

MODELO DE PERFUSÃO PULMONAR ISOLADA EM RATOS COM
METÁSTASES PULMONARES DE SARCOMA

Airton Schneider

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
DE MEDICINA-PNEUMOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Cirurgia
Torácica do Memorial Sloan Kettering Cancer Center
Nova Iorque, Nova Iorque, Estados Unidos

ORIENTADOR:

José Jesus Peixoto Camargo
Professor do Curso de Pós-graduação.

CO-ORIENTADORES:

Michael Burt, PhD. Cirurgião do Memorial
Sloan Kettering Cancer Center, NY, NY.

Roberto Corrêa Chem. Cirurgião Plástico,
Diretor do Serviço de Microcirurgia Re-
construtiva da Santa Casa de Misericór-
dia de Porto Alegre.

1991

T-0505

1. AGRADECIMENTOS:

Este trabalho não poderia ser realizado sem o apoio de algumas pessoas como Dr. Michael Burt, incansável mentor de idéias; Dr. Robert Ginsberg, Chefe do Departamento de Cirurgia Torácica do Memorial Sloan Kettering Cancer Center; Dr. Dirk Van Raendonk; Dr. Roberto Corrêa Chem, "Pai Cirúrgico" e Dr. Paulo Roberto Ott Fontes, amigo.

Agradeço ao Dr. José Camargo pelo incentivo de ir ao Exterior, para completar meu aprendizado na especialidade.

Meus agradecimentos também devem ser dirigidos à Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul.

Dedico este trabalho aos meus pais, secretos torcedores.

Finalmente, agradeço a Isabel: aquela que incentivou nas piores horas e soube dizer muito sem falar.

2. INDICE

1.Agradecimentos.....	3
2.Introdução.....	7
3.Objetivos.....	13
4.Material e Métodos.....	15
5.Resultados.....	29
6.Discussão.....	40
7.Perspectivas Futuras.....	48
8.Conclusões.....	50
9.Bibliografia.....	52
10.Abstract.....	56

2. INTRODUCAO

Aproximadamente 4500 novos casos de sarcoma de tecidos moles são reportados nos Estados Unidos da América a cada ano. Destes, quase 1600 pacientes morrem desta doença no intervalo de 5 anos (1).

O grande problema no tratamento e controle desta doença são as metástases. Maecove (2) publicou uma série de 184 pacientes com sarcoma osteogênico em 1971. Setenta e cinco por cento deles desenvolveram metástases nos pulmões no intervalo de 18 meses após o tratamento cirúrgico da neoplasia primária. Não houve sobrevida em cinco anos nesta série.

Os pulmões representam o sítio mais frequente de metástases em pacientes que morrem de neoplasia e, em uma série de autópsias, Van Donger et al encontraram em 29% dos pacientes metástases nos pulmões (3).

Martini et al (4) relataram a capacidade de eliminar a doença metastática pulmonar de sarcomas em 22 de 28 pacientes, com sobrevida média em cinco anos de 32%. Estes resultados foram obtidos com associação de quimioterapia e cirurgia para a ressecção das metástases pulmonares.

Segundo J.Roth, em 1985, para o sarcoma osteogênico e dos tecidos moles, os pulmões representam o único sítio de metástase precoce em 90% dos casos. O uso de quimioterapia adjuvante tem reduzido, mas não eliminado, a incidência de

metástases pulmonares em alguns tumores, incluindo sarcomas de tecidos moles e tumores de testículo(5).

Beattie et al, em 1984, apresentaram um estudo com 13,6% de sobrevida em pacientes em 20 anos de seguimento, com múltiplas ressecções pulmonares de sarcoma metastático (6). Alguns pacientes sofreram até nove toracotomias.

Pierpont, em 1960, publicou o primeiro trabalho experimental de perfusão pulmonar com quimioterapia. Usando mostarda nitrogenada, verificou edema no pulmão perfundido, mas sem efeito na circulação sistêmica. A teoria de que as veias brônquicas drenam para as veias pulmonares foi confirmada, pois o brônquio não foi clampeado neste experimento (7).

Em 1969, Milke mostrou, num importante trabalho, que as metástases pulmonares são vascularizadas em 84% dos casos pelo sistema pulmonar sozinho ou também pelas artérias brônquicas. Somente 16% das metástases são vascularizadas apenas por artérias brônquicas (8).

Minchin et al, em 1983, publicaram um estudo pré-clínico e demonstraram que mais de 10-20 microgramas de adriamicina por grama de tecido pulmonar causavam lesão irreversível (9).

O mesmo grupo, em 1984, demonstrou ser possível perfusão pulmonar em cães com adriamicina e também não foi encontrada droga na circulação sistêmica. No mesmo trabalho, foram apresentados os primeiros três

casos de perfusão pulmonar em pacientes com metástases pulmonares de sarcoma irresssecáveis (10).

Por diversas razões os ratos são modelos atrativos para trabalhos com tumores. Além do baixo custo da manutenção destes animais, o sarcoma induzido por methylcholanthrene cresce facilmente no rato e vem sendo usado em diversos estudos de diferentes laboratórios (11,12,13).

Em 1976, D.Proctor afirmou que após injeção intravenosa de células tumorais em ratos, quase todas as células são filtradas nos pulmões. Este é o pré-requisito básico para a produção de metástases neste órgão (14).

Vários grupos têm realizado transplantes de pulmão em ratos, com sobrevida média de 60% dos casos, nos primeiros 30 dias pós-cirurgia (15,16,17 18).

O objetivo do desenvolvimento de um modelo de perfusão pulmonar única e de metástases pulmonares de sarcoma é testar o tratamento destas metástases de sarcoma com quimioterapia local, ou seja, perfundir drogas usadas comumente no tratamento de metástases de sarcoma apenas no pulmão, usando o benefício de uma maior concentração da droga sem os efeitos sistêmicos da quimioterapia.

Apesar do assunto ser da maior importância, não foram encontradas referências na literatura sobre semelhante projeto.

A adriamicina poderia ser a primeira droga a ser perfundida nas metástases de sarcoma, e seria feita uma

comparação entre as metástases do pulmão perfundido e as do pulmão sem tratamento, usando o tamanho e o número das metástases como maneira de avaliação da resposta do tratamento.

O teste "t" de Student seria aplicado nesta fase como método estatístico, sendo necessário conferir os níveis sistêmicos da droga.

Se o resultado nesta fase fosse estatisticamente significativo, ou seja, a perfusão pulmonar única com quimioterapia mostrando-se efetiva no tratamento das metástases pulmonares, seria necessária a comparação entre o tratamento intravenoso e a perfusão pulmonar, usando-se, para isso, um estudo randomizado com teste "t" de Student não-pareado, com $p < 0,05$, como nível de significância estatística.

Na procura de um modelo experimental em ratos para o desenvolvimento da técnica de perfusão pulmonar única e a produção de pequenas metástases de sarcoma nos pulmões, o projeto foi dividido em duas fases.

A primeira fase foi dedicada ao desenvolvimento da técnica de perfusão do pulmão esquerdo, com interesse especial para a adequada técnica de anestesia, ventilação, toracotomia, canulação dos vasos pulmonares, perfusão do pulmão e sutura da artéria e veia pulmonar.

O objetivo desta fase seria saber se é possível a perfusão pulmonar única com aceitável índice de mortalidade.

A segunda fase foi dedicada ao desenvolvimento da técnica de produção de metástases pulmonares de sarcoma induzido por methylcholanthrene em ratos.

Nesta fase, o objetivo seria saber se uma suspensão de células de sarcoma, após injeção intravenosa, é capaz de produzir metástases pulmonares, qual a dose de tumor necessária para a produção de pequenas metástases no pulmão, quanto tempo levariam estas metástases para se desenvolverem e, finalmente, como acompanhar o crescimento destas metástases no pulmão.

3. OBJETIVOS:

Os objetivos do presente trabalho são:

1. É possível desenvolver um modelo de perfusão pulmonar única em ratos ?

