

**Carlos Alberto Carneiro Rangel de Castro**

**Estudo das Propriedades Mecânicas e  
Análise Histológica do Sistema  
Respiratório de Ratos Tratados com  
Docetaxel**

Brasília, 2012

Universidade de Brasília - UnB  
Faculdade de Medicina - FM  
Pós-Graduação em Ciências Médicas

# Estudo das Propriedades Mecânicas e Análise Histológica do Sistema Respiratório de Ratos Tratados com Docetaxel

Tese Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Médicas da Universidade de Brasília - UnB  
como Parte dos Requisitos Exigidos Para Obtenção do  
Título de Doutor em Ciências Médicas.

Doutorando: Carlos Alberto Carneiro Rangel de Castro

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Assis Viegas

Banca Examinadora:

Prof. Dr. João Batista de Sousa (Presidente)

Prof. Dr. Aloisio Fernando Soares

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ventura Gaio dos Santos

Prof. Dr. Rivadávio Fernandes Batista de Amorim

Prof. Dr. Sandro José Martins

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Veronica Moreira Amado

Brasília, 2012



## Dedicatória

À minha família,  
esposa e filhos,  
por serem as fundações e única certeza em minha  
vida.

Aos meus pais,  
pela educação e exemplo recebidos.

---

## Agradecimentos

Meu eterno agradecimento pela ajuda e apoio recebidos . . .

- Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Assis Viegas, meu orientador, pela confiança depositada;
- Ao amigo e co-orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Ventura Gaio dos Santos, sempre referência como exemplo de vida, de temperança e de comportamento ético e profissional;
- Aos técnicos do Laboratório de Fisiologia Respiratória, Srs. José Tavares dos Santos e João Ronaldo de Andrade Rocha (*post mortem*), pelo cuidado com os animais;
- Ao aluno de pós-graduação Rodrigo Storck, pela disposição incansável;
- Ao Dr. Teodoro Ostrowski, pela fundamental ajuda na patologia;
- Ao Dr. Gustavo Henrique Soares Takano, pela orientação na análise das lâminas;
- Aos técnicos do Laboratório Micra - DF, pela confecção das lâminas estudadas;
- Ao aluno de medicina Guilherme Costa, pela ajuda e dedicação;
- À amiga Dra. Gabrielle Scattolin, pelo trabalho e apoio diários;
- À todos meus amigos, afinal, o que seria de nossas vidas sem ter com quem dividir?

"... poucos são os que enxergam  
com os próprios olhos  
e sentem com o próprio  
coração."

Albert Einstein

# Sumário

<b>Dedicatória</b>	<b>ii</b>
<b>Agradecimentos</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>x</b>
<b>Resumo</b>	<b>xii</b>
<b>Abstract</b>	<b>xiii</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 História e Importância dos Taxanes . . . . .	1
1.2 Mecanismos de lesão pulmonar aguda induzida por drogas . . . . .	5
<b>2 Objetivos</b>	<b>8</b>
<b>3 Material e Métodos</b>	<b>9</b>
3.1 Estudo Piloto . . . . .	9
3.2 Protocolo Experimental . . . . .	10
3.3 Método de avaliação das propriedades mecânicas do sistema respiratório . .	12
3.3.1 Processamento de sinais e coleta de dados . . . . .	14
3.4 Método para análise histológica por morfometria . . . . .	15
3.4.1 Descrição das medidas utilizadas para análise histológica por morfo- metria . . . . .	16
3.5 Análise estatística . . . . .	20
<b>4 Resultados</b>	<b>21</b>
4.1 Análise descritiva da amostra . . . . .	21
4.2 Relação PL/PS . . . . .	22
4.3 Análise das propriedades mecânicas . . . . .	23

---

4.4	Análise Morfométrica do parênquima pulmonar . . . . .	27
4.4.1	Avaliação da proporção de fibras colágenas do parênquima pulmonar	27
4.4.2	Avaliação da proporção de fibras colágenas na vasculatura pulmonar .	29
4.4.3	Razão superfície-volume (RSV) . . . . .	30
4.4.4	Avaliação da proporção de fibras elásticas no parênquima pulmonar .	31
4.4.5	Avaliação da proporção de fibras elásticas na vasculatura pulmonar . .	32
4.4.6	Avaliação de celularidade . . . . .	33
4.4.7	Edema Alveolar . . . . .	35
4.4.8	Índice de edema peri-vascular (IEPV) . . . . .	36
4.4.9	Diâmetro Alveolar Médio ( $L_M$ ) . . . . .	37
4.4.10	Diâmetro interno das vias aéreas (DI) . . . . .	38
4.5	Resumo dos achados histológicos . . . . .	40
<b>5</b>	<b>Discussão</b>	<b>42</b>
5.1	Considerações gerais . . . . .	42
5.2	Relação PL/PS . . . . .	43
5.3	Correlação entre as propriedades mecânicas do sistema respiratório e os achados histológicos . . . . .	44
5.4	Hipótese para o mecanismo da lesão pulmonar . . . . .	50
5.5	Críticas ao estudo . . . . .	50
<b>6</b>	<b>Conclusão</b>	<b>54</b>
	<b>Referências</b>	<b>55</b>



## Lista de Tabelas

1	Valores da medida do retículo. . . . .	16
2	Valores médios do peso (g) no D1 e D28 . . . . .	21
3	Comparação das propriedades mecânicas do sistema respiratório de ratos submetidos à aplicação, por via intra-peritoneal, de docetaxel, em diferentes doses . . . . .	23
4	Resumo das principais alterações histológicas encontradas em pulmões de ratos <i>Wistar</i> submetidos a injeção única de docetaxel por via intra-peritoneal.	41

## Lista de Figuras

1	<i>Foto do microtúbulo (Leica systems TCS)*. . . . .</i>	3
2	<i>Molécula do Docetaxel . . . . .</i>	3
3	<i>Traçado Obtido pelo Método da Pausa Inspiratória. . . . .</i>	13
4	<i>Retículo de 50 linhas e 100 pontos . . . . .</i>	15
5	<i>Relação de peso dos animais no começo e final do estudo nos próprios grupos (a) e comparação entre grupos do percentual de ganho ponderal (b) observado ao final do estudo. O GC ganhou peso de forma significativamente maior que o G210 (b). . . . .</i>	22
6	<i>Relação entre peso Líquido (PL) e Peso seco (PS) do pulmão E (PL/PS) . . . . .</i>	22
7	<i>Análise da resistência do sistema respiratório (a), da caixa torácica (b) e do pulmão (c) nos animais submetidos à aplicação de docetaxel . . . . .</i>	24
8	<i>Análise da elastância estática do sistema respiratório (a), caixa torácica (b) e pulmão (c) nos animais submetidos à aplicação de docetaxel . . . . .</i>	25
9	<i>Análise da elastância dinâmica do sistema respiratório (a), caixa torácica (b) e pulmão (c) nos animais submetidos à aplicação de docetaxel . . . . .</i>	26
10	<i>Comparação entre a proporção de fibras colágenas no parênquima pulmonar de animais submetidos à aplicação única de docetaxel. . . . .</i>	28
11	<i>Foto de pulmão sob luz polarizada para análise de fibras colágenas (coloração PCS, 100x). . . . .</i>	28
12	<i>Comparação entre a proporção de fibras colágenas na vasculatura pulmonar de animais submetidos à aplicação única de docetaxel. . . . .</i>	29
13	<i>Comparação da variável RSV de animais submetidos à aplicação única de docetaxel*. . . . .</i>	30
14	<i>Lâmina de pulmão comparando RSV no GC e no G210 (coloração HE, 40x). . . . .</i>	30
15	<i>Proporção de fibras elásticas no parênquima pulmonar de animais submetidos à aplicação única de docetaxel. . . . .</i>	31
16	<i>Comparação entre a proporção de fibras colágenas na vasculatura pulmonar de animais submetidos à aplicação única de docetaxel. . . . .</i>	32
17	<i>Comparação entre a proporção de infiltração pulmonar por células mononucleares em animais submetidos à aplicação única de docetaxel. . . . .</i>	34

---

18	<i>Lâmina de pulmão comparando infiltrado intersticial no GC e no G210 (coloração HE, 40x).</i> . . . . .	34
19	<i>Comparação entre a proporção de alvéolos com edema intra-alveolar de animais submetidos à aplicação única de docetaxel.</i> . . . . .	35
20	<i>Lâmina de pulmão comparando edema intra-alveolar no GC e no G210 (coloração HE, 40x).</i> . . . . .	36
21	<i>Comparação do índice de edema peri-vascular, de animais submetidos à aplicação única de docetaxel*.</i> . . . . .	36
22	<i>Comparação do diâmetro alveolar médio, em <math>\mu\text{m}</math>, de animais submetidos à aplicação única de docetaxel*.</i> . . . . .	37
23	<i>Análise comparativa do diâmetro interno de vias aéreas (em <math>\mu\text{m}</math>), de animais submetidos à aplicação única de docetaxel*.</i> . . . . .	38
24	<i>Aspecto das diversas colorações realizadas no pulmão de ratos expostos ao docetaxel no microscópio óptico</i> . . . . .	39

## Lista de Abreviaturas

ANOVA – análise de variância

CEUA - Comitê de Ética no Uso Animal

CRF – Capacidade residual funcional

cw - caixa torácica

DL<sub>50</sub> - Dose letal em 50% da amostra

DI - Diâmetro interno das vias aéreas ( $\mu\text{m}$ )

DP - Desvio padrão

E<sub>st, cw</sub> (cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup>.s) – Elastância estática da caixa torácica

E<sub>st, l</sub> (cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup>.s) – Elastância estática pulmonar

E<sub>st, sr</sub> (cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup>.s) – Elastância estática do sistema respiratório

E<sub>dyn, cw</sub> (cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup>.s) – Elastância dinâmica da caixa torácica

E<sub>dyn, l</sub> (cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup>.s) – Elastância dinâmica pulmonar

E<sub>dyn, sr</sub> (cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup>.s) – Elastância dinâmica do sistema respiratório

e.v. - endovenoso

FR - Frequência respiratória

HE – Hematoxilina-eosina

i.p. - intra-peritoneal

KCl – Cloreto de potássio

KD - quilodaltons

L - pulmão

L/S – Relação peso líquido/seco

L<sub>M</sub> - Diâmetro alveolar médio ( $\mu\text{m}$ )

mg - Miligrama

mm - milímetros

MN - Mononucleares

MO - Microscópio óptico

nm - nanômetros

NS - Não significante ou  $p > 0,05$

PCS - Coloração picrossírius

PEEP (cmH<sub>2</sub>O) – Pressão positiva ao final da expiração

$P_i$  - Ponto de inflexão

PL - Peso líquido

PMN - Polimorfonucleares

PP - Parênquima pulmonar

PS - Peso seco

$R_{cw}$  (cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup>.s) – Resistência da caixa torácica

$R_l$  (cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup>.s) – Resistência pulmonar

$R_{sr}$  (cmH<sub>2</sub>O.mL<sup>-1</sup>.s) – Resistência do sistema respiratório

RF - Resorcina fucsina de Weigert

RSV - Razão superfície-volume (%)

SC - Superfície corporal

sr - sistema respiratório

UnB – Universidade de Brasília

VM (mL.min<sup>-1</sup>) – Volume minuto

VP - Vasculatura pulmonar

V (mL) – Volume corrente

$\dot{V}_i$  (mL.s<sup>-1</sup>) – Fluxo aéreo inspiratório

$\mu\text{m}$  - micrômetros

% - Relação percentual

## Resumo

**Introdução:** Os taxanos são quimioterápicos inibidores da tubulina e amplamente utilizados no tratamento de tumores malignos. Apesar de seu uso disseminado, pouco se conhece sobre sua farmacodinâmica e sobre as possíveis alterações crônicas que possam causar. A pneumonia induzida pelo docetaxel é entidade conhecida e pouco estudada, com incidência estimada em 10% nos pacientes em uso de docetaxel, sendo fatal em até 40% dos casos. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações pulmonares induzidas pelo uso do docetaxel.

**Material e Métodos:** Utilizamos 42 ratos *Wistar*, com peso entre 280 e 310g, divididos em 3 grupos de estudo e um grupo controle (GC), sendo realizada aplicação intra-peritoneal única de docetaxel em doses de 70 mg/m<sup>2</sup> (G70 - 10 animais), 140 mg/m<sup>2</sup> (G140 - 10 animais) e 210 mg/m<sup>2</sup> (G210 - 12 animais). Quatro semanas após a aplicação do docetaxel, as propriedades mecânicas do sistema respiratório (elastância estática, dinâmica e resistência) foram medidas e foi realizada análise histológica por morfometria com microscopia óptica dos pulmões dos animais. Foram analisadas as alterações no colágeno, fibras elásticas, infiltração celular e índices morfométricos no parênquima pulmonar e artérias pulmonares. **Resultados:** Foram estudados 40 animais. Observamos alterações histológicas em 90% dos animais do G70 e em 100% dos animais dos G140 e G210, caracterizadas por aumento na quantidade de fibras colágenas, infiltração mononuclear nos septos alveolares e edema nos espaços alveolares. As lesões foram significativas ( $p < 0.05$ ) e proporcionais à dose de docetaxel administrada. Ainda, foram observadas alterações na mecânica do sistema respiratório compatíveis com provável lesão da musculatura inter-costal. **Conclusões:** O docetaxel produziu pneumonia intersticial e aumento do colágeno nos septos alveolares de ratos *Wistar*, após aplicação única por via i.p. Este é o primeiro estudo experimental que foi capaz de demonstrar a lesão pulmonar por docetaxel e estabelecer uma relação de proporcionalidade entre grau lesão pulmonar e a dose de docetaxel utilizada.

## Abstract

**Introduction:** Taxanes are tubulin-inhibitor-chemotherapy agents, widely prescribed in clinical practice and used for the treatment of malignant tumors. Despite broadly used, little is known about their long-term side effects and pharmacodynamics. Taxotere-induced pneumonitis is a new well-recognized entity, with estimated incidence in taxotere-chemotherapy users of 10%, being fatal in almost 40% of cases. Our goal was to evaluate, in a controlled model, lung tissue alterations due to docetaxel exposure. **Materials and Methods:** Forty-two *Wistar* rats were divided in four groups, according to the docetaxel administered dose: 1) GC (10 rats) - control, 2) G70 (10 rats) - 70 mg/m<sup>2</sup>, 3) G140 - (12 rats) - 140 mg/m<sup>2</sup> and 4) G210 - (10 rats) - 210 mg/m<sup>2</sup>. Docetaxel was given as a single i.p. shot. After 28 days, the mechanical properties of the respiratory system (dynamic and static elastance, and resistance) were obtained, and morphometric and histological analysis were performed using optic microscopy and the point-counting technique. **Results:** A total of 40 animals were studied. Lung tissue alterations were observed in 90% of G7- and in 100% of G140 and G210. Main histological findings were collagen fiber deposition in the alveolar septa, alveolar edema and mononuclear cell interstitial (septal) infiltration. All changes had significance ( $p < 0.05$ ). A proportionality between docetaxel dose administration and the amount of lung tissue damage could be established. Also, alterations in animal's chest wall properties were noted. **Conclusions:** Docetaxel was capable to produce interstitial pneumonitis and alveolar septal collagen deposition in *Wistar* rats after a single i.p. dose. The amount of lung-tissue injury was proportional to the docetaxel administered dose. This is the first experimental study to establish those findings.

# 1 Introdução

## 1.1 História e Importância dos Taxanos

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer – Ministério da Saúde, estima-se que no Brasil serão diagnosticados mais de 660.000 novos casos de câncer no ano de 2012, valendo essas previsões para 2013.<sup>1</sup> Assim, esta doença vem ganhando enorme espaço como problema de saúde pública. No mundo, conforme estimativas da OMS até 2030, esperam-se 27 milhões de novos casos diagnosticados e 17 milhões de mortes por esta doença.<sup>1,2</sup> Consequentemente, o câncer representa causa de preocupação em saúde pública e na economia da maioria dos países.

Dentre os tumores mais comuns, destacam-se os cânceres do pulmão, próstata, trato digestivo e mama. Embora uma boa parte destes pacientes possa ser tratada unicamente com cirurgia, outros receberão o diagnóstico em fase avançada, aumentando muito os custos e complicações do tratamento. Para estes pacientes, utiliza-se a quimioterapia como forma básica de controle da doença.

Uma importante classe de quimioterápicos, os **taxanos**, merecem destaque. Funcionam como agentes anti-microtúbulos, ligando-se à tubulina e impedindo o crescimento e ruptura microtubular necessários à divisão celular. O *paclitaxel* foi a primeira droga da família, descoberto no ano de 1967.<sup>3</sup> É derivado da casca das plantas *taxus brevifolia* e *taxus baccata*, possuindo ação antineoplásica reconhecida.<sup>4</sup> O problema inicial era a quantidade de matéria bruta necessária (cerca de 10 toneladas da árvore para a extração de 1 kg do paclitaxel). Ainda mais entendendo que a árvore demora cerca de 300 anos para atingir sua maturidade, estes empecilhos resultariam na inviabilidade comercial da droga.

O *docetaxel*, um derivado semi-sintético do paclitaxel, foi desenvolvido no início da



década de 80 e é objeto do presente estudo. Foi aprovado para uso humano em 1997, sendo utilizado, na prática médica, em doses de 60 a 100 mg/m<sup>2</sup>.<sup>5</sup> Trata-se de uma droga com algumas características próprias. Em especial, possui baixa solubilidade em água, motivo da necessidade de sua diluição em solução alcoólica e de sua apresentação ser para uso endovenoso (e.v.), não podendo ser administrada por via oral. Sua farmacocinética foi estudada em animais, possuindo distribuição tecidual adequada quando aplicado por via intra-peritoneal (i.p.), embora com concentração plasmática pouco menor que por via e.v.<sup>6,7</sup>

A primeira descrição do mecanismo de ação dos taxanos foi feita em 1979.<sup>4</sup> Os microtúbulos são constituídos por proteínas heterodiméricas compostas de duas subunidades:  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina, de aproximadamente 440 aminoácidos cada uma, com peso molecular de aproximadamente 50 kD. A tubulina está presente em todas as células eucariotas, existindo sob a forma heterodimérica  $\alpha\beta$  ou microtubular. As duas subunidades são organizadas entre si por ligação de hidrogênio pela região  $-\text{CO}_2\text{H}$  terminal da subunidade  $\beta$  e da região terminal  $-\text{NH}_2$  da subunidade  $\alpha$ , sendo a formação dos microtúbulos realizada pelo rearranjo regular em estruturas flexíveis, obtidas em duas etapas - iniciação e alongação. Seu aspecto microscópico assemelha-se a uma rede intracelular (figura 1).

Os microtúbulos são absolutamente essenciais ao processo de divisão celular, sendo usados pelas células para formar uma estrutura de suporte chamada de citoesqueleto<sup>4</sup> (o citoesqueleto é formado por 3 estruturas: microtúbulos, filamentos intermediários e microfilamentos. Os microtúbulos funcionam como estrutura de ancoragem para as demais). Estruturalmente, os microtúbulos são rearranjados em forma cilíndrica, contendo 13 protofilamentos e apresentando um diâmetro de 24 nm. A iniciação e alongação dos protofilamentos ocorre em presença de proteínas associadas aos microtúbulos (PAM), magnésio e trifosfato

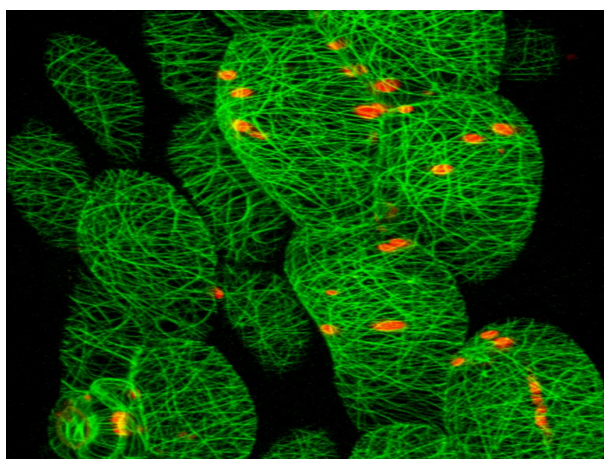


Figura 1: Foto do microtúbulo (Leica systems TCS)\*.

\*Cortesia da Universidade de Indiana - EUA

de guanosina (GTP). Em presença dos taxanos ocorre estabilização das  $\alpha$  e  $\beta$  tubulinas impedindo o rearranjo e a divisão celular. Tanto o paclitaxel como o docetaxel possuem o mesmo mecanismo de ação, ou seja, ambos promovem ligação estável com a tubulina e inibem a despolimerização dos microtúbulos.<sup>8</sup> Seu mecanismo de ação independe da presença de quaisquer cofatores.

A molécula de docetaxel pode ser visualizada na figura 2.

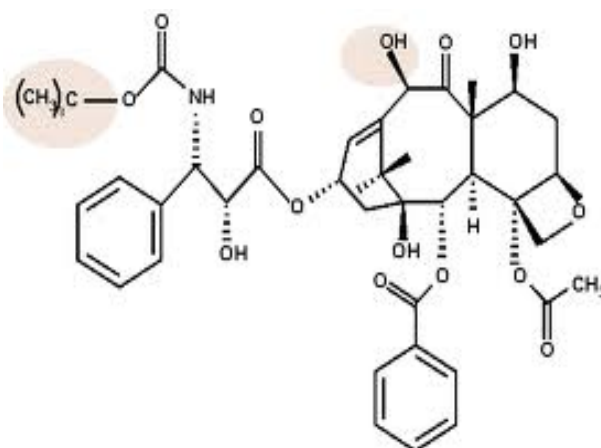


Figura 2: Molécula do Docetaxel

As partes marcadas representam os locais de substituição de radicais na molécula de paclitaxel

Os taxanos rapidamente mostraram-se eficazes no tratamento do câncer e perma-

necem como escolha na abordagem do câncer de pulmão, para esquemas quimioterápicos de resgate e para tratamento de doença metastática ou localmente avançada.<sup>9</sup> Ainda, estão sendo amplamente utilizados como primeira escolha em diversos outros tipos de tumores malignos como mama, próstata, esôfago, estômago e em tumores de cabeça e pescoço.<sup>10,11</sup> Para o câncer de próstata, por exemplo, representam a única classe de quimioterápicos com reconhecida atividade e impacto na sobrevida global dos pacientes.<sup>12,13,14</sup>

Em geral, o docetaxel possui boa tolerância. Entