinfusão de sangue autólogo recuperado do campo de cirurgias onco-hematológicas ainda permanece contra-indicada. Segundo VALBONESI et al. (1999), estamos diante de um paradoxo médico!

Em contrapartida, os benefícios do uso de sangue autólogo e/ou alogênico leucodepletado estão consolidados em diversos trabalhos, envolvendo mecanismos de imunomodulação: menos infecção e menor agressividade do câncer (BLUMBERG e HEAL 1994). Hoje, os chamados “vírus

emergentes”, como o TTV (*Transfusion Transmitted Virus*) e a variante de Creutzfeldt Jacob (príon) reforçam a prática de leucodepleção universal das transfusões realizadas no Canadá, Inglaterra e Portugal (VALBONESI et al. 1999).

Entre os métodos utilizados para garantir a pureza dos hemocomponentes, a maioria dos estudos utiliza a leucodepleção associada ou não a irradiação. Ainda, encontra-se em desenvolvimento a associação de tratamento fotoquímico a concentrado de plaquetas e a produtos plasmáticos, com o intuito de inativar o DNA de genomas celulares e de patógenos:

1. Leucodepleção

Como os leucócitos são os responsáveis pela maioria dos efeitos deletérios da transfusão, a sua remoção é indicada e pode ser realizada por: sedimentação, centrifugação, lavagem, congelamento/descongelamento e a leucofiltração, sendo esta técnica a mais eficiente, dependendo do tipo de filtro utilizado. Os leucócitos podem ser removidos através de mecanismos físicos: barreira, diferença de carga de superfície e biológicos: adesão e interação célula-célula (BORDIN et al. 1994).

Os leucofiltros permitem níveis de remoção que excedem três ordens de grandeza na escala logarítmica, resultando em menos do que 3×10^6 leucócitos em 300 ml de hemocomponente, isto é, 10 leucócitos por microlitro, equivalente a 99,9% de eliminação.

Desde 1981, mais de 150 estudos clínicos têm investigado a associação de transfusão alogênica peri-operatória com recorrência de câncer e/ou infecção bacteriana pós-operatória. Recentes estudos randomizados controlados comparando a transfusão de sangue leucodepletado não conseguiram elucidar esta questão (VAMVAKAS e BLAJCHMAN 2001). Existem muitos relatos avaliando o efeito de transfusão alogênica peri-operatória em recorrência e prognóstico nos pacientes oncológicos submetidos à cirurgia curativa de câncer, a grande maioria para carcinoma colorretal. JENSEN et al. (1996), estudaram 589 pacientes submetidos à cirurgia colorretal, transfundidos com leucofiltros (RC100, Pall Biomedical), depletados de camada leucoplaquetária (*buffy-coat*) e os pacientes não transfundidos. Seus resultados demonstraram maior infecção para o grupo que não foi adequadamente leucodepletado.

KONGSGAARD et al. (1996) utilizando outro filtro para remoção de leucócitos (RC 400, Pall Biomedical), trabalharam com duas linhagens de câncer de mama em condições experimentais. Seus achados foram de que após a passagem pelo filtro, nenhuma célula tumoral foi viável. A detecção de células malignas foi através de anticorpos monoclonais e crescimento em cultura após uma semana. Relataram, com esta técnica, a sensibilidade de 1 célula tumoral em 1×10^5 células. Concluíram que esta prática poderia tornar o uso de recuperação intra-operatória segura em cirurgias oncológicas.

2. Radiação ionizante

Os efeitos da radiação podem ser diretos, isto é, interagem com os componentes celulares: DNA, proteínas e lipídios, provocando alterações estruturais. Outro mecanismo é interagindo com as moléculas de água do intracelular, produzindo radicais livres. Este efeito indireto corresponde a 70 % do efeito biológico produzido pelas radiações. A interação das radiações com os diversos componentes celulares pode produzir diferentes tipos de lesão, que comprometerão ou não a vida destas células.

Os mecanismos de dano celular induzido pela radiação são: apoptose e necrose em que a células sofrem mitose com quebras sem reparo de DNA e com aberrações cromossômicas letais, com conseqüente perda da sua capacidade replicativa. Este é o modo mais freqüente de morte celular induzida por radiação (SEGRETO e SEGRETO 1997; SEGRETO et al. 1998).

O DNA é alvo importante para os efeitos citotóxicos da radiação, podendo ocorrer: eliminação das bases nitrogenadas, gerando sítios apurínicos ou apirimidínicos; rompimento das pontes de hidrogênio entre as duas hélices da molécula; quebra em uma ou ambas as cadeias polinucleotídicas e translocações. A quebra dupla do DNA é a lesão mais prejudicial. O reparo das lesões radioinduzidas ocorre entre 4 a 6 horas depois da irradiação. Defeitos de reparo podem levar a célula à morte ou a transformação neoplásica, devido à expressão de oncogenes. As quebras e os respectivos arranjos cromossômicos são importantes lesões celulares induzidas por radiação. Formam-se fragmentos acêntricos, dicêntricos e anéis (mutações instáveis), além de

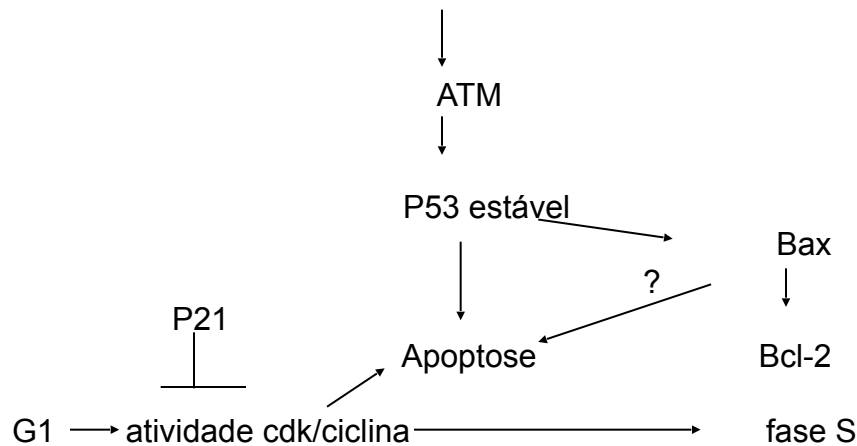
translocações e inversões (mutações estáveis).

As membranas biológicas possuem uma dupla camada lipídica circundada por água em ambos os lados, desta forma, os radicais livres resultantes da radiólise da água têm pronto acesso para produzir seu efeito lesivo, devido a sua capacidade de iniciar reações químicas. A radiação também interage com os lipídios da membrana e modifica suas propriedades de transporte.

As células manifestando aberrações cromossômicas durante a mitose formam células filhas, contendo micronúcleos incapazes de prosseguir no ciclo celular. Outras células irradiadas podem sofrer processo semelhante à senilidade, permanecendo metabolicamente ativas, porém, incapazes de se dividirem, o que pode ser explicado por captura de telômeros de cromossomos normais para aqueles com quebras. Outra semelhança é o bloqueio transitório no ciclo celular após a radiação. Durante o envelhecimento celular o bloqueio é permanente.

A apoptose é morfológicamente caracterizada pela condensação da cromatina nuclear, bolha das membranas e fragmentação. O processo bioquímico envolve as caspases e alteração de permeabilidade das mitocôndrias. O seu início é variável de acordo com o tipo celular: rápida (após G2) ou tardia (após várias divisões celulares). Segundo COHEN-JONATHAN et al. (1999), é regulada em vários níveis por uma série de proteínas incluindo: ATM, p53, Bcl-2, Bax, Cdc-2.

Radiação ionizante



1.3 Tratamento fotoquímico com luz ultravioleta A (UVA)

O tratamento fotoquímico utiliza uma droga intercalante de DNA, baseado no seu efeito biológico, 8- metoxipsoraleno (8-MOP) e luz ultravioleta A de um comprimento de onda entre 320 a 400 nm. Através desta iluminação as moléculas psoralênicas intercalam-se com o RNA e o DNA. Na ausência de reparo, estes genes modificados são incapazes de duplicação, impedindo a proliferação celular.

Os estudos de GRASS et al. (1998) demonstram que amostras tratadas com radiação não foram extensivamente modificadas em seu DNA como aquelas tratadas com UVA, através da análise de PCR, para o gene de *β-globina*. Estes tratamentos ainda não podem ser utilizados para concentrado de hemácias, em virtude da densidade deste hemocomponente prejudicar a ação da luz ultravioleta.

2. JUSTIFICATIVA

Partimos do conhecimento de que células tumorais e seu DNA circulam no paciente oncológico e que o significado biológico destes fatos é pouco conhecido. O procedimento de transplante autólogo de medula óssea ou de células progenitoras periféricas é realizado no mundo inteiro, com potencial de reinfusão de células tumorais.

A ausência de confirmação dos estudos de transfusão associada a imunomodulação (TRIM – *transfusion associated immunomodulation*) é outra razão para a nossa preocupação, porque existe o risco de modificar a evolução do câncer com as inúmeras transfusões decorrentes do seu tratamento.

Em virtude da escassez de casos, da natureza heterogênea dos tumores, e da falta de controles adequados, os trabalhos existentes utilizaram filtros de leucorredução ou irradiação do sangue recuperado para demonstrar o conceito de segurança apenas *in vitro*. Todos os estudos *in vivo* são restritos, os

períodos de seguimento relativamente curtos e os dados relativos ao estadiamento do tumor, na época da cirurgia, incompletos. Considerando a presença de células tumorais nas tentativas de processar e utilizar o sangue recuperado durante a cirurgia oncológica, mais estudos são necessários para a recomendação deste procedimento.

3 OBJETIVO

Estudar a qualidade do concentrado de hemácias, artificialmente adicionado de células tumorais, submetido à lavagem, leucorredução e irradiação, através de viabilidade celular e detecção de DNA genômico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Simulação da presença de células tumorais

Obtivemos as seguintes amostras congeladas de linhagens celulares do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer- Filial São Paulo-SP: SaOS; SK-MEL e HeLa (*American Type Culture Collection-ATCC*: CRL-7939; HTB-71 e CCL-2, respectivamente) (ATCC 2002). A partir do crescimento em meios de cultura respectivos: Mc Coy 10%; RPMI 10% e DMEM 10%, representando os tumores sólidos mais freqüentes: carcinoma (HeLa); melanoma (SK-MEL) e sarcoma (SaOS).

As culturas em garrafas grandes eram interrompidas com tripsina-EDTA e as células ressuspensas em solução salina tamponada para a contagem em câmara de Neubauer. Somente foram consideradas as células viáveis, isto é, refringentes, através do teste de exclusão pelo trypan blue e as contagens

sempre realizadas com dupla conferência. Os inóculos de 10^0 ; 10^2 e 10^6 células tumorais eram mantidos em gelo picado até a mistura no sangue total, em triplicata.

4.2 Preparo de unidades hemoterápicas

Dez doadores de sangue foram escolhidos aleatoriamente e autorizaram por escrito a doação para uso a critério do banco de sangue. As unidades foram colhidas em bolsas plásticas triplas Baxter PL 146, contendo 63 ml de solução anticoagulante citrato fosfato dextrose (CPD) para coleta de 450 ml de sangue total.

Cada unidade de sangue total era fracionada em 4 bolsas de transferência de 600 ml, em sistema fechado, através de conector estéril de tubos, originando as bolsas designadas: A, B, C e D, com volume inicial de 100 ml cada.

4.3 Tratamento realizado nas unidades e coleta de amostras

4.3.1 Fase 1: Aplicação dos inóculos

Bolsa 1A = Controle negativo

Bolsa 1B = inóculo de 10 células tumorais de uma das 3 linhagens

Bolsa 1C= inóculo de 10^2 células tumorais de uma das 3 linhagens

Bolsa 1D= inóculo de 10^6 células tumorais de uma das 3 linhagens

Após a mistura, alíquotas eram coletadas imediatamente para as análises de viabilidade celular e estudo de DNA.

2. Fase 2: Lavagem

Esta fase corresponde ao início do tratamento através da lavagem com solução salina 1000 ml, em centrífuga refrigerada Sorvall, durante 5 minutos a 20°C, a 3000 rotações por minuto (rpm), no rotor H6000A. Ao término desta fase amostras foram coletas e identificadas como: 2A, 2B, 2C e 2D.

4.3.3 Fase 3: Leucodepleção

Todas as bolsas foram submetidas ao filtro para remoção de leucócitos em concentrado de hemácias (Filtro PALL, Purecell Neo, USA). Ao término desta fase, amostras foram coletas e identificadas como: 3A, 3B, 3C e 3D.

4.3.4 Fase 4: Irradiação

No início deste projeto, as bolsas de sangue foram irradiadas com uma

fonte de Cobalto na dose estipulada de 25 Gy. Posteriormente, substituiu-se pelo equipamento Gammacell 3000 que utiliza fonte de césio, na mesma dose de irradiação e as amostras foram retestadas. Ao término desta fase amostras foram coletadas e identificadas como: 4A, 4B, 4C e 4D.

A cada experimento, 16 amostras eram identificadas pelo número que corresponde ao tratamento e a letra ao inóculo de células tumorais misturado. Foram colhidas para cada DNA, 16 amostras de 5 ml em tubo seco, centrifugadas a 3200 rpm durante 6 minutos. A camada leucoplaquetária foi submetida aos estudos de viabilidade celular e integridade de DNA (figura 1).

4.4 Estudo de viabilidade celular

Imediatamente, após os procedimentos acima discriminados, as amostras foram submetidas ao estudo de viabilidade celular com uma mistura equimolar de 2 mM iodeto de propídeo (IO- 3,7 mg em 10 ml) e 2 mM de acridine orange (AO- 6,9 mg em 10 ml). Esta solução foi estável por 6 meses, protegida da luz, a 4°C (SIGMA).

Análise em microscópio de imunofluorescência Nikon, 250x (190 µl da solução de estoque + 10µl da amostra, em câmara de Neubauer). As células nucleadas coradas em verde eram viáveis. As células inviáveis apresentavam cor laranja (JAHANMEHR et al. 1987; MASCOTTI et al. 2000) e eram analisadas em campo escuro, perfazendo um total de 100 células contadas, por um período de até 30 minutos.

4.5 Análise de DNA genômico

4.5.1 Purificação

Realizada através do kit GFX-Pharmacia, conforme instruções e as soluções do fabricante: solução de extração e de lavagem. A eluição foi realizada com tampão Tris-EDTA a 70°C (10mM Tris-HCL, pH 7,4, 1mM EDTA).

4.5.2 Integridade do DNA

Avaliada através da aplicação das amostras purificadas em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. Foram utilizados 2 marcadores: ϕ X174 RFDNA / *Hae* III Fragments e 1 Kb DNA Ladder. Voltagem de 100 a 150 Volts e tampão de corrida Tris Borato EDTA (BTE).

4.5.3 Análise qualitativa do DNA genômico

Todas as alíquotas foram testadas para a presença de diferentes fragmentos de DNA, através da análise dos produtos de PCR do gene de β -*Globina*, em gel de agarose, corado com brometo de etídio (VAHEY et al. 1995). Utilizamos aproximadamente 1/10 do DNA total extraído; *primers* G72 e G73

(599 pares de bases) para estudo de fragmentos de DNA do gene de β -Globina; *primers* 5' e 3' de LCR 16 para estudo de DNA de plasmídeo com o gene de Papilomavírus Humano 16 (HPV-16) integrado ao seu genoma (364 pares de bases); Taq DNA polimerase; Magnésio, dNTP e tampão de reação da Gibco BRL Life Technologies. Também utilizamos *primers* G73 e G74 (268 pares de bases) para fragmentos de DNA do gene de β -Globina em reação de PCR/Multiplex semelhante (tabela 2) e a padronização foi:

Primer 5' LCR 16 20 μ M _____ 1,5 μ l

Primer 3' LCR 16 20 μ M _____ 1,5 μ l

Primer G 73 20 μ M _____ 2 μ l

Primer G 74 20 μ M _____ 2 μ l

Tampão 10 x sem Magnésio _____ 10 μ l

Cloreto de Magnésio 25 mM _____ 6 μ l

DNTP 20 mM _____ 10 μ l

Taq Polimerase 5U/ μ l _____ 0,7 μ l

DNA aplicado à reação _____ 4 a 5 μ l

Plasmídeo HPV-16 _____ 3 μ l

Volume final da PCR = 100 μ l

DNA controles: HeLa 10ng _____ 3 μ l

SiHa 10ng _____ 3 μ l (ATCC: HTB-35) (ATCC 2002)

Plasmídeo HPV-16 10 pg _____ 3 μ l

Termociclador utilizado: Hybaid / Omnigene, programa 2

Estágio 1= desnaturação: 1 ciclo 95°C, 5 minutos;

Estágio 2= anelamento: 35 ciclos

95°C, 1 minuto

55°C, 1 minuto e 50 segundos

72°C, 2 minutos

Estágio 3= extensão: 1 ciclo 72°C, 6 minutos.

Tabela 2 - Tabela de *primers* e suas seqüências (*GREER et al. 1991; **HO et al. 1991).

Primer	Seqüência
G 72 *	5' GCTCACTCAGTGTGGCAAAG 3'
G 73 *	5' GAGAGCCAAGGACAGGTAC 3'
G 74 *	5' CAACTTCATCCACGTTCCACC 3'
LCR 5' **	TCGGTTGCATGCTTTTTGGC
LCR 3' **	TGTACCCACACACGTTTGG

4. Validação da reação de PCR

Validamos as reações de PCR através dos controles utilizados e amostras de plasma comparadas com as amostras do estudo, isto é, amostra de concentrado de hemácias lavadas, filtradas e irradiadas.

Controle positivo da expressão de globina:

➤ HeLa

➤ SiHa

Controle negativo da expressão de globina:

- adição de *primers* de plasmídeo

Controle referente a presença de células nucleadas da amostra em estudo (leucócitos e inóculos):

- amostras de plasma

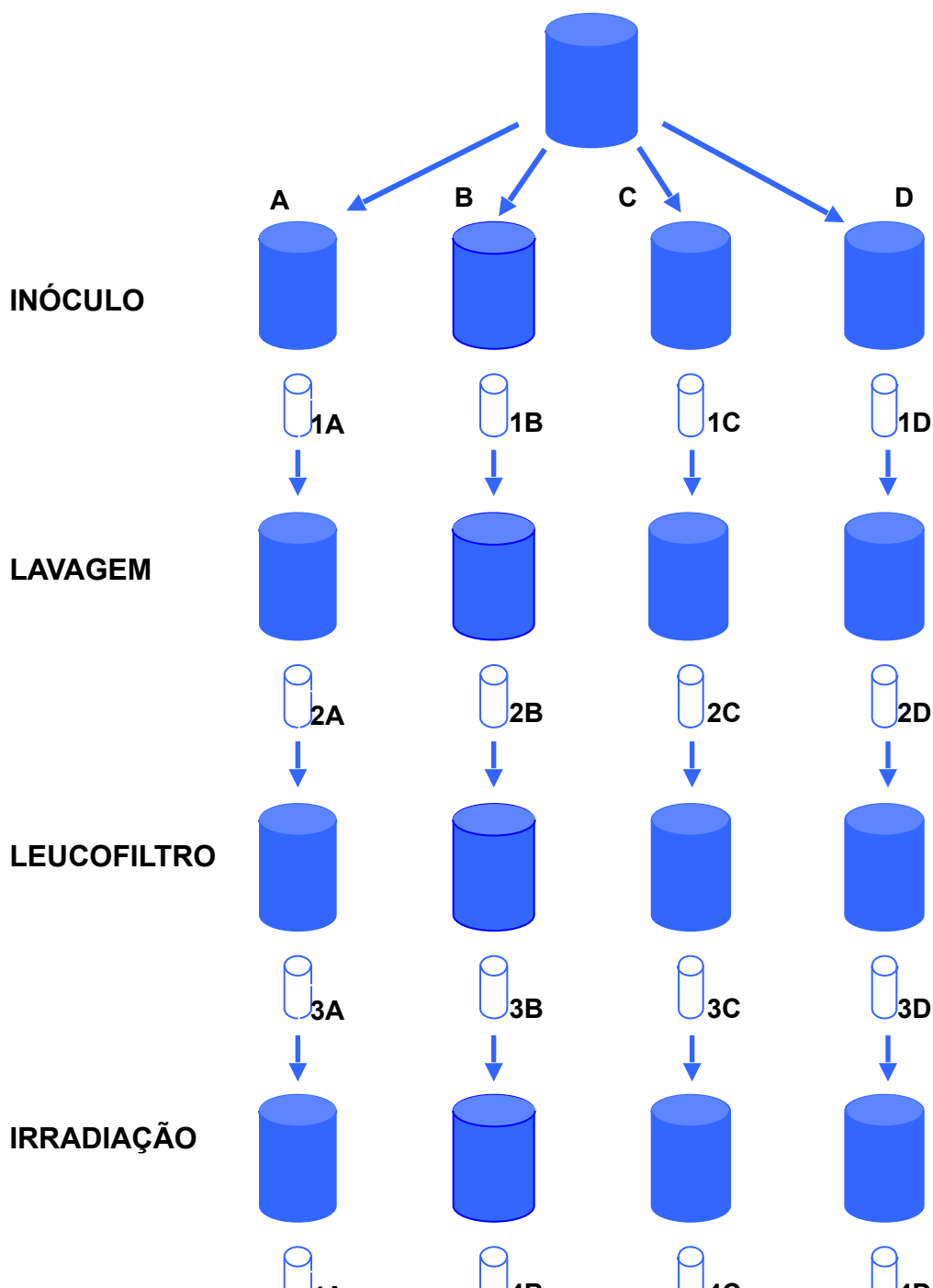



Figura 1. Desenho do estudo: DNA extraído da mesma unidade de sangue, fracionada em 4 alíquotas. A= sem inóculo; B= 10 células/ml inoculadas; C= 10^2 células/ml inoculadas; D= 10^6 células/ml inoculadas e  = estudo de viabilidade celular e de DNA.

5 RESULTADOS

1. Viabilidade celular

Foram realizadas análises de viabilidade em triplicata, medidas pela incorporação de corante vital, imediatamente após o inóculo e em seguida ao tratamento proposto. Não encontramos células viáveis nas alíquotas submetidas à lavagem, leucodepleção e irradiação, com ou sem células tumorais inoculadas (todas as alíquotas de número 3 e 4), conforme figura 2B abaixo.

A contagem média de células viáveis, de no mínimo três experimentos para cada linhagem, encontra-se na tabela 2 e corresponde a células nucleadas (leucócitos e células tumorais inoculadas). Raras células coradas em laranja, não viáveis, foram observadas e não foram consideradas. As hemácias não são visíveis na imunofluorescência.

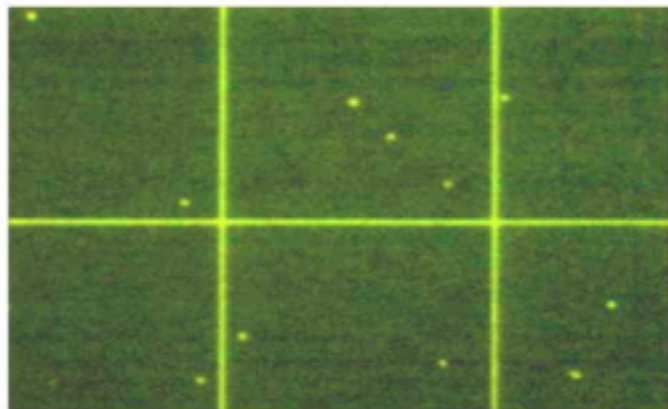


Fig. 2A



Fig. 2B

Figura 2 - Resultados de viabilidade sem tratamento (**Fig 2A**) e após lavagem, leucodepleção e irradiação (**Fig 2B**).

Tabela 3 - Média dos resultados de viabilidade celular com acridine orange e

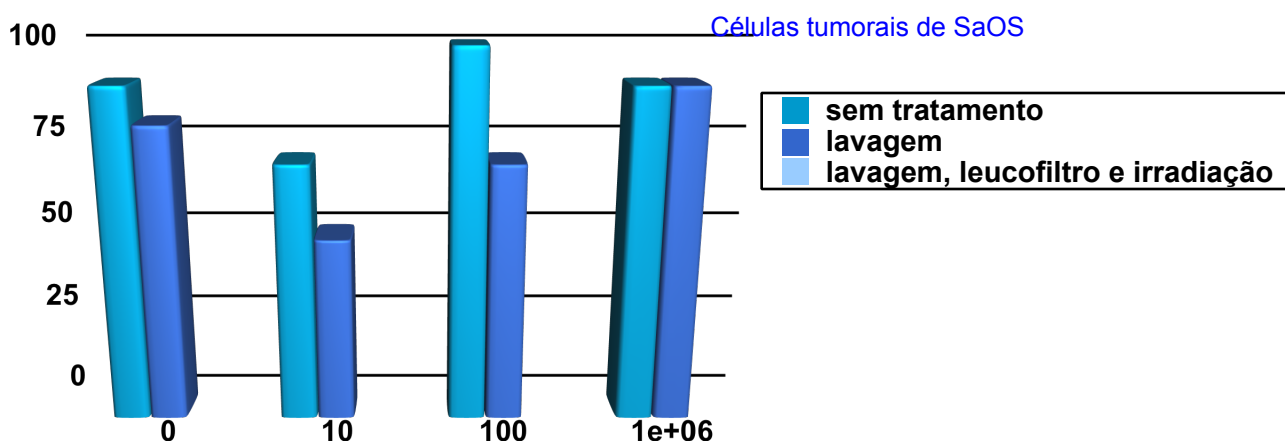
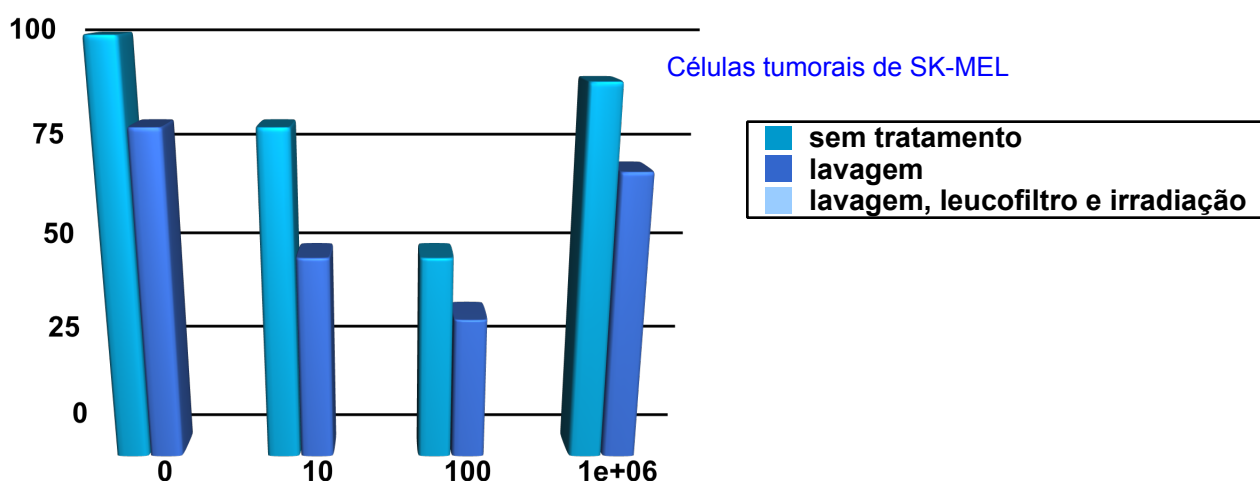
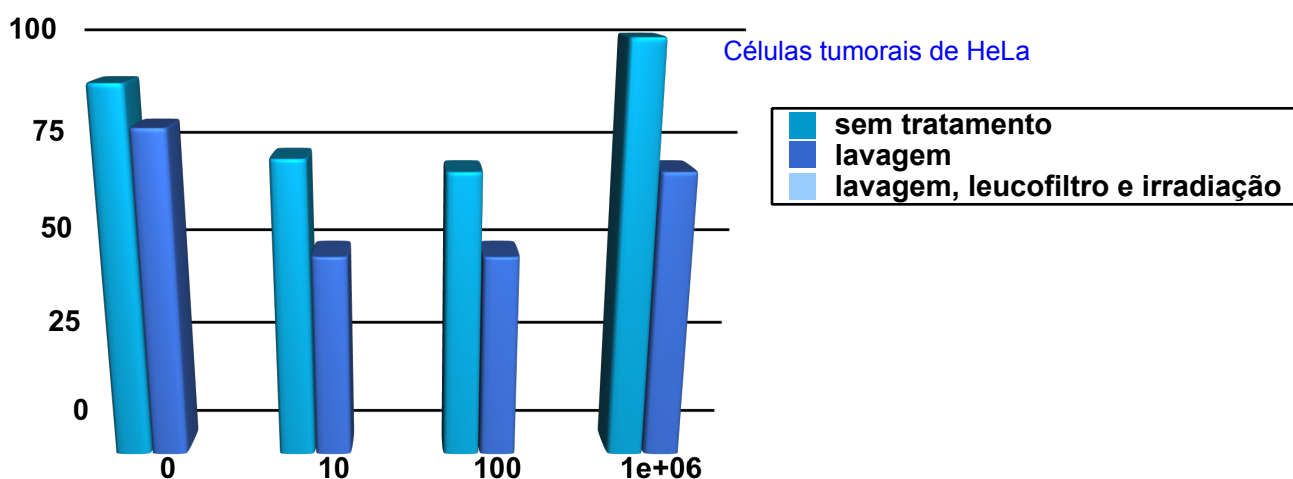
iodeto de propídeo, células viáveis (%) com as diferentes linhagens e tratamentos utilizados.

Tratamento	Alíquotas	HeLa	SKMEL	SaOS
Sem tratamento	Sem inoculo	90	100	90
	10 células	73	80	70
	10 ² células	70	50	100
	10 ⁶ células	100	90	90
Lavagem	Sem inoculo	80	80	80
	10 células	50	50	50
	10 ² células	50	35	70
	10 ⁶ células	70	70	90
Lavagem e deleucotização	Sem inoculo	0	0	0
	10 células	0	0	0
	10 ² células	0	0	0
	10 ⁶ células	0	0	0
Lavagem, deleucotização e irradiação	Sem inoculo	0	0	0
	10 células	0	0	0
	10 ² células	0	0	0
	10 ⁶ células	0	0	0

Partimos de uma concentração inicial de células nucleadas de $3,5 \times 10^9$ leucócitos/l e atingimos uma concentração final de 50.000 células/ μ l, considerando perdas durante o tratamento e inóculos. A sensibilidade estimada deste método é de 1 célula nucleada viável em 10^5 / μ l da amostra.

A média em porcentagem de células nucleadas viáveis, sem tratamento,

foi 83% independente do número e tipo de células inoculadas. Após lavagem, a média de células viáveis foi de 64% nos diferentes inóculos. As amostras submetidas à lavagem e leucorredução apresentaram ausência de células nucleadas viáveis e o mesmo ocorreu nas amostras que prosseguiram até a



irradiação (figura 3).

Figura 3 - Média de células nucleadas viáveis (%) e tratamento, sem e com inóculos de HeLa, SK-MEL e SaOS.

2. Análise de DNA

Etapa 1: análise da integridade do DNA demonstra que o DNA extraído apresentou tamanho aproximado de 12.000 pb (Figura 4). As seqüências de PCR para o gene de β -*Globina*, após o tratamento preconizado das alíquotas estão representadas na Figura 5.

Os estudos iniciais de PCR revelaram persistência da banda de globina, embora mais fraca, após o tratamento preconizado, para fragmentos de 268 (Figura 5A) e 599 pares de bases (Figura 5B). Entretanto, os experimentos posteriores demonstraram ausência de produto de amplificação do gene de β -*Globina* nas canaletas 3 e 4, correspondentes a leucorredução e irradiação.

Etapa 2: adição de plasmídios contendo a seqüência de HPV-16, objetivando verificar se o resultado negativo da amplificação poderia ser devido a condições de inibição da reação de PCR (ensaios de reconstituição). Esta abordagem experimental resultou na obtenção de dois fragmentos distintos, após a PCR/Multiplex: 268 e 364 pares de bases de DNA de globina e HPV-16 como demonstra a Figura 6 (6A HeLa; 6B SK-MEL; 6C SaOS). Durante esta etapa, as análises de PCR/Multiplex evidenciaram a banda de globina (268 pares de base) em amostras com diferentes inóculos nas canaletas 1 e 2, após

a lavagem com salina. Entretanto, as amostras submetidas a leucofiltro (canaletas 3) e irradiação (canaletas 4) foram negativas para a globina. Notamos a persistência da banda de plasmídeo de HPV-16 (364 pares de base) em todas as amostras. Este fato foi fundamental para demonstrar que a ausência de banda não era causada por algum tipo de inibição durante a reação de PCR (Figura 6). Nestas, adicionamos ao sangue submetido aos diferentes tratamentos, *primers* que amplificam um fragmento de 364 pb de DNA de HPV-16, adicionado ao sangue na forma de um plasmídeo contendo o genoma viral que não é encontrado em amostras de sangue.

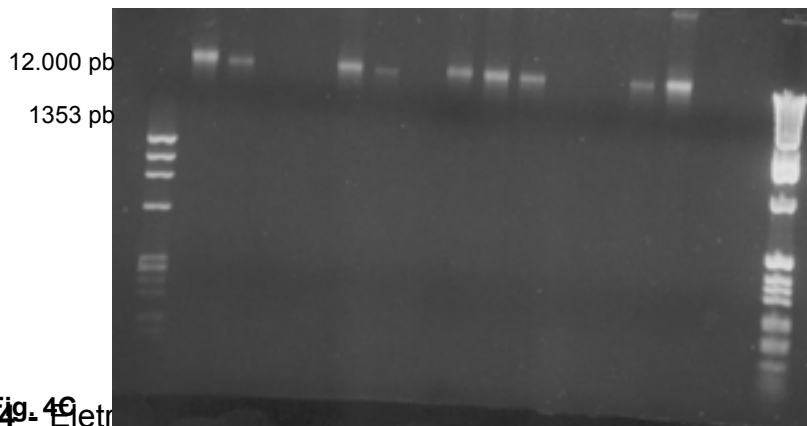
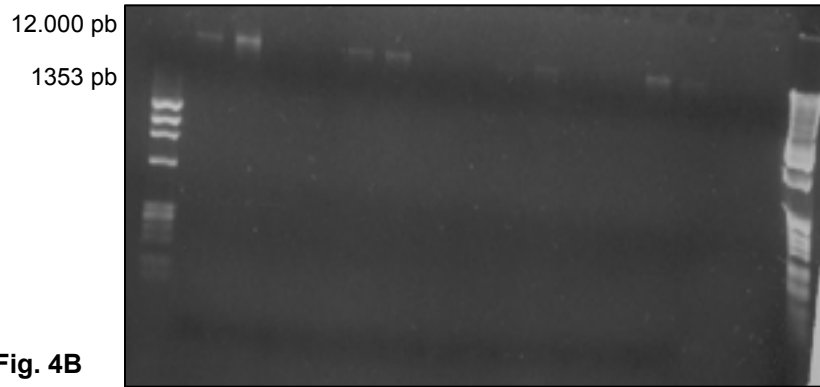
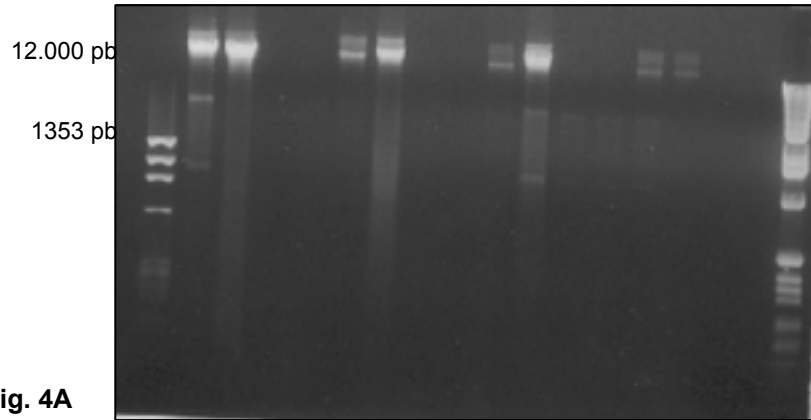


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados com o método de etídio,

do DNA das amostras de sangue submetidas ao tratamento proposto e aos diferentes inóculos: **Fig. 4A** células HeLa; **Fig. 4B** células SKMEL e **Fig. 4C** inóculo de SaOS.

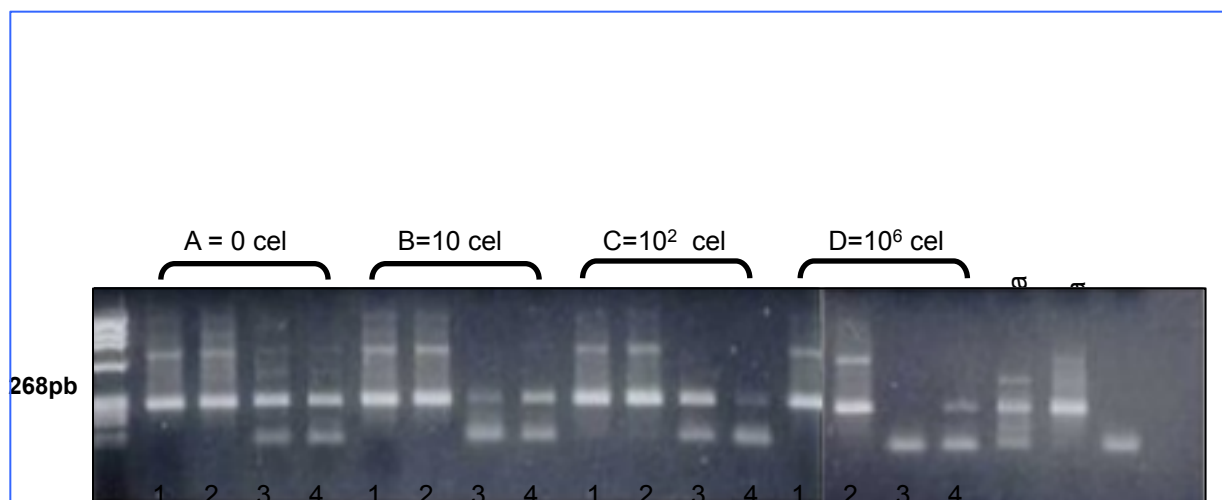


Fig 5A

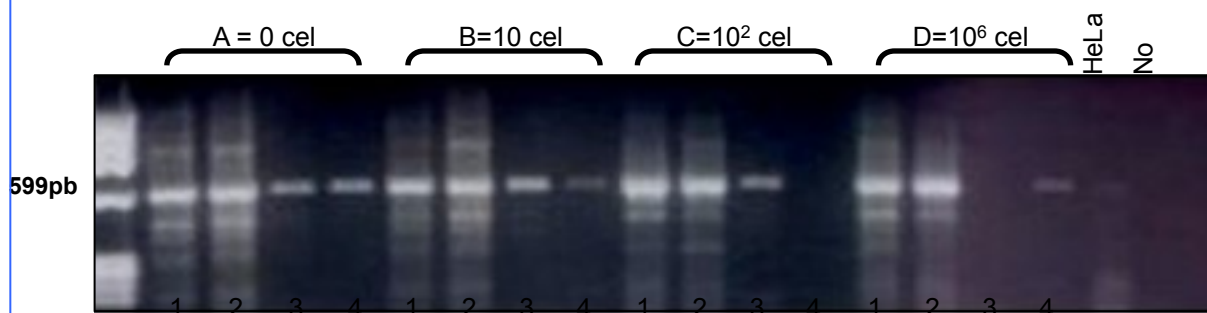


Fig 5B

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídeo 1%. **Fig.**

5A: produto de PCR para o gene de Globina, 268 pares de bases, com inóculo de célula HeLa.

Fig. 5B - produto de PCR para o gene de Globina, 599 pares de bases, com inóculo de célula HeLa. Letras A, B, C e D correspondem à quantidade de células tumorais inoculadas. Os números correspondem a: 1= sem tratamento, 2= lavado, 3= lavado e filtrado.

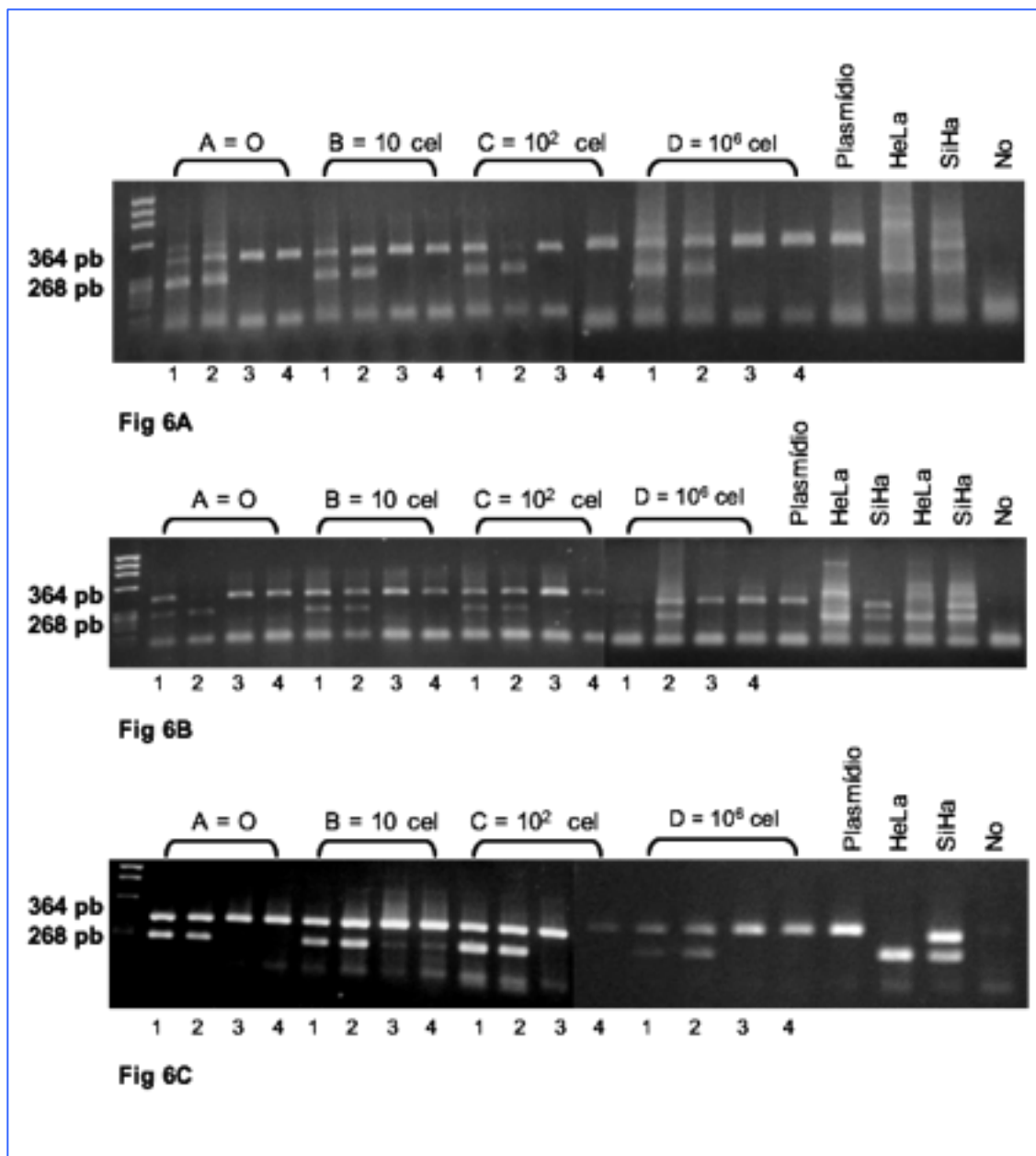


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose de reação de PCR/Multiplex, corado com brometo de etídio. **Fig 6A** inóculo de HeLa; **Fig 6B** inóculo de SK-

MEL e **Fig 6C** inóculo de SaOS. Tratamento: 1= sem tratamento; 2= lavado; 3= lavado e filtrado; 4= lavado, filtrado e irradiado.

Etapa 3: Realizamos reações de PCR/Multiplex com quantidades superiores de DNA àquelas padronizadas para a reação, objetivando desafiar a metodologia. Notamos que surgiram bandas à medida que aumentamos as quantidades de DNA da reação, independente da quantidade de DNA tumoral nas amostras (tabela 4).

Tabela 4 - Presença de bandas após os diferentes tratamentos e inóculos em PCR/multiplex para fragmentos de globina (268 pb) com DNA de doadores saudáveis misturados a DNA tumoral em quantidades de 5, 10 e 20 μ l de DNA na reação.

Linhagem DNA (μ l)	HeLa			SKME			SaOS		
	5	10	20	5	L 10	20	5	10	20
S e m tratament o	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Lavagem	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Lavagem e leucofiltro	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim

Lavagem, leucofiltro e irradiação	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim
--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Partimos então, para o estudo com plasma fresco com o objetivo de analisar a eficácia dos procedimentos, sem a interferência dos leucócitos presentes no concentrado de hemácias. Neste momento, não nos interessava simular a recuperação intra-operatória, mas validar a metodologia de PRC/Multiplex. Os resultados são apresentados na figura 7 e demonstram que após a leucodepleção e irradiação não observamos o produto de 268 pb de globina, indicando a eficácia na remoção das células adicionadas. Como controle positivo da reação, o fragmento de DNA de HPV-16, adicionado artificialmente, foi amplificado em todas as condições.

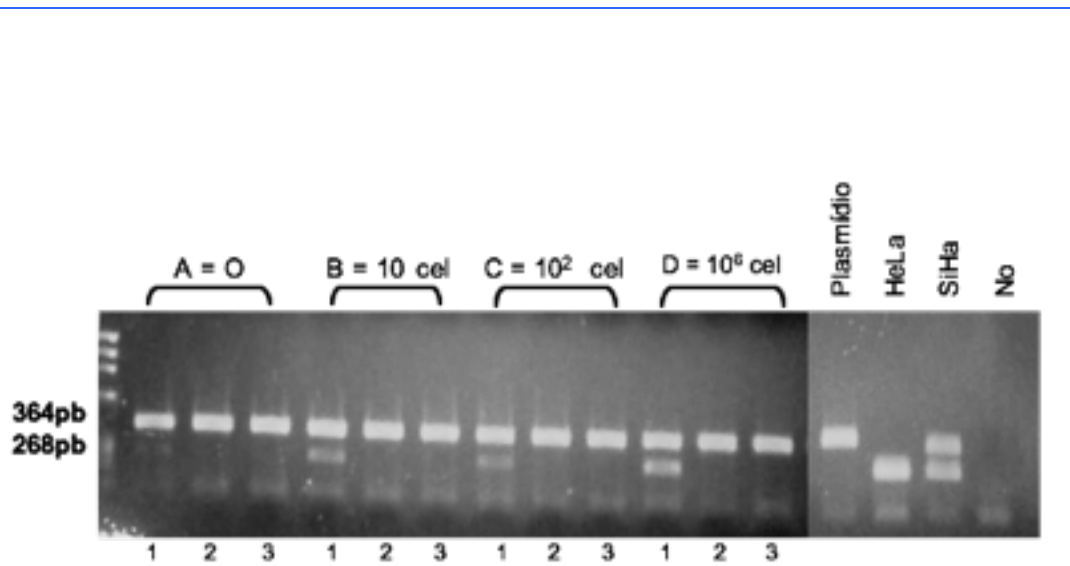


Fig. 7A

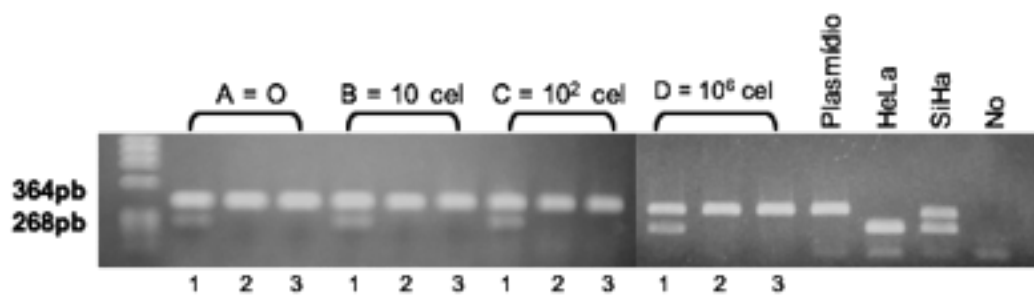


Fig. 7B

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose de reação de PCR/Multiplex, corado com brometo de etídio, com inóculo de C-33 (ATCC: HTB-31) em amostras de plasma. (ATCC 2002).

Fig. 7A - Reação com 5 µl de DNA. **Fig.7B**: Reação com 20 µl de DNA.

Tratamento: 1= sem tratamento; 2= filtrado; 3= filtrado e irradiado.

6 DISCUSSÃO

Sabemos que os leucócitos presentes na transfusão de hemocomponentes celulares podem estar associados aos diferentes eventos imunológicos adversos, que variam desde reações transfusionais febris à aloimunização e reação enxerto contra hospedeiro. Além disso, agentes etiológicos de doenças infecciosas e de algumas neoplasias, por exemplo, os Retrovírus HTLVI/II possuem tropismo pelos linfócitos e podem ser transmitidos (ROBACK e HILLYER 1999). Acredita-se que a leucorredução seja capaz de reduzir o risco de Citomegalovírus (CMV) transmitido por transfusão devido à remoção de maior número de monócitos (SODERBERG et al. 1997). Entre outros Herpesvírus, destacamos a redução de transmissão de Epstein Barr (EBV), agente etiológico relacionado a neoplasias como: doença linfoproliferativa após transplante (ALFIERI et al. 1996), linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfoma T (KANEGANE et al. 1998) e carcinoma de nasofaringe. Discute-se, ainda, a transmissão de Herpesvírus-8 (HHV-8) e a

etiologia transfusional do Sarcoma de Kaposi (WHITBY et al. 1995).

Os leucócitos podem ser removidos dos hemocomponentes através de filtração, centrifugação seguida de remoção da camada leucoplaquetária, congelamento e deglicerolização além de lavagem com salina. A leucorredução através de filtro tornou-se método de escolha porque é simples, rápido e reproduzível. A filtração pode ser realizada durante a transfusão (“beira de leito”) ou pode ser realizada no banco de sangue no momento de processar o hemocomponente (“pré-estocagem”). Recomenda-se que todas as transfusões de hemácias e de plaquetas sejam filtradas em até 24 horas da coleta.

A terceira geração de filtros de poliéster tem afinidade e capacidade de remover 99,9% do total de leucócitos. A leucorredução não é igual entre os diversos elementos que compõem a série branca (ROBACK e HILLYER 1999): monócitos e linfócitos B são removidos com maior eficácia (4 ordens de grandeza na escala logarítmica) em contraste com os neutrófilos (2,5 ordens de grandeza na escala logarítmica).

Embora algumas medidas, já implementadas, tentem reduzir a frequência destes efeitos adversos da transfusão, através da eliminação de células íntegras (leucofiltro - figura 8), existe uma preocupação crescente na persistência de genomas, quer derivados de microorganismos ou das próprias células do sangue.



Figura 8. Leucócito aderido à malha interna do leucofiltro. Fonte: “Scientific Service Pall Medical, USA”.

Neste conceito de aumentar a segurança transfusional encontra-se em desenvolvimento métodos fotodinâmicos associados a psoralênicos. Esta tecnologia capaz de inativar leucócitos poderá conferir benefícios adicionais devido à inibição da síntese de citocinas e ação na proliferação de linfócitos (CORASH 1999). Entretanto, para transfusão de concentrado de hemácias, surgem dificuldades de inativação devido ao espectro de absorbância da hemoglobina e a sua viscosidade. Quase não há relatos na literatura sobre a toxicidade ou os efeitos *in vivo* das propriedades funcionais das hemácias após este processo. Temos notícias de que mecanismos para tratar cada hemocomponente estão em desenvolvimento, em diferentes fases de estudos clínicos na Europa e Estados Unidos.

A partir da descrição de células de adenocarcinoma de pulmão no equipamento de recuperação de sangue intraoperatória por YAW et al. (1975), diversos estudos têm sido publicados com o objetivo de utilizar o sangue recuperado de campos operatórios em pacientes oncológicos apenas com a utilização de leucofiltro.

HANSEN et al. (1999), publicou estudo utilizando lavagem e irradiação,

propondo a sua reinfusão. Utilizando um modelo experimental, trabalhou com cultura de tumores sólidos e avaliou, após a dose de 50 Gy, a capacidade proliferativa em ensaios de formação de colônia e de metabolismo do DNA, concluindo que é um procedimento seguro. VALBONESI et al. (1999), publicou estudo relatando sua experiência pessoal, porém sem confirmar a eficácia da irradiação em eliminar células tumorais, aplicando irradiação em todo o sangue autólogo desde a coleta pré-operatória. Estes dois autores não utilizaram leucofiltro em seus estudos, apesar do conhecimento da capacidade de prevenção de aloimunização com a utilização de filtro para remoção de leucócitos, fundamental nos pacientes oncológicos que consomem grande quantidade de plaquetas, portanto, candidatos a refratariedade nestas transfusões. Além disso, até o momento, não relataram o seguimento destes pacientes que tiveram seu sangue recuperado e transfundido durante a cirurgia, o que exige um grande estudo prospectivo envolvendo variáveis de estadiamento, acompanhamento de metástases, idade e a grande dificuldade de comparar tumores com achados anatomo-patológicos heterogêneos e comportamentos distintos.

Fundamentados nestes dados da literatura, decidimos avaliar os efeitos da irradiação nas doses de 50 e 25 Gy no DNA e para isso realizamos reações de PCR para produtos de 268, 599 e 1100 pares de base. Os resultados de eletroforese dos produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose (dados não mostrados). Não se observaram bandas derivadas de globina nas amostras de sangue irradiadas, independente da dose recebida de irradiação para os

diferentes produtos de PCR, significando que a dose de 25 Gy já seria suficiente para a degradação de DNA. Como obtivemos ausência de DNA capaz de codificar produtos ao redor de 268 pares de bases, optamos pelo estudo com os menores fragmentos de DNA para o gene de β -Globina, isto é, com a utilização de *primers* para produtos com 268 pares de bases, associação de leuocifitro e pela dose ideal preconizada para hemocomponentes que é de 25 Gy.

Analisamos a viabilidade celular através de corantes intercalantes de ácidos nucléicos, sabendo que sua especificidade é profundamente influenciada pelas condições experimentais. Ocorre um equilíbrio fisiológico que pode ser também influenciado por análises mais prolongadas (FOGLIENI et al. 2001). A técnica de microscopia fluorescente com iodeto de propídeo e acridine orange, quando comparada com a citometria de fluxo, apresenta resultados semelhantes em estudos de alterações apoptóticas (RUPPOVA et al. 1999). Realizamos inóculos em triplicata para as linhagens de tumores sólidos: HeLa; SK-MEL e SaOS. Não encontramos células viáveis, isto é, coradas em verde nos inóculos realizados para as linhagens de carcinoma, melanoma e sarcoma, respectivamente, ao término da aplicação da metodologia proposta.

Os ensaios de PCR/Multiplex têm sido empregados com diversos objetivos na prática médica devido à sensibilidade da técnica e a garantia de amplificação do DNA, quando se adiciona *primers* para um DNA diferente ao DNA de interesse. Em nosso trabalho, estudamos fragmentos de DNA para o

gene de β -*Globina* e para garantir nossos resultados utilizamos *primers* para um plasmídio contendo o genoma completo de HPV-16. Obtivemos sua amplificação analisada através de um fragmento de DNA com tamanho de 364 pares de base, próximo ao fragmento amplificado de globina. Isto indica que o material era adequado a PCR, devido a sua natural ausência nas amostras de sangue. Novamente, independente da linhagem de tumor estudada, houve dano do DNA celular, evidenciado pela ausência de bandas de globina enquanto o DNA do plasmídio permaneceu em todas as canaletas do gel.

A importância clínica do estudo do DNA circulante foi abordada por JAHR et al. (2001), em 30 amostras de plasma de pacientes com diferentes neoplasias. Este estudo quantificou o DNA livre no soro dos pacientes com neoplasia e em indivíduos normais, mostrando que a concentração média nos controles normais foi 13ng/ml, enquanto nos pacientes a média foi 180 ng/ml. Utilizando metodologia sensível de PCR quantitativo, encontraram frações de DNA de célula tumoral e não tumoral (célula endotelial e linfócitos T). A quantidade de DNA tumoral variou de 3 a 93% do total de DNA circulante, isto é, 10 a 1000ng DNA/ ml plasma. Demonstraram, através de linhagens celulares e modelo em ratos, que a origem do DNA tumoral poderia ser apoptose produzindo fragmentos de DNA múltiplos de 180 pares de bases, enquanto a necrose resultava em fragmentos maiores.

Encontramos diferença nos resultados revelados na eletroforese em gel de agarose quando aumentávamos a quantidade de DNA da reação de PCR/

Multiplex. Em algumas amostras que simularam concentrado de hemácias e tiveram seu DNA purificado e propositadamente, aumentado na reação, os resultados para produtos de globina com 268 pb foram positivos. Atribuímos a presença de algumas bandas ao número elevado de células nucleadas remanescentes, como os leucócitos e a restos apoptóticos da radiação nestas amostras. O estudo com amostras de plasma confirmou os achados de eficácia da associação de leucofiltro e irradiação para produtos com 268 pares de bases, já que fomos capazes de diminuir a quantidade de células nucleadas nestas amostras.

Diferente dos estudos europeus que não utilizaram leucofiltro, nossos resultados mostraram eficiência semelhante quando as amostras eram submetidas a leucorredução comparada a leucorredução seguida de irradiação. Desde 1999 a leucorredução universal foi implantada na Europa e não foi avaliada anteriormente com este objetivo. Já os estudos retrospectivos de KLIMBERG et al. (1986) e ZULIM et al. (1993), com número restrito e heterogêneo de casos não demonstraram diferença no risco de desenvolvimento de metástases durante um seguimento de um ano e dois anos, respectivamente, para os pacientes que utilizaram a recuperação intra-operatória. Concordamos com estes autores no fato de que células circulantes não são sinônimos de metástases, já que elas devem deixar a circulação, atravessar membranas, estabelecer um suprimento sangüíneo, expressar receptores de superfície e secretar fatores de crescimento para estabelecer as metástases. Os estudos anteriores que utilizaram somente leucofiltro não foram

capazes de eliminar totalmente as células tumorais pela limitação numérica ou pelas diferentes cargas de superfície dos tumores para que ocorra adesão ao filtro. Além disso, não sabemos o significado do DNA circulante dos pacientes com neoplasia, se aqueles que apresentam metástases possuem uma maior quantidade de DNA. Através de técnica de radioimunoensaio LEON et al. (1977) não encontraram correlação entre níveis de DNA com tamanho e localização do tumor primário. Entretanto, demonstraram níveis superiores no soro de pacientes com doença metastática (média de 209 ± 39 ng/ml) quando comparados com paciente sem doença metastática (média de 100 ± 30 ng/ml, $p < 0,02$).

É nosso desafio transfundir produtos com extremo grau de pureza, entretanto, ainda buscamos respostas para estas questões: Qual a diferença da célula tumoral que circula nos pacientes com câncer e a célula tumoral do campo operatório? A passagem pela recuperadora modifica a expressão de receptores de adesão? (THOMAS 1999). Por que é possível realizar autotransfusão pré-depósito e transplante autólogo de medula, mas persiste a recomendação de não se reinfundir o sangue recuperado durante a autotransfusão intra-operatória?

Este estudo qualitativo abre a perspectiva para tentar responder estas perguntas e para a possibilidade da aplicação da recuperação autóloga intra-operatória nas cirurgias oncológicas com o seguimento destes pacientes. Fomos capazes de propor uma metodologia que aplicada *in vivo*, em pacientes com diferentes estadios da neoplasia e submetidos à validação desta reação de

PCR/Multiplex, trará o benefício de suprir as necessidades cirúrgicas da transfusão de eritrócitos no paciente oncológico. Além disso, a utilização do sangue autólogo intra-operatório também melhora a situação da falta de estoque para os procedimentos cirúrgicos, impedindo o seu cancelamento. As cirurgias para exérese de qualquer tumor não podem ser adiadas pelas próprias características da doença de base, isto é, a progressão da patologia elimina as chances de tratamentos que seriam curativos, acarretando maior número de cirurgias paliativas.

6. CONCLUSÃO

Simulando a recuperação de sangue intra-operatória, após lavagem com salina, leucorredução e irradiação com 25 Gy, houve ausência de viabilidade de células nucleadas, como visto pelo método de acridine orange e iodeto de propídeo. E os ensaios de PCR/Multiplex confirmaram a ausência de produtos de DNA com 268 pares de bases, sem diferença entre as linhagens tumorais inoculadas, representativas dos tumores sólidos mais freqüentes: carcinoma, melanoma e sarcoma.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfieri C, Tanner J, Carpentier L, et al. Epstein-Barr virus transmission from a blood donor to an organ transplant recipient with recovery of the same virus strain from the recipient's blood and oropharynx. **Blood** 1996; 87:812-17.

Alving BM, Weinstein MJ, Finlayson JS, Menitove JE, Fratantoni JC. Fibrin sealant: summary of a conference on characteristics and clinical uses. **Transfusion** 1995; 35:783-90.

American Type Culture Collection (ATCC). Available from: <URL: <http://www.atcc.org/SearchCatalogs>> [2002 May 6].

Blumberg N, Heal JM. Effects of transfusion on immune function: cancer recurrence and infection. **Arch Pathol Lab Med** 1994; 118:371-9.

Bordin J, Heddle NM, Blajchman MA. Biologic effects of leucocytes present in transfused cellular blood products. **Blood** 1994; 84:1703-21.

Cohen-Jonathan E, Bernhard EJ, McKenna WG. How does irradiation kill cells? **Curr Op Chem Biol** 1999; 3:77-83.

Corash L. Strategies for pathogen inactivation. In: Hillyer C, editor. **The safety of the blood supply**. Atlanta: Georgia; 1999. p.46-57.

Edelman MJ, Potter P, Mahaffey KG, Frink R, Leidich RB. The potential for reintroduction of tumor cells during intraoperative blood salvage: reduction of risk with use of the RC-400 leucocyte depletion filter. **Urology** 1996; 47:179-81.

Foglieni C, Meoni C, Davalli AM. Fluorescent dyes for cell viability: an application on prefixed conditions. **Histochem Cell Biol** 2001; 115:223-9.

Goodnough LT, Brecher ME. Autologous blood transfusion. **Intern Med** 1998; 37:238-45.

Goodnough LT, Monk TG, Brecher ME. Autologous blood procurement in surgical setting: lessons learned in the last 10 years. **Vox Sang** 1996; 71:133-41.

Grass JA, Hei DJ, Metchette K, et al. Inactivation of leucocytes in platelet

concentrates by photochemical treatment with psoralen plus UVA. **Blood** 1998; 91:2180-8.

Greenburg AG. New transfusion strategies. **Am J Surg** 1997; 173:49-52.

Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: effects of fixative and fixation time. **Am J Clin Pathol** 1991; 95:117-24.

Hansen E, Wolff N, Knuechel R, Ruschoff J, Hofstaedter F, Taeger K. Tumor cells in blood shed from the 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.

Ho L, Chan SY, Chow V, et al. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. **J Clin Microbiol** 1991; 29:1765-72.

Homann B, Zenner HP, Schaubert J, Ackerman R. Tumor cells carried through autotransfusion: are these cells still malignant? **Acta Anaesthesiol Belg** 1984;

35:51-9.

Jahanmehr SAH, Hyde K, Geary CG, Cinkotal KI, Maciver JE. Simple technique for fluorescence staining of blood cells with acridine orange. **J Clin Pathol** 1987; 40:926-9.

Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. **Cancer Res** 2001; 61:1659-65.

Jensen LS, Kissmeyer-Nielsen P, Wolff B, Qvist N. Randomised comparison of leucocyte-depleted versus buffy-coat-poor blood transfusion and complications after colorectal surgery. **Lancet** 1996; 348:841-5.

Kanegane H, Bhatia K, Gutierrez M, et al. A syndrome of peripheral blood T-cell infection with Epstein-Barr virus (EBV) followed by EBV-positive T- cell lymphoma. **Blood** 1998; 91:2085-91.

Klimberg I, Sirois R, Wajsman Z, Baker J. Intraoperative autotransfusion in urologic oncology. **Arch Surg** 1986; 121:1326-9.

Kongsgaard UE, Wang MY, Kvalheim G. Leucocyte depletion filter removes cancer cells in human blood. **Acta Anaesthesiol Scand** 1996; 40:118-20.

Leon SA, Shapiro B, Sklaroff M, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. **Cancer Res** 1977; 37:646-50.

Mascotti K, McCullough J, Burger SR. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. **Transfusion** 2000; 40:693-701.

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.

Oberman HA. The history of transfusion medicine In: Petz LD, Swisher SN, Kleinmam S, Spence RK, Strauss RG, editors. **Clinical practice of transfusion medicine**. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1996. p.11-32.

Popovsky MA, Triulzi D. The role of the transfusion medicine consultant. **Am J Clin Pathol** 1996; 105:798-801.

Popovsky MA, Devine PA, Taswell HF. Intraoperative autologous transfusion. **Mayo Clin Proc** 1985; 60:125-34.

Price TH, Goodnough LT, Vogler WR, et al. The effect of recombinant erythropoietin on the efficacy of autologous blood donation in patients with low hematocrits: a multicenter, randomized, double-blind, controlled trial.

Transfusion 1996; 36:29-36.

Roback JD, Hillyer CD. The role of leukocyte reduction in minimizing the risk of transfusion-transmission of cell-associated infectious agents and immunomodulation. In: Hillyer CD, editor. **The safety of the blood supply**. Atlanta: Georgia; 1999. p.28-45.

Ruppova K, Wsolova L, Sedlak J, Horvathova M, Urbancikova M. Detection of apoptotic changes in HeLa cells after treatment with paracetamol and sodium floride [Abstract]. **Gen Physiol Biophys** 1999; 18 Spec No:140-6.

Segreto RA, Segreto HRC. Radiação ionizante e resposta celular: atualidades. **Radiol Bras** 1997; 30:301-7.

Segreto HRC, Silva MRR, Egami MI, Segreto RA. Apoptose e radiação: revisão. **Radiol Bras** 1998; 31:1-8.

Simon TL, Alverson DC, AuBuchon J, et al. Practice parameter for use of red blood cell transfusions. **Arch Pathol Lab Med** 1998; 122:130-8.

Soderberg-Naucler C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. **Cell** 1997; 91:119-26.

Spence RK. Blood substitutes. In: Petz LD, Swisher SN, Kleinmam S, Spence

RK, Strauss RG, editors. **Clinical practice of transfusion medicine**. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1996. p.967-84.

Thomas MJG. Infected and malignant fields are an absolute contraindication to intraoperative cell salvage: fact or fiction? **Transfus Med** 1999; 9: 269-78.

Vahey MT, Wong MT, Michael NL. A standard PCR Protocol: rapid isolation of DNA and PCR assay for β -globin. In: Dveksler D, editor. **PCR primer a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1995. p. 17-21.

Valbonesi M, Bruni R, Lercari G, Florio G, Carlier P, Morelli F. Autopheresis and intraoperative blood salvage in oncology surgery. **Transfus Sci** 1999; 21:129-39.

Vamvakas EC, Carven JH. Allogeneic blood transfusion, hospital charges and length of hospitalization. **Arch Pathol Lab Med** 1998; 122:145-51.

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

Vieira SD, Santos M, Rosales T, et al. Autotransfusão intraoperatória em cirurgia cardíaca: estudo comparativo de 140 casos. **Rev Bras Cir Cardiovasc** 1992;

7:287-92.

Whitby D, Howard MR, Tenant-Flowers M, et al. Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression of Kaposi's sarcoma. **Lancet** 1995; 346:799-802.

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.

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.

Molecular evidence of tumour cell removal from salvaged blood after irradiation and leucocyte depletion

M. C. C. Poli,* L. L. Villa,† R. Colella* and D. Deheinzelin‡ *Transfusion Medicine Department, †Ludwig Institute for Cancer Research, and ‡Intensive Care Unit of the Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer, São Paulo, Brazil

Received 10 June 2003; accepted for publication 28 November 2003

SUMMARY. Intra-operative autologous blood recovery offers many advantages. However, blood salvage during cancer surgery is of limited use due to the potential presence of circulating tumour cells. It was the aim of this study to show that intra-operative salvage blood can be freed of cells and cellular DNA after leucoreduction by filtration and irradiation of washed blood.

Known amounts of tissue culture derived from carcinoma, melanoma and osteosarcoma were added to whole blood bags. This mixture was then submitted to washing, leucoreduction and irradiation. Samples were studied stepwise in relation to the integrity and size of DNA by the polymerase chain reaction (PCR).

After filtration and irradiation, PCR targeting the β -globin gene (268 bp amplicon) was negative. Our results were corroborated by studying plasma samples added with tumoural cells.

Using PCR methodology, we showed the absence of DNA from cells in experimentally contaminated blood and plasma bags after filtration and irradiation. This experimental study is an effort to ensure the safety of intra-operative autologous transfusion.

Key words: cancer, intra-operative autologous transfusion, leucoreduction, PCR.

The challenge of transfusion medicine is to infuse high-purity products without infectious agents and undesirable cells. Strategies for pathogen inactivation and the universal leucoreduction claim to minimize viral transmission, alloimmunization and many others transfusional reactions. In order to prevent transfusion complications associated with white blood cells (WBCs), 4-log filters have been developed and implemented that yield residual WBC counts at or below 10^5 – 10^6 WBCs per unit of red blood cells (30 – 300 cells mL^{-1}). Experimental 6-log filters have been developed that yield 10^3 – 10^4 WBCs per unit of red blood cells (0.3 – 3 cells mL^{-1}) (Lee *et al.*, 2002). Therefore, filtered salvaged blood in extensive surgical procedures could be considered a safe procedure.

The safety of intra-operative salvage blood in cancer patients remains to be confirmed since Yaw *et al.* (1975) found lung carcinoma cells in the device. Twenty years later, Hansen *et al.* (1995) described clonogenicity after re-infusion of human salvaged blood in nude mice. However, other groups showed safety of the procedure *in vitro* after whole blood filtration for leucodepletion (Kongsgaard *et al.*, 1996). Hansen *et al.* (1999), based on the radiosensitivity of blood cells and the fact that a single radiation dose can interfere with DNA repair, re-infused intra-operative autologous salvaged blood irradiated with 50 Gy. Valbonesi *et al.* (1999) also re-infused autologous irradiated preoperative deposited units and intra-operative salvaged blood in oncologic patients. Although these authors stated that the procedure was safe, there is not enough follow up of these patients to clinically corroborate this observation. Nonetheless, salvaged blood irradiation in cancer surgery was performed in more than 700 cases, at 30 different centres in Europe, throughout the last 6 years (Hansen *et al.*, 2002).

Correspondence: Dr Mônica Cristóvão Poli, MD, Hospital do Câncer, Rua Professor Antonio Prudente, 211-CEP: 01509-010, São Paulo, Brazil. e-mail: mcepoli@hcancer.org.br
Supported in part by the Banco de Sangue de São Paulo and Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, Brazil.

Presently, most operating rooms or blood banks make use of a standing intra-operative recovery with leucocyte filters to prevent transfusion reactions. Other groups prefer irradiation, although the cells remain in the salvaged blood.

Vamvakas & Blajchman (2001) suggest that allogeneic transfusion in cancer patients may be associated with immunosuppression, but its clinical impact has not yet been established. In a meta-analysis based on 79 observational studies, comparing the risk of cancer recurrence between transfused and non-transfused patients, almost half of them (35 patients) showed a statistically significant association between peri-operative transfusion and an adverse clinical outcome (Blajchman *et al.*, 2001). Thus, the question whether allogeneic blood transfusions should be performed in cancer patients is still very much an open issue.

Aiming at establishing better tools to determine the safety of red cell salvage utilization in cancer patients, in the present study, we simulated recovery of tumour cells in salvaged blood by adding known quantities to blood bags. After saline washing, leucoreduction and irradiation DNA tests were performed using molecular biology techniques.

MATERIALS AND METHODS

Blood samples

The research and ethics committee of Hospital do Câncer, São Paulo, Brazil, approved this study. Blood samples were obtained from nine blood donors of Hospital do Câncer Blood Bank.

Tumour cells

Tumour cells were obtained from the Ludwig Institute of Cancer Research, São Paulo Branch, Brazil, cultured using standard media and procedures and included HeLa, SK-MEL and SaOs (American Type Culture Collection, respectively: CRL-7939, HTB-71 and CCL-2); these cells are representative of the most common solid tumours treated with surgery, respectively, adenocarcinoma, melanoma and osteosarcoma. After the Trypan Blue exclusion test to assure viability, cells were counted in a Neubauer haemocytometer and inoculated in 450-mL whole blood bags.

Experimental design

Each blood bag (Baxter PL 146) was separated in four units: A, B, C and D that were contaminated

with 0, 10, 1000 and 1 million tumour cells, respectively. These cell amounts are similar to those reported in recovered blood samples from oncological patients, ranging from 10 to 7×10^6 cells (Hansen *et al.*, 1995). Each unit was then submitted to washing with saline by centrifugation, filtration (Purecell Neo-PALL, East Hills, NY, USA) and irradiation with 25 Gy (Gamma-cell 3000, Nordion, Kanata, Ontario, Canada). Each unit was tested in triplicate. After these procedures, aliquots were obtained as follows: 1, no treatment; 2, after washing; 3, after washing and filtration; and 4, after washing, filtration and irradiation.

PCR for each experimental condition

DNA was extracted from 0.5 mL of whole blood by using a commercially available purification kit (GFXTM Genomic Blood DNA Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany). All polymerase chain reaction (PCR) reactions were performed in a Multiplex assay. A fragment of the globin gene was chosen as an internal control for availability and quality of DNA after extraction. Reaction included 1 μ M of each β -globin gene primer pCO3 (5'-GAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') and pCO4 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') (Greer *et al.*, 1991) which generate a 268 bp product, and 1 μ M each of the following primers complementary to the long control region (LCR) of human papillomavirus-16 (HPV-16) cloned in pBR 322 (kindly provided by E. M. de Villers, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany) LCR3' (TGTACCCACACACGTTTGG) and LCR5' (TCGGTTGCATGCTTTTGGC) (Ho *et al.*, 1991). Other reagents included 10 mM Tris-HCl; pH 8.3; 50 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 100 μ M dNTP; and 0.7 μ L of *Taq* DNA polymerase (5 U μ L⁻¹) (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). The HPV primers targeted the LCR of recombinant HPV-16 plasmid DNA added to the reaction mixture served as a positive control, because absence of the globin amplicon could be due to inhibition.

DNA extracted from HPV-18-positive HeLa cells, HPV-16 recombinant plasmid and SiHa cells, a cervical carcinoma cell line HPV-16 positive (HTB-35), were used as positive controls. The PCR products were separated by 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide.

Although the filtration step aimed primarily at purging blood nucleated cells, the detection of globin DNA could be due to the subsistence of lymphocytes and other blood cells instead of tumour cells. We therefore performed the whole procedure with fresh plasma samples to avoid normal nucleated blood cells.

For these studies, we added to plasma cells from C-33 (HTB-31) an HPV-negative cervical carcinoma cell line, as well as HPV-16 plasmid in the PCR reaction.

RESULTS

The estimated initial concentration of nucleated cells was $7 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, and after the whole procedure, the final concentration varied from 10^6 to 10^9 nucleated cells mL^{-1} , once that the largest amount of tumour cells added was 10^6 in 100 mL. The number of cells in each experimental observation ranged from <1 –1000 being either lymphocytes or tumoural cells and were carefully distributed from the addition in the blood bag to the final aliquot from which DNA was extracted and submitted to PCR.

Using a PCR-Multiplex assay, we demonstrated the absence of globin DNA fragments (268 bp) after the whole treatment (Fig. 1). This figure shows a 268-bp DNA band in all lanes 1 and 2, but no DNA fragment in lanes 3 or 4, which were submitted to WBC reduction and irradiation. However, a positive signal corresponding to the recombinant plasmid DNA was observed in all experimental conditions, indicating that the reaction mix and conditions were adequate to amplify, in this case, an exogenous DNA.

There were no differences between tumour cell lines as shown in Fig. 1(A–C). The apparent contradiction between the results with 10 SaO cells showing faint signals for the globin gene, as compared to 1000 or 1 million cells, is possibly due to PCR contamination. To ensure that the lack of amplification was not due to reduced amounts of the DNA of interest in the sample, we increased the amount of total DNA in the PCR reactions, which included 10 and 20 μL of the extracted DNA (data not shown). In such conditions, we started to observe amplification of the expect size, possibly corresponding to the globin gene. These could originate from leucocytes remaining in the washed, filtered and irradiated blood. We therefore sought to repeat the experiments with fresh plasma samples loaded with the same amount of tumour cells and submitted to the same experimental protocol. The presence of globin amplicons were observed only in lane 1, corresponding to no treatment and were absent after the filtration and irradiation steps (Fig. 2), even at the largest cell inoculum.

DISCUSSION

Initial studies using filters to reduce leucocytes in intra-operative salvage blood from oncologic surgeries did not prove its safety (Edelman *et al.*,

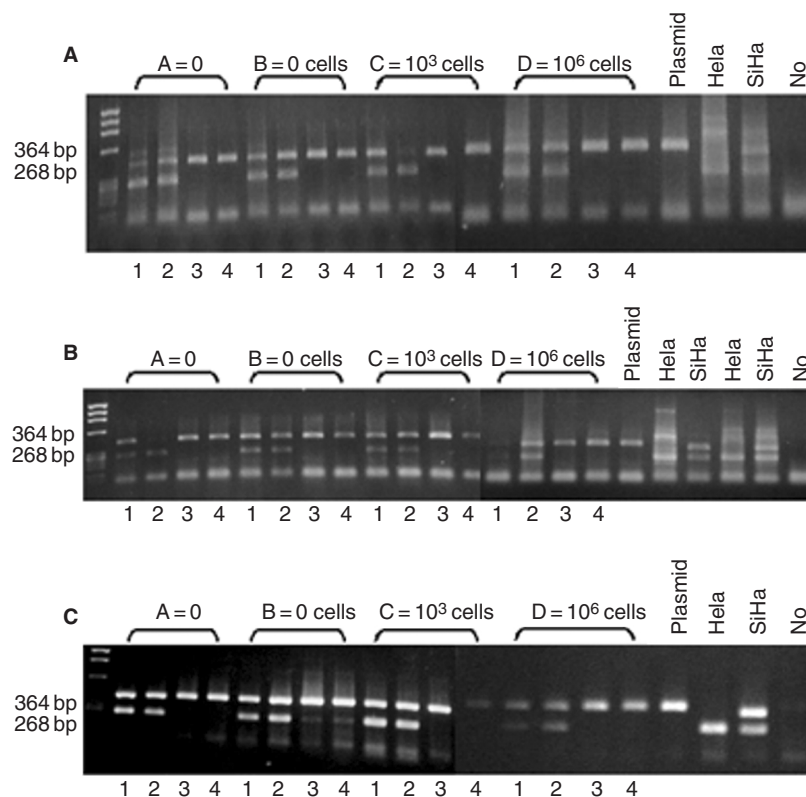


Fig. 1. The absence of globin DNA fragments (268 bp) after the whole treatment using a polymerase chain reaction-Multiplex assay.

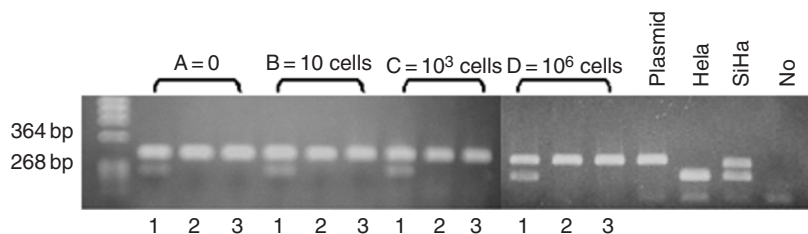


Fig. 2. The presence or absence of globin amplicons observed corresponding to no treatment and after the filtration and irradiation steps.

1996). These filters are able to reduce leucocyte concentrations around 3 logs, and probably tumour cells are reduced in the same manner. The results that we obtained by increasing the amount of DNA in the PCR procedure corroborates such assumption, suggesting that previous negative results could be due more to sampling techniques than to actual absence of DNA. Notwithstanding the above, salvaged leuco-depleted blood should be considered to decrease the risk of alloimmunization, as well as to prevent infectious diseases, and hence filters are indicated (Roback & Hillyer, 1999).

Previous attempts of irradiation in salvaged blood used a dose of 50 Gy, as reported to be sufficient for elimination of 99.9% of all tumour cells (Hansen *et al.*, 1999). We have obtained similar result with half this dose in this study by PCR technique with the absence of globin in both 25 and 50 Gy (data not shown). Although, 50 Gy is theoretically safer, the FDA recommendation is that the target dose for use in irradiating blood components should be 25 Gy (Moroff *et al.*, 1997).

The cell lines chosen represent the most frequent solid tumours, namely carcinoma, melanoma and sarcoma. However, because our assay is not tumour cell specific, we choose to amplify the globin gene present both in normal leucocytes and in tumour cells. The plasma experiment intended to eliminate leucocytes of samples, and therefore, observation of the globin amplicon could be attributed to the tumour cells. In all experimental conditions, however, we did not observe such amplicons which indicates the removal of cells from treated blood. Fragments of the expected size were observed in aliquots before filtration that contained up to 1000 total cells (Fig. 2, lane1).

We pointed out that the re-infusion of irradiated salvaged blood is not yet established as a safe procedure. The possibility of re-infusion of DNA fragments was not addressed before. Although we do not know its clinical significance, it was demonstrated that oncologic patients have larger amounts of circulating DNA than healthy controls (Jahr *et al.*, 2001). In any case, we assume that lack of the globin

amplicon is indicative of the lack of cells and large DNA fragments in our controlled experimental conditions.

Moreover, regarding the use of salvaged blood, what is the difference between circulating tumour cells commonly found in cancer patients and the cells recovered in the intra-operative field (Thomas, 1999)? It is known that during autologous bone marrow transplantation there is risk of tumour cells re-infusion (Valbonesi *et al.*, 1999). Because a randomized trial designed to prove the safety of salvaged blood re-infusion would face a significant multiplicity of biases and follow up difficulties, any further step to prove the security of the procedure should be taken.

These qualitative results must be validated *in vivo*, using the intra-operative device in oncologic patients with different degrees of tumoural disease. Ideally, a tumour-specific marker should be used to determine the number of tumour cells in the blood.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the contribution of the following Ludwig Institute for Cancer Research researchers: S. Ferreira for excellent technical assistance and performing PCR, Dr A. C. Barbosa for assistance with cell-culture procedures and R. Myamura for DNA purification.

REFERENCES

- American Type Culture Collection (ATCC) (2002) Available from <http://www.atcc.org/SearchCatalogs>, May 6.
- Blajchman, M.A., Dzik, S., Vamvakas, E.C., Sweeney, J. & Snyder, E.L. (2001) Clinical and molecular basis of transfusion-induced immunomodulation: summary of the proceedings of a State-of-the-art Conference. *Transfusion Medicine Reviews*, **15**, 108–135.
- Edelman, M.J., Potter, P., Mahaffey, K.G., Frink, R. & Leidich, R.B. (1996) The potential for reintroduction of tumor cells during intraoperative blood salvage: reduction of risk with use of the RC-400 leucocyte depletion filter. *Urology*, **47**, 179–181.

- Greer, C.E., Peterson, S.L., Kiviat, N.B. & Manos, M.M. (1991) PCR amplification from paraffin-embedded tissues: effects of fixative and fixation time. *American Journal of Clinical Pathology*, **95**, 117–124.
- Hansen, E., Bechmann, V. & Altmeyen, J. (2002) Intra-operative blood salvage in cancer surgery: safe and effective? *Transfusion Apheresis Science*, **27**, 153–157.
- Hansen, E., Knuechel, R., Altmeyen, J. & Taeger, K. (1999) Blood irradiation for intraoperative autotransfusion in cancer surgery: demonstration of efficient elimination of contaminating tumor cells. *Transfusion*, **39**, 608–615.
- Hansen, E., Wolff, N., Knuechel, R., Ruschoff, J., Hofstaedter, F. & Taeger, K. (1995) Tumor cells in blood shed from surgical field. *Archives of Surgery*, **130**, 387–393.
- Ho, L., Chan, S.Y., Chow, V., Chong, T., Tay, S.K., Villa, L.L. & Bernard, H.U. (1991) Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *Journal of Clinical Microbiology*, **29**, 1765–1772.
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F.O., Hesch, R.D. & Knippers, R. (2001) DNA fragments in blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Research*, **61**, 1659–1665.
- Kongsgaard, U.E., Wang, M.Y. & Kvalheim, G. (1996) Leucocyte depletion filter removes cancer cells in human blood. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, **40**, 118–120.
- Lee, T.H., Wen, L., Chrebtow, V., Higuchi, R., Watson, R.M., Sninsky, J.J. & Busch, M.P. (2002) Quantitation of residual WBCs in filtered blood components by high-throughput, real-time kinetic PCR. *Transfusion*, **42**, 87–93.
- Moroff, G., Leitman, S.F. & Luban, N.L.C. (1997) Principles of irradiation, dose validation and quality control. *Transfusion*, **37**, 1084–1092.
- Roback, J.D. & Hillyer, C.D. (1999) The role of leukocyte reduction in minimizing the risk of transfusion–transmission of cell-associated infectious agents and immunomodulation. In: *The Safety of the Blood Supply* (ed. Hillyer, C.D.), 28–45. Department of Pathology and Laboratory Medicine, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia.
- Thomas, M.J.G. (1999) Infected and malignant fields are an absolute contraindication to intraoperative cell salvage: fact or fiction? *Transfusion Medicine*, **9**, 269–278.
- Valbonesi, M., Bruni, R., Lercari, G., Florio, G., Carlier, P. & Morelli, F. (1999) Autopheresis and intraoperative blood salvage in oncology surgery. *Transfusion Science*, **21**, 129–139.
- Vamvakas, E.C. & Blajchman, M.A. (2001) Deleterious clinical effects of transfusion-associated immunomodulation: fact or fiction? *Blood*, **97**, 1180–1195.
- Yaw, P.B., Sentany, M., Link, W.J., Wahle, W.M. & Glover, J.L. (1975) Tumor cells carried through autotransfusion. Contraindication to intraoperative blood recovery? *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, **231**, 490–491.