2. É possível o desenvolvimento de metástases pulmonares de sarcoma induzido por methylcholanthrene ?

3. Como poderia ser feito o acompanhamento das metástases ?

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.MATERIAL E MÉTODOS: FASE 1

Para esta fase de desenvolvimento de um modelo de perfusão pulmonar unilateral, foram utilizados 14 ratos tipo Fisher 344 (Laboratório Charles River), pesando entre 300 e 400 gramas.

Os animais foram alojados em compartimentos com temperatura e umidade controladas , com livre acesso à comida adequada e água.

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico 50 mg/Kg intraperitonal. Após tricotomizados na região torácica e cervical, uma pequena traqueostomia foi realizada e um tubo colocado para ventilação.

NOTA: Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Usos e Cuidados de Animais, Nova Iorque, sob protocolo número 9101009.

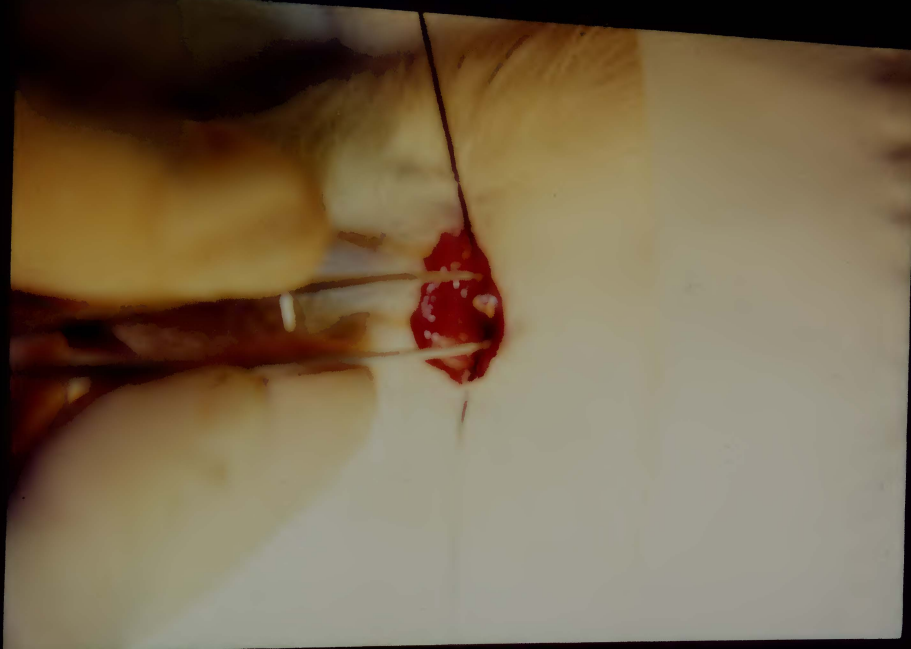


FOTO 1 - traqueostomia

Esse tubo foi conectado a um ventilador para roedores, modelo 683, da Harvard Indústria de Material para Cirurgia Experimental. A ventilação foi realizada com volume corrente de 3 ml com uma frequência de 100 vezes por minuto.

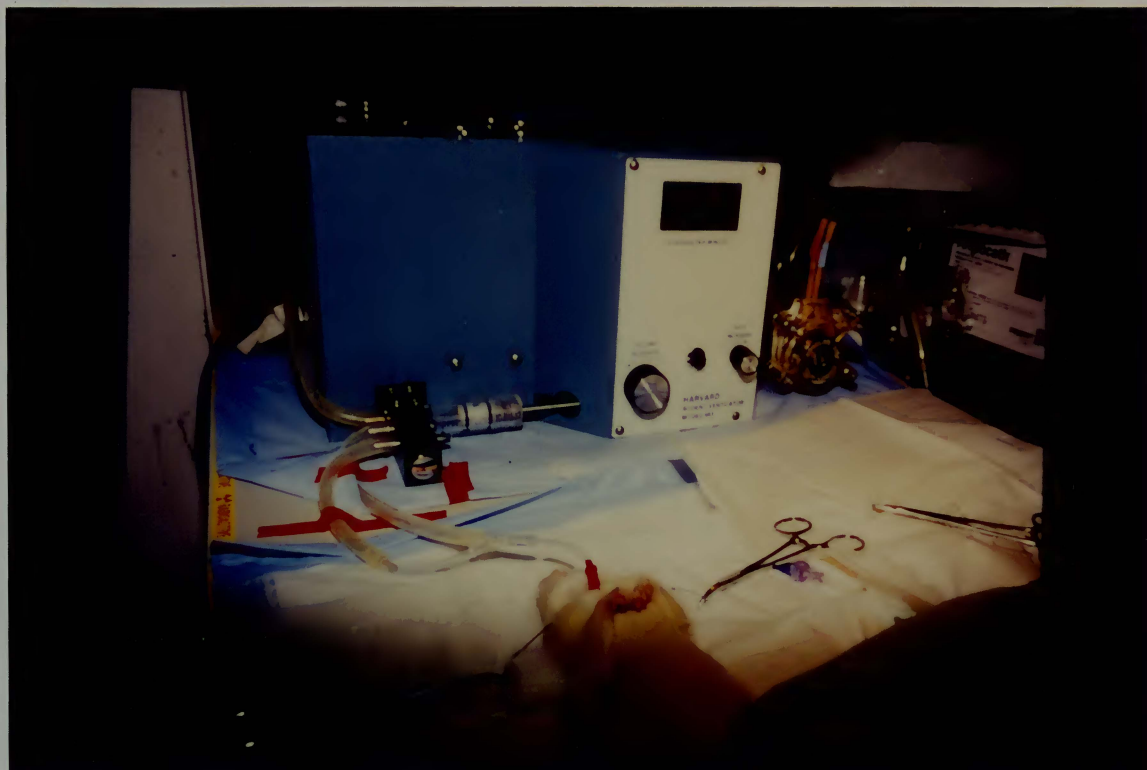


FOTO 2 - ventilador

Nos primeiros 4 ratos foi usada técnica limpa não-estéril e nos últimos 10 ratos foi utilizado material estéril.

Os ratos foram anestesiados e colocados em posição de toracotomia esquerda. Este procedimento foi realizado de modo convencional e a cavidade pleural foi abordada pelo quarto espaço intercostal.



FOTO 3 - toracotomia

O ligamento pulmonar foi desfeito e os vasos do pedículo pulmonar esquerdo foram dissecados.

A circulação do pulmão esquerdo foi interrompida com a colocação de cliques de microcirurgia na artéria e veia pulmonares. Por uma pequena arteriotomia, foi colocado um

cateter PE 10 distalmente ao clipe. A mesma manobra foi realizada na veia.

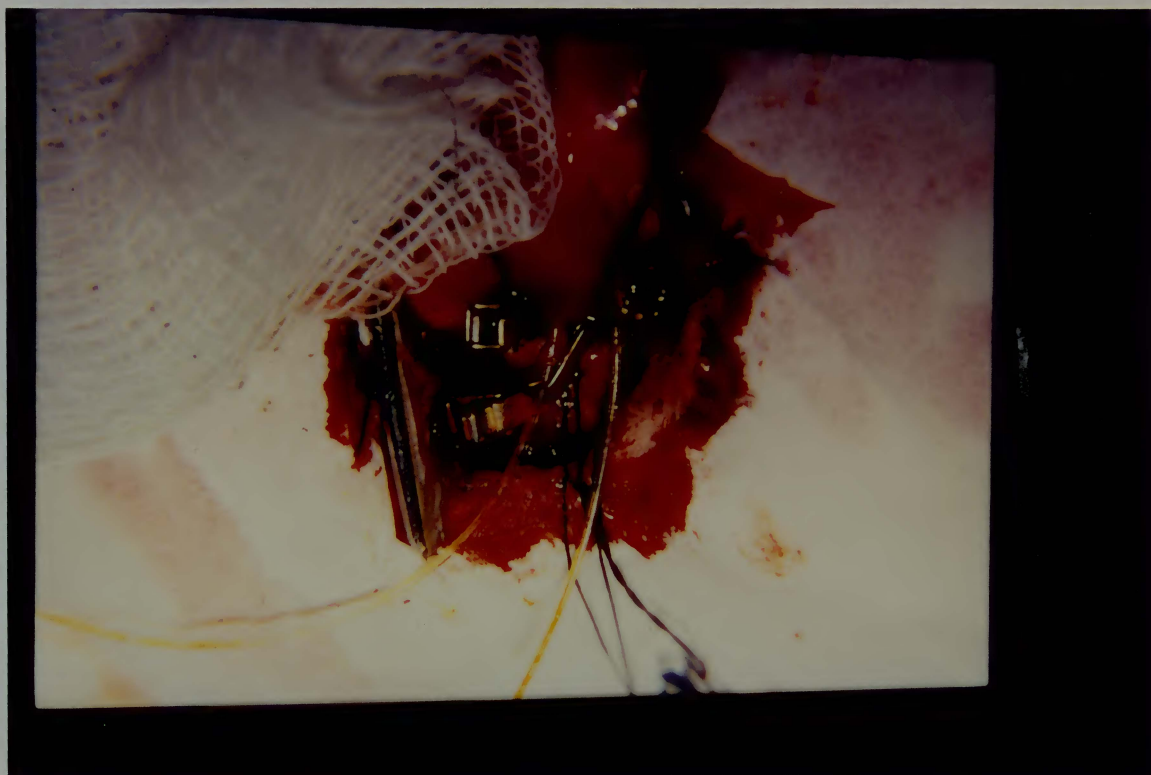


FOTO 4 - cateteres na artéria e veia

Os cateteres foram fixados com cliques de microcirurgia, distalmente à canulação, como mostrado na foto 5.

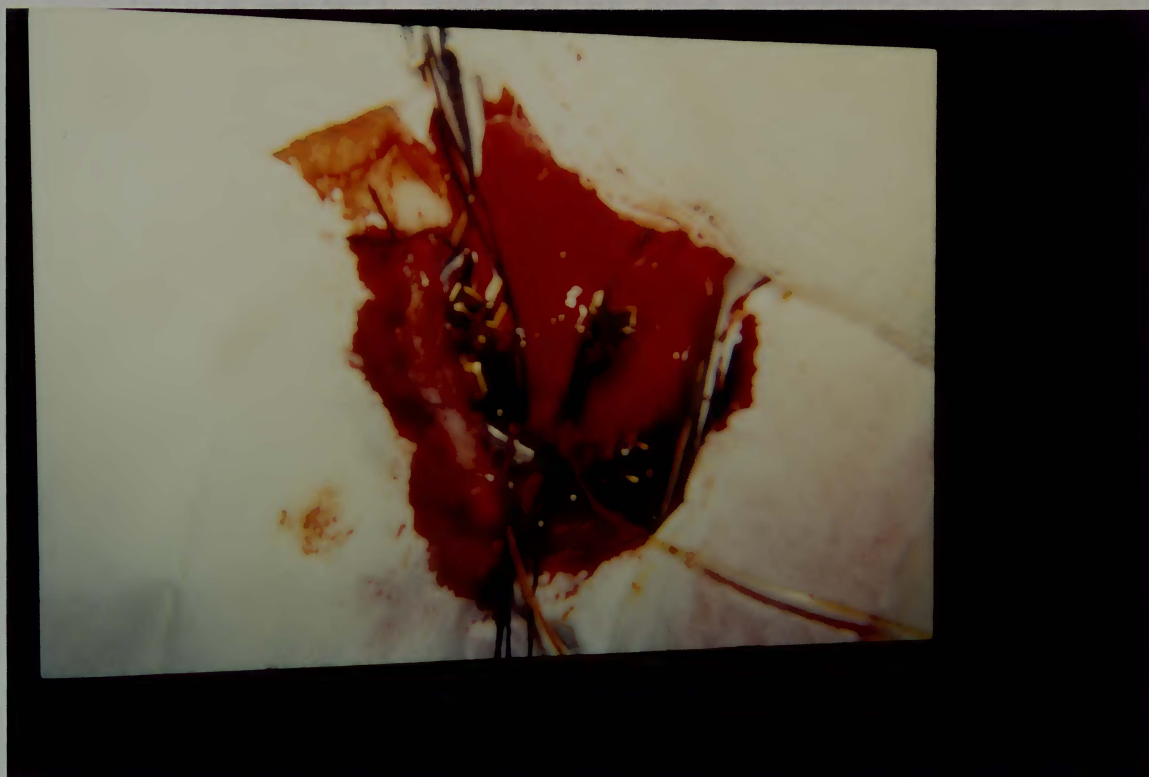


FOTO 5 - fixação dos cateteres

O cateter arterial, então, foi conectado a uma bomba de infusão (Infutrial 70000) e cloreto de sódio 0,9% foi infundido a uma velocidade de 50 ml/hora durante 15 minutos. Nos últimos 10 ratos foram usados, além da técnica totalmente estéril, penicilina numa concentração de 1 milhão para cada litro de solução a ser infundida, e heparina, 10 unidades para cada 100 ml de infusão.(Quadro 1)

Foi possível conferir a quantidade de substância perfundida no pulmão pelo cateter colocado na veia, como é mostrado na foto 7.

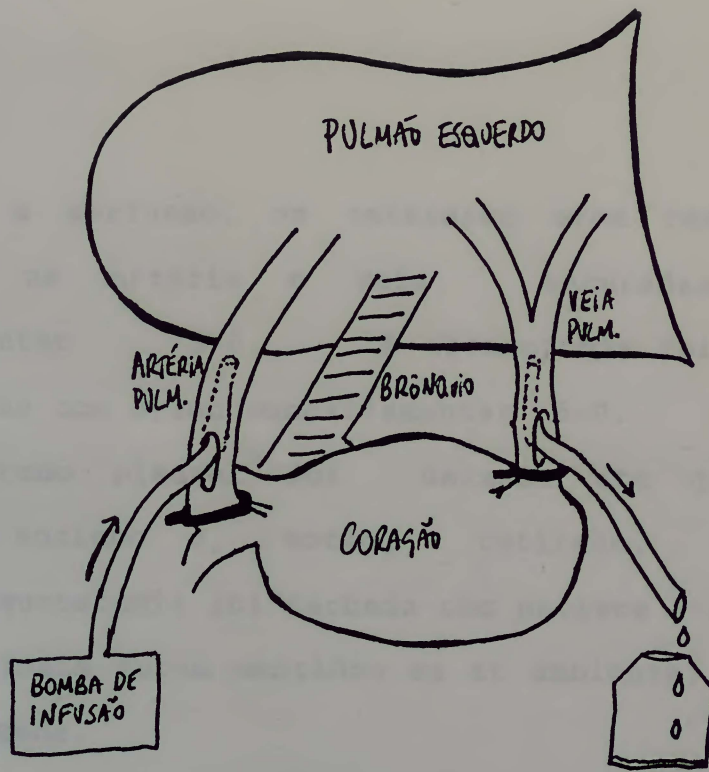


FOTO 6 - desenho do método de perfusão



FOTO 7 - líquido perfundido drenando
pelo cateter colocado na veia

Após a perfusão, os cateteres eram removidos e as incisões, na artéria e veia, suturadas com nylon monofilamentar 9-0. A toracotomia foi fechada em duas camadas com nylon monofilamentar 5-0.

Um dreno pleural foi deixado até que o animal respirasse sozinho e, então, retirado.

A traqueostomia foi fechada com prolene 7-0.

Os animais foram mantidos em ar ambiente, com comida e água à vontade.

O quadro 1 resume a fase de perfusão:

RATOS	-	TÉCNICA
1,2,3,4	-	limpa,não estéril
5,6,7,8,9,10 11,12,13,14	-	estéril (penicilina+heparina)

4.2.MATERIAL E MÉTODOS -FASE 2

Como foi colocado anteriormente no item 3, nesta fase, os objetivos eram os de produzir metástases pulmonares de sarcoma, com injeção de solução tumoral via intravenosa.

Além disso, seria acompanhado o desenvolvimento destas metástases através de radiogramas seriados e por tomografia computadorizada, pois é sabido que o radiograma de tórax, em ratos, apresenta dificuldade em revelar pequenas metástases pulmonares, principalmente no hemitórax esquerdo (19).

Para a obtenção de Raio X foi usado o sistema disponível comercialmente de mamografia da General Electric 500 T, com 0,3 mm de distância focal e 0,03 mm de filtro de molibdênio. A exposição foi realizada com 30 cm de distância. O filme "Microvision Dupont", com emulsão simples, foi exposto em cassete Agfa com 36KVp e 8 mAs.

A tomografia computadorizada foi obtida com um aparelho da General Electric 9800 com 70mA e 120 KVp com 2 segundos de tempo de corte. Aproximadamente 15 exposições contínuas de 3 mm foram necessárias para percorrer todo o tórax do animal.



FOTO 8 - Animais na câmara de tomografia

Foram utilizados 36 ratos, Fisher 344 (Laboratório Charles River) , pesando entre 300 e 400 gramas.

Os animais foram anestesiados com 40 mg/Kg de pentobarbital sódico intraperitoneal e divididos em 4 grupos de 9 animais.

Para cada um dos 4 grupos , foram injetadas 4 diferentes concentrações de células viáveis de sarcoma induzido por methylcholanthrene (10.000, 100.000, 1.000.000,10.000.000) .

Estas células foram selecionadas a partir de um tumor transplantado, em ratos, tipo sarcoma, induzido por uma substância cancerígena (methylcholanthrene).

O método usado consta de uma preparação de pequenos pedaços de sarcoma, selecionando as células tumorais mais viáveis com o uso de uma solução chamada " trypan blue" .

Após esta seleção, é contado o número de células em 1 mililitro de solução, e, por diluição ou concentração, chega-se até a concentração de células tumorais desejada.

A via de administração usada foi a veia dorsal do pênis, através de seringa e agulha calibre 25. A viabilidade das células tumorais assim como a concentração de tumor em cada mililitro foram conferidos após a passagem da suspensão pela agulha calibre 25 . Não houve diferença na qualidade e/ou concentração das células.

Foram programadas duas sessões de sacrifício, a primeira em 7 dias e a segunda em 14 dias após a injeção de tumor.

Os radiogramas de tórax e as tomografias foram realizados um dia antes do sacrifício dos animais.

Na sessão de injeção de tumor houve 4 mortes dos ratos. Duas por acidente anestésico, uma por embolia aérea e uma onde não foi possível explicar a causa.

A tabela 3 resume a fase de produção de metástases.

GRUPO	36 RATOS			
	1	2	3	4
	n=9	n=9	n=9	n=9
conc.tum.	10.000	100.000	1.000.000	10.000.000
acidentes	1 (2º dia- causa ?)	1 (embolia aérea)	-	2 (anestesia+ 2º dia-causa?)
n após in- jeção	8	8	9	7
n final=32				

Tabela 3: injeção de tumor
(n= número de animais)

5 - RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DA FASE 1

O trabalho foi terminado 50 dias após a primeira perfusão.

Os 14 ratos foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo de 4 ratos, com perfusão por técnica não-estéril e o segundo, de 10 ratos, com técnica estéril, antibióticos e heparina na solução a ser perfundida.

O rato número 1, no momento da avaliação dos resultados, ainda estava vivo.

Os ratos número 2 e 3 morreram no quarto dia de pós-operatório. Apresentaram um quadro progressivo de dispnéia e a necropsia mostrou o pulmão esquerdo hepatizado, com pneumonia (FOTO 9).

O pulmão contralateral tinha focos de broncopneumonia (FOTO 10).

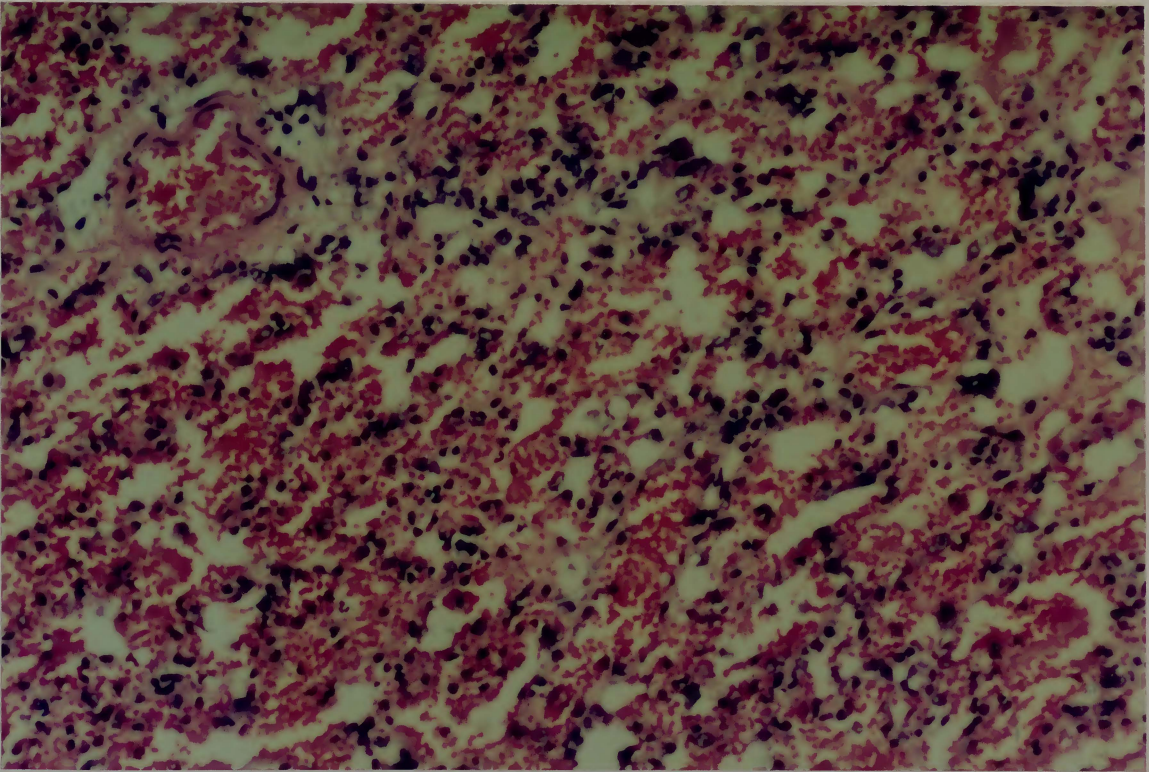


Foto 9 - Infiltrado leucocitário e
hemorragia no pulmão perfundido

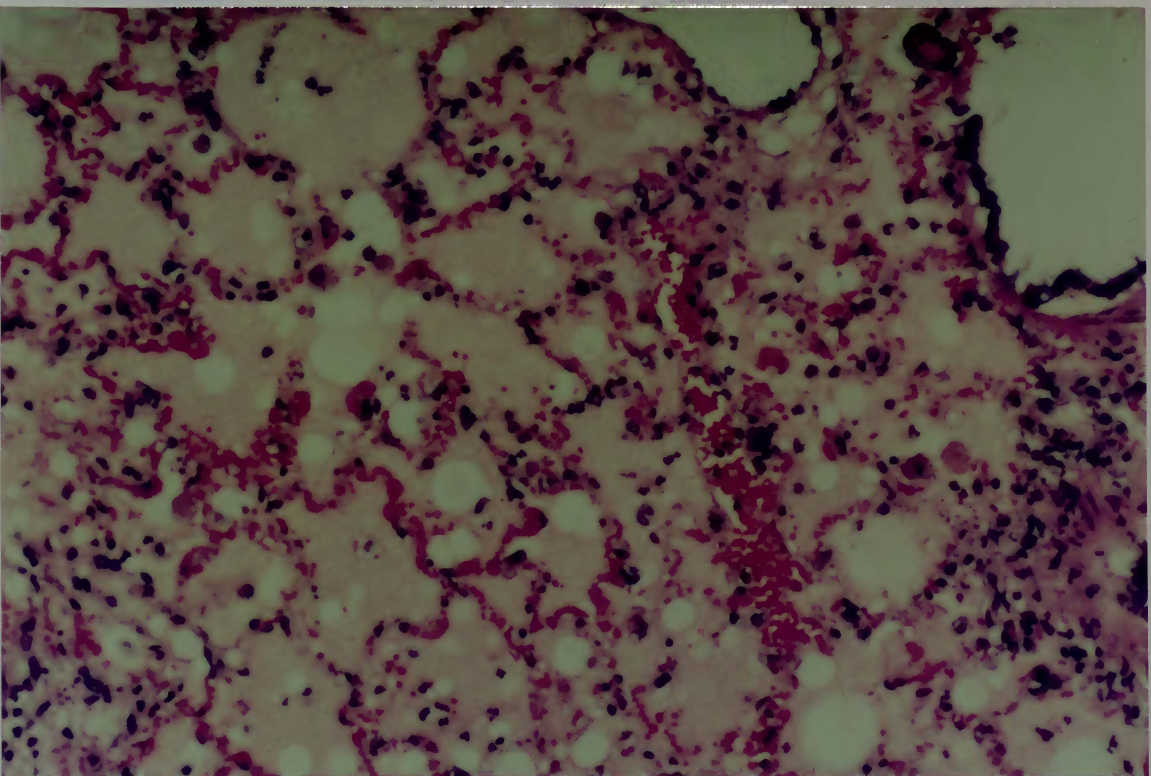


Foto 10 - Broncopneumonia
pulmão direito

O rato número 4 apresentou sangramento trans-operatório e morreu no primeiro dia pos-operatório.

A tabela 1 resume os resultados do grupo 1.

RATO	SEGUIMENTO (dias)	CAUSA DA MORTE
1	50	---
2	4	pneumonia
3	4	pneumonia
4	1	sangramento

Tabela 1 - Resultados Fase 1 (não-estéril)

Após reavaliação dos resultados deste grupo, foi estabelecido, nos ratos seguintes, o uso de material estéril, assim como a colocação de antibiótico e heparina na solução a ser perfundida

Dos 10 ratos perfundidos desta maneira apenas um morreu de pneumonia no quinto dia pós-operatório.

A tabela 2 resume os resultados destes 10 ratos.

RATO	SEGUIMENTO (dias)	CAUSA DA MORTE
5	35	---
6	32	---
7	31	---
8	5	pneumonia
9	22	---
10	18	---
11	17	---
12	15	---
13	12	---
14	11	---

Tabela 2 - Resultados Fase 1 (estéril)

O índice de mortalidade foi de 28,5% mas, se for considerado o segundo grupo separadamente, foi obtido um índice de 10%, com o uso de material totalmente estéril, adicionando antibiótico e heparina à solução a ser perfundida.

5.2.RESULTADOS - FASE 2

Inicialmente, foi programado o primeiro sacrifício dos animais em 7 dias após a injeção do tumor, com 4 ratos do primeiro grupo, 4 do segundo, 5 do terceiro e 3 do quarto.

O radiograma e a tomografia computadorizada não mostraram tumor no sexto dia pós-injeção. Em melanoma, por exemplo, na concentração de 5×10^6 , a maioria dos ratos morria de insuficiência respiratória ao final de 18 dias devido às metástases pulmonares(19). Era esperado que, em uma semana, já existisse tumor metastático nos pulmões dos ratos inoculados com sarcoma. Entretanto, não foi encontrado, neste período, nenhum tumor nos animais examinados.

As tomografias computadorizadas e os radiogramas do décimo-terceiro dia pós-injeção não demonstraram nenhum tumor. Dois ratos de cada grupo foram examinados.

Como era importante determinar a dose de tumor necessária a ser injetada e o tempo para o crescimento de 3 a 5 metástases em cada pulmão, foram sacrificados, no décimo-quarto dia pós-injeção 2 ratos de cada grupo.

Novamente não foi encontrado tumor.

Foi então estabelecido esperar mais, pois já se sabia que as metástases eram difíceis de desenvolver neste tipo de tumor e, além disso, os ratos eram mais velhos que os ratos

usados por Kjonnilksen (19) que produziu metástases pulmonares de melanoma.

Na série descrita foi observado que em ratos mais jovens a metastatização é mais precoce.

No trigésimo-primeiro dia após injeção, foi realizada tomografia computadorizada em dois ratos de cada grupo. Foram detectados tumores nos ratos dos grupos 2,3 e 4.

No trigésimo-segundo dia foram sacrificados todos os animais restantes e foi achado tumor metastático em 1 rato do grupo 100.000, nos 2 ratos no grupo 1.000.000 e em 1 rato do grupo 10.000.000.

Chamou a atenção a diferença no tipo de metástases encontradas. No grupo 2, elas eram pequenas e periféricas. No grupo 3 eram maiores e no grupo 4 ocupavam de todo o pulmão esquerdo.

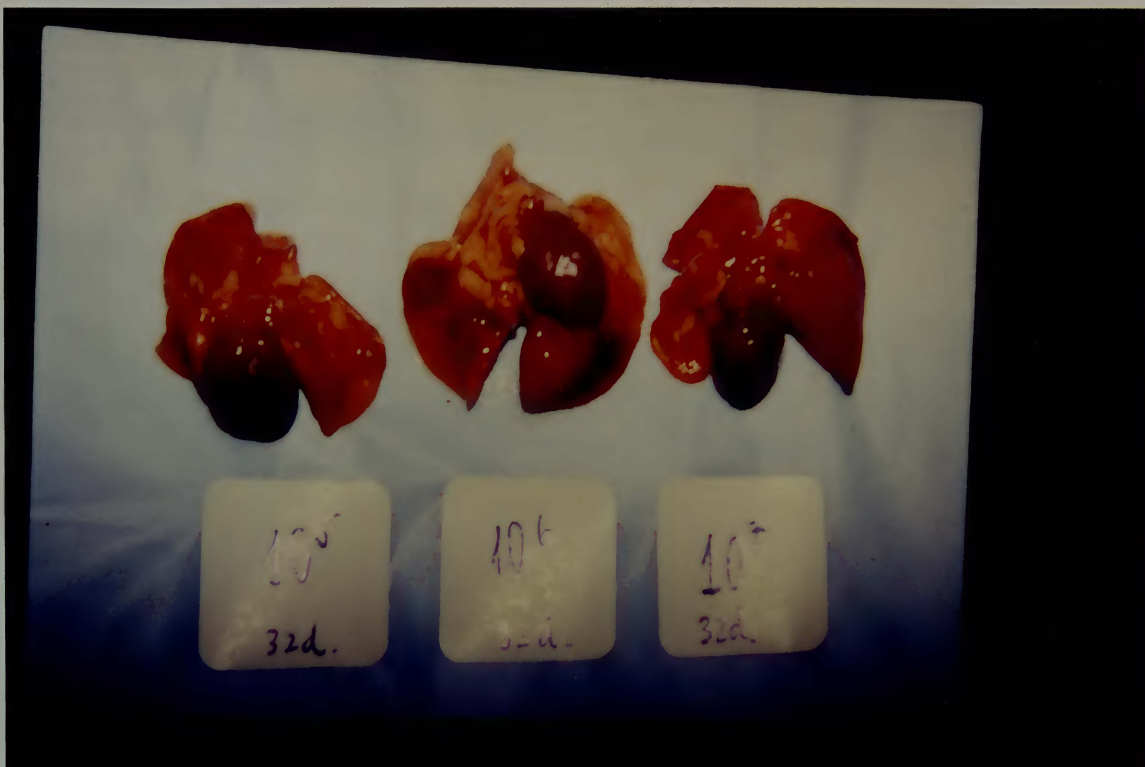


Foto 11 - Metástases

A tabela 4 mostra os resultados da fase de produção de metástases.

TABELA 4 - RESULTADOS - FASE 2

GRUPO	CONCENTRAÇÃO TUMOR			
	10.000 1	100.000 2	1.000.000 3	10.000.000 4
DIA 0	n=9	n=9	n=9	n=9
Complicações	1	1	--	2
n final	8	8	9	7
DIA 6(n=2) RX + CT	Tumor -	Tumor -	Tumor -	Tumor -
DIA 7 1º sacrifício	n=4 Tumor -	n=4 Tumor -	n=5 Tumor -	n=3 Tumor -
DIA 13(n=2) RX + CT	Tumor -	Tumor -	Tumor -	Tumor -
DIA 14 2º sacrifício	n=2 Tumor -	n=2 Tumor -	n=2 Tumor -	n=2 Tumor -
DIA 31 CT(n=2)	Tumor -	Tumor +	Tumor +	Tumor +
DIA 32 3º sacrifício	n=2 Tumor -	n=2 Tumor em 1	n=2 Tumor em 2	n=2 Tumor em 1

(n= número de ratos)

Por ocasião da necropsia, havia tumor metastático apenas nos pulmões. Não houve nenhum falso-positivo ou falso-negativo com a tomografia computadorizada, apesar de metástases de 1 a 2 milímetros de extensão.

A FOTO 12 mostra um radiograma de tórax obtido em um rato, demonstrando que, principalmente no pulmão esquerdo, há dificuldade de identificar pequenas metástases.

As FOTOS 13 e 14 mostram tomografias nos ratos com metástases.



Foto 12 - radiograma de tórax em rato

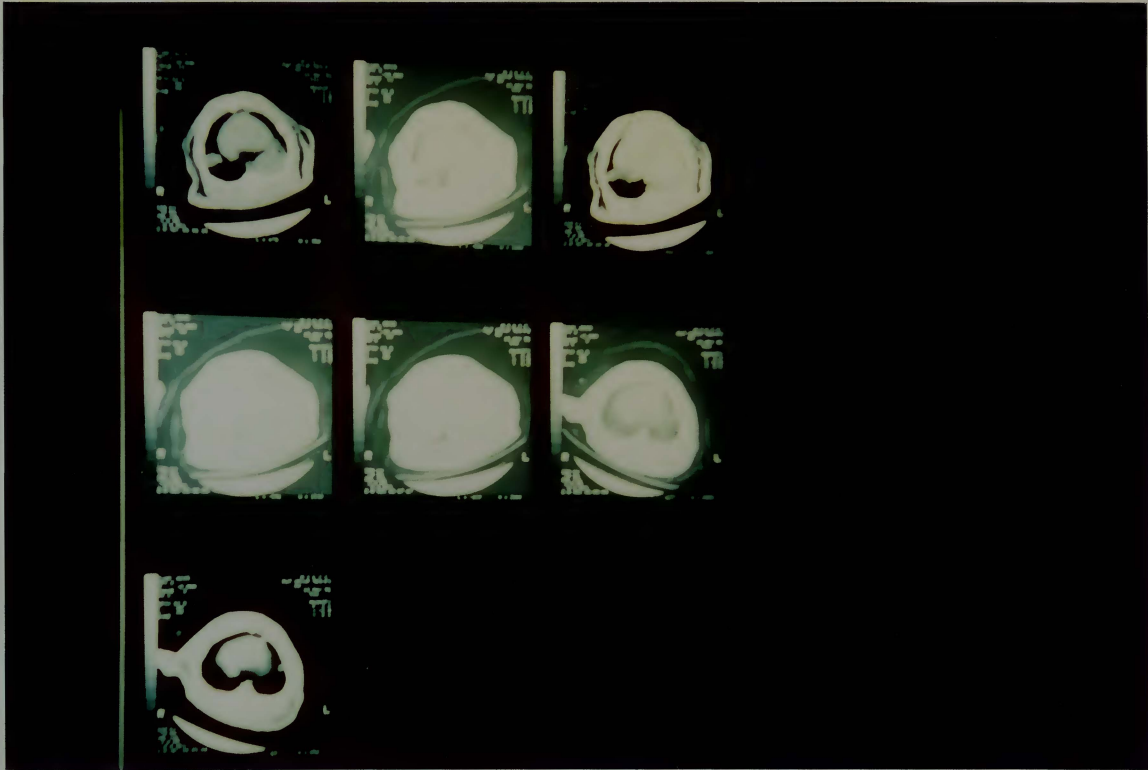
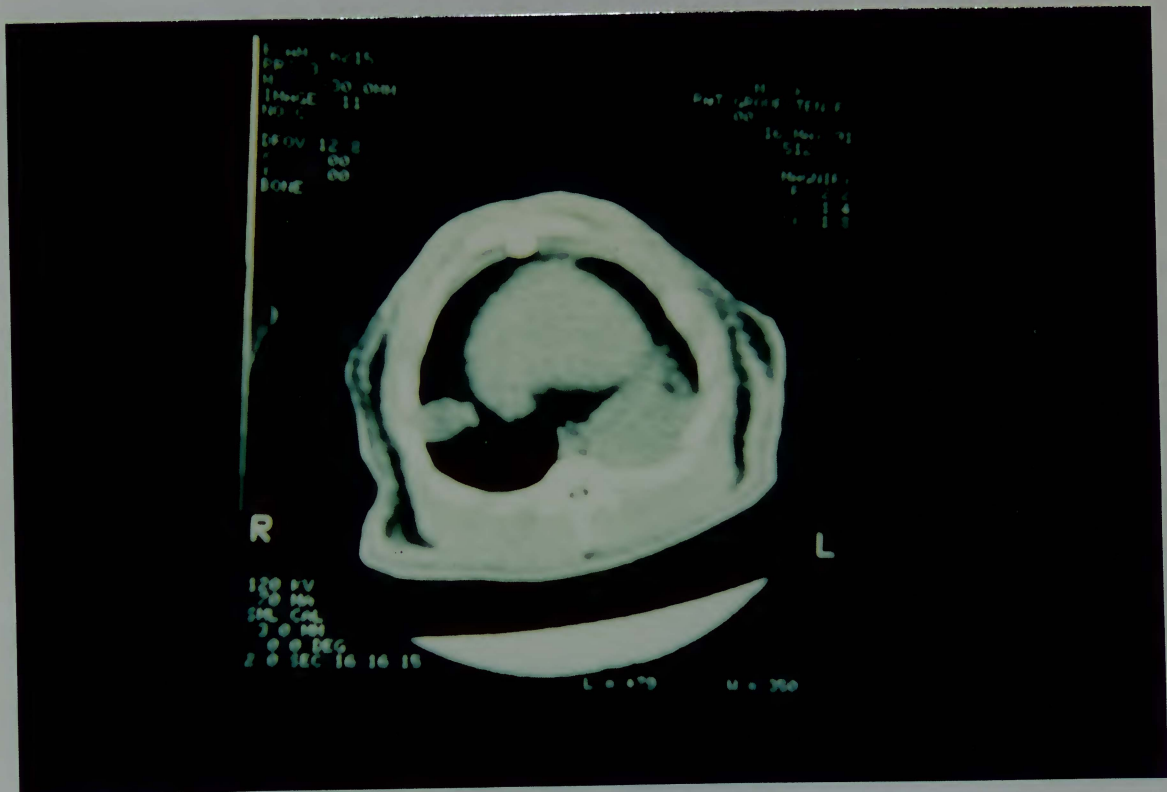


Foto 13 e 14- tomografias computadorizadas nos ratos com tumor



6. DISCUSSÃO

Desde Pierpont (7), vários autores descreveram diferentes modelos de perfusão pulmonar (9,10,20,21).

Os ratos poderiam ser um excelente modelo desde que o índice de mortalidade fosse aceitável.

Arbitrariamente, foi fixado o índice de 30%, pois em transplante pulmonar em ratos, que é um procedimento mais agressivo, é descrito, em média, índice de mortalidade em 30 dias de 40% (15,16,17,18).

Outro atrativo para tentar desenvolver o modelo de perfusão em ratos era que esses pequenos animais são usados como cobaias para experimento com sarcoma há, pelo menos, 3 décadas (11,12,13).

Os cães poderiam ser bons modelos, mas são muito mais caros na sua manutenção em laboratório de experimentação do que os ratos.

No início da fase 1, de desenvolvimento do modelo de perfusão pulmonar única, ocorreram várias dificuldades.

A intubação oro-traqueal, descrita por alguns autores (18), pareceu menos segura que a traqueostomia. No começo ocorreram alguns problemas na ventilação, que eram exacerbados quando a circulação pulmonar era interrompida.

Além disso, houve uma laceração de traquéia.

Não ocorreu nenhum problema com a traqueostomia e como o seguimento dos ratos seria a curto prazo, não se esperou

que a estenose descrita após traqueostomia pudesse constituir-se em um problema importante.

Além da ventilação adequada obtida com a traqueostomia, pode-se aspirar a via-aérea antes da extubação, o que, provavelmente, reduz as complicações pós-operatórias.

Foi usada uma simples incisão entre 2 anéis da traquéia, sem ressecção de nenhum anel. E, por fim, foi suturada a incisão com prolene 7-0. Este fio, inerte, foi utilizado para diminuir a possibilidade de formação de granuloma.

A velocidade de infusão da solução pela artéria pulmonar constituiu-se numa dificuldade relevante.

O débito cardíaco dos ratos é, aproximadamente, 209 ml/min/Kg (22). Foi dividido esse valor por 2 e usado este índice para perfusão, mas houve um severo edema no pulmão perfundido. A foto 15 mostra o intenso edema neste pulmão.



FOTO 15 - Pulmão perfundido com
importante edema

Pelo método das tentativas, foi descoberto que 50 ml/hora não produziam edema e foi usado este fluxo para o nosso modelo. Durante o tempo da perfusão (15 min), podem ser infundidos cerca de 12,5 mililitros.

Nesta velocidade, foi possível medir, pelo cateter venoso, o fluido perfundido, que nos primeiros minutos era sangue e, logo após, solução perfundida (foto 7).

Com receio de estar perfundindo apenas parte do pulmão, foi realizada uma angiografia pelo cateter colocado na artéria pulmonar. O resultado, como é mostrado na FOTO 16, demonstrou perfusão em todo o pulmão esquerdo, o que era o objetivo da técnica.

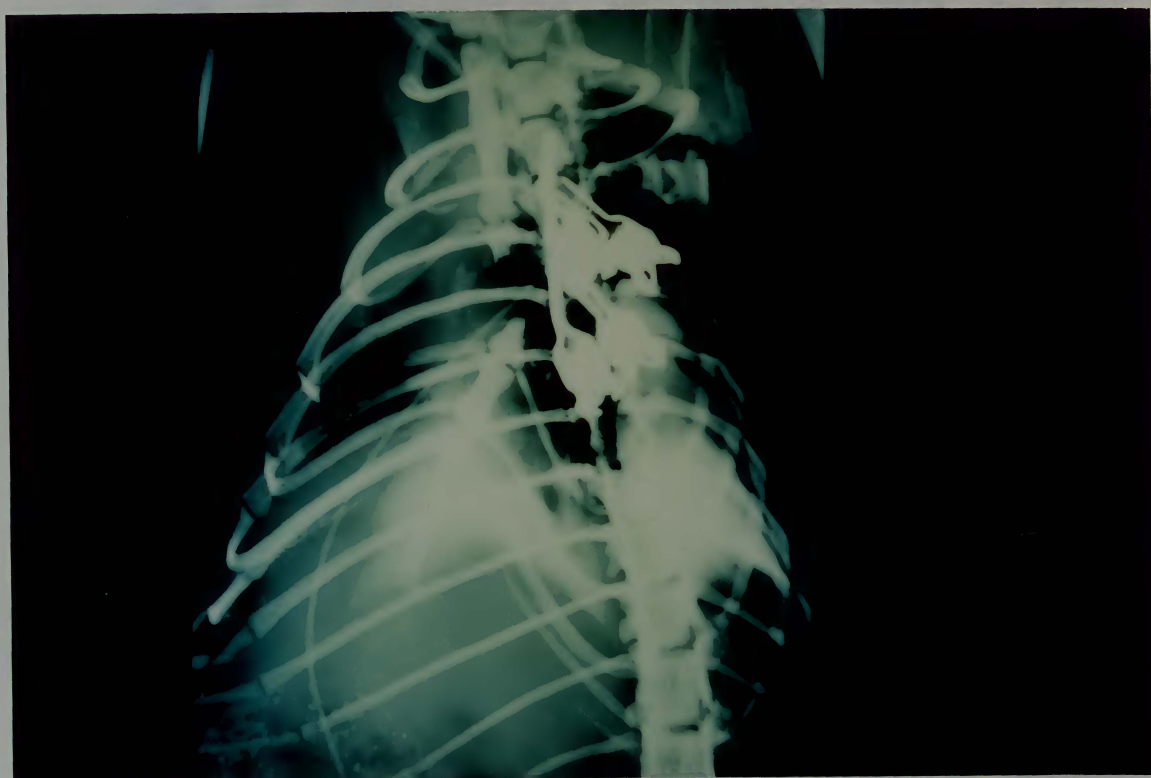


FOTO 16 - arteriografia

Na experiência, a técnica estéril, com antibiótico e heparina na solução a ser perfundida, mudou drasticamente a mortalidade dos animais.

Nos primeiros 4 ratos, ocorreu pneumonia no quarto dia pós-operatório em dois animais, e o que chamava a atenção era que havia focos de broncopneumonia no pulmão não perfundido, sugerindo infecção sistêmica.

Com as modificações da técnica para a fase do procedimento totalmente estéril, com penicilina e heparina, em 10 ratos houve apenas uma morte.

Vários autores descrevem experimentos com ratos usando apenas técnica limpa, não-estéril (15,16,17,18).

Popp e Brennan (23) demonstraram, em 1981, a importância da técnica asséptica no experimento em ratos. Por canulação da veia cava superior, num estudo randomizado, comparando basicamente a técnica estéril e a não-esteril, foram capazes de obter resultados em relação a peso, balanço nitrogenado e diferença na mortalidade, estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

O outro item da experimentação, a produção de metástases pulmonares, que a primeira vista parecia ser um procedimento simples, demonstrou ser um pouco mais trabalhoso.

Kjonnixsen et al (19) foram capazes de produzir metástases de melanoma após injeção intravenosa pela veia da cauda de ratos.

No início do experimento, não era sabido quanto tempo e qual a concentração de sarcoma seriam necessários para a produção de algumas metástases pulmonares. O que se sabia era que, em média, os ratos morriam das metástases pulmonares de melanoma em 2 a 3 semanas e que o radiograma de tórax poderia identificar metástases com mais de 3mm (19).

O problema é que era desejado um tipo de modelo de metástase que não debilitasse muito o animal, pois o objetivo é desenvolver um modelo em ratos para tratar essas metástases com quimioterapia local, através de perfusão pulmonar.

Foi estabelecido um número de 3 a 5 metástases em cada pulmão.

Como em até 14 dias não foram encontradas metástases, resolveu-se esperar mais, confiando na qualidade da tomografia computadorizada, que parecia bem superior ao radiograma de tórax na identificação de pequenas metástases. Além disso, um animal, entre os 36 injetados com tumor, teve extravasamento da solução de células de sarcoma no pênis. Esse animal não foi considerado entre os prováveis portadores de metástases e foi utilizado para controle da qualidade de preparação das células tumorais.

Com respeito à técnica de injeção, a veia dorsal do pênis, no rato, pareceu uma ótima via, já que foi identificado apenas um extravasamento.

Dentre todos os ratos sacrificados, apenas um tinha tumor no pênis, além de metástases pulmonares.

O rato que sofreu inoculação subcutânea de tumor apresentou tumor aos 28 dias e então resolveu-se esperar mais alguns dias e tomografar os ratos. Foi neste período que foram identificadas as metástases.

Diferentes tipos de metástases foram encontradas.

O grupo de injeção de sarcoma na concentração de 10.000, até o trigésimo-segundo dia pós-injeção, não apresentou metástase.

O grupo 100.000 apresentou um tipo de metástase de 1,5 mm, periférica.

No grupo 1.000.000, a metástase ocupava um lobo, parecendo mais agressiva.

O pulmão esquerdo de um rato injetado por 10.000.000 de células de sarcoma era apenas tumor, parecendo ser esta preparação de sarcoma muito mais agressiva que as outras soluções.

A tomografia computadorizada foi capaz de identificar todas as metástases, com a facilidade de colocar dois animais no tomógrafo ao mesmo tempo. Este método parece mostrar excelente especificidade para identificar pequenas metástases.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante destes resultados, achou-se que o projeto de testar diferentes drogas quimioterápicas, no tratamento de metástases pulmonares de sarcoma com perfusão pulmonar única, em ratos, pode ir adiante.

A adriamicina seria a primeira droga a ser testada.

A contribuição potencial deste estudo seria no tratamento das metástases pulmonares de sarcoma em humanos, usando-se perfusão pulmonar unilateral com quimioterapia, com a vantagem de utilizar-se maior concentração da droga sem os efeitos sistêmicos já conhecidos deste tratamento.

A resposta positiva à perfusão poderia alterar a história natural desta neoplasia e prolongar a vida destes pacientes.

8. CONCLUSÖES

A análise dos resultados obtidos no presente estudo permite formular as seguintes conclusões:

1. O modelo de perfusão pulmonar única em ratos foi satisfatoriamente desenvolvido.

2. É possível o desenvolvimento de metástases pulmonares de sarcoma induzido por methylcholanthrene em ratos.

3. A tomografia computadorizada pode ser usada para o acompanhamento das metástases pulmonares.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Cancer Patients Survival. Report number 5, US Department of Health, Education and Welfare, Publication number (NIH) Z7-992, 1976, in Devita, V. Cancer: Principles & Practice of Oncology 2 nd Ed. J.B. Lippincott Company, 2344 p., 1985.

2. Marcove, R.C., Huvosag, M.V. Osteogenic Sarcoma in Childhood. NY State J Med 1971; 71: 885-889.

3. Van Donger, E., Van Slooten, E.A. The Surgical Treatment of Pulmonary Metastasis. Cancer Treat Rep 1978; 5; 29-32.

4. Martini, N. et al. Multiple Pulmonary Resection in the Treatment of Osteogenic Sarcoma. Ann Thor Surg 1971; 12: 271-280.

5. Roth, J. Treatment of Metastatic Cancer Lung. In Cancer: Principles & Practice of Oncology 2 nd Ed. J. B. Lippincott Company. 2104-2116, 1985.

6. Beattie, E.J. Surgical Treatment of Pulmonary Metastases. Cancer 1984; 54: 2729-2731.

7. Pierpont, H., Blades, B. Lung Perfusion with Chemotherapeutic Agents. J Cardiovasc Thorac Surgery 1960; 39: 159-165.

8. Milne, E., Noonan, C.D., Margulis, A., Stoughton, J. Vascular Supply of Pulmonary Metastases Experimental Study in Rats. Invest Radiol 1969; 4; 215-229.

9. Minchin, R.F., Boyd, M.R. The Uptake and Metabolism of Dexorubicin in Isolated Perfused Rat Lung. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 2829-2831.
10. Minchin, H., Johnston, M.A.A., Boyd, M.R. Pharmacokinetics of Dexorubicin in Isolated Lung of Dogs and Humans Perfused in Vivo. *The Journal of Pharmacol and Experim Therapeutics* 1984; 229: 193-198.
11. Noguchi, Y., Vydellingun, N.A., Brennan, M.F. The Reversal of Increased Gluconeogenesis in the Tumor-bearing Rat by Tumor Remonal and Food Intake. *Surgery* 1989; 106: 423-431.
12. Popp, M.B., Morrison, S.D., Brennan, M.F. Total Parenteral Nutrition in a Methylcholanthrene Induced Rat Sarcoma Model. *Cancer Treat Rep* 1981; 65(Suppl 5) : 137-147.
13. Warren, R.S., Jeevanandam, M., Brennan, M.F. Protein Synthesis in the Tumor-influenced Hepatocyte. *Surgery* 1985; 98: 275-282.
14. Proctor, D., Auclair, B.G., Rudenstam, C.M. The Distribution and Fate of Blood-Borne ¹²⁵IUdR-Labelled Tumor Cell in Imune Syngeneic Rats. *J Cancer* 1976; 18: 255-262.
15. Marck, K.W., Prop, J., Wildevuur, C.R.H. Lung Transplantation in the Rat. *Journal of Surgical Research* 1983; 35: 149-158.
16. Mizuta, T., Kawaguchi, A., Nakahara, K., Kawashima, Y. Simplified Rat Lung Transplantation Using a Cuff Technique. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989; 97: 578-581.

17. Marck, K.W., Wildevuur, C.R.H. Lung Transplantation in the Rat: I. Technique and Survival. *Ann Thorac Surg* 1981; 34: 74-81.

18. Marck, K.W., Piers, M.D., Wildevuur, C.R.H. Lung Transplantation in the Rat: II. Lung Perfusion Scintigraphy in Normal and Left Lung Transplanted Rats. *Ann Thorac Surg* 1982; 34: 81-87.

19. Kjonniksen, I., Storeng, R., Pihl, A., McLemore, T.L., Fodstad, O. A Human Tumor Lung Metastasis Model in Athymic Nude Rats. *Cancer Research* 1989; 49: 5148-5152.

20. Johnston, M.R., Minchin, R., Shull, J.H. et al. Isolated Lung Perfusion with Adriamycin. *Cancer* 1983; 52: 404-409.

21. Minchin, R.F., Maddsen, B.W., Ilett, F. Effects of Desmethylinipramine on the Kinetics of Chlorphentermine Accumulation in Isolated Perfused Rat Lung. *J Pharm Exp Ther* 1979; 211: 514-516.

22. Duchattelle, J.P., Vivet, P., Cortes, M., Groussard, O., Pocard, J.J. Respiratory and Haemodynamic Effects of Lateral Thoracotomy or Sternotomy in Mechanically Ventilated Rats. *Eur Surg Res* 1985; 17: 10-16.

23. Popp, M., Brennan, M.F. Long-Term Vascular Access in the Rat: Importance of Asepsis. *Heart Circ Physiol* 1981; 10: H606-H612.

10. ABSTRACT

Aproximately 4500 new cases of sarcoma are reported in USA each year. Seventy five percent will develop lung metastases and at majority which the only site.

The best results of surgical treatment do not excced 32% of the cases.

The use of adjuvant chemotherapy has reduced but not eliminated the incidence of pulmonary metastases.

The perfusion of one organ with more drug and without systemic effects of chemotherapy can change the natural history of this disease.

We present the result of the first phase which is to set up successfully the model of perfusion and of the second phase, which is to develop the pulmonary sarcoma metastases.

We were able to perfuse the left lung of 14 rats and to follow them up, at least for 10 days.

The overall mortality rate was 28,5%.With improvement of the technique, we had 10% of mortality.

In the second phase, we were able to produce sarcoma metastases in 32 days, following intravenous injection of sarcoma cells suspension.

Therefore, the first phase, to implement the single lung perfusion model in the rat, has been accomplished successfully.

The second phase showed us that the pulmonary sarcoma metastases model is confirmed. The CT scan can be used

instead of sacrificing the animals to follow up the metastases.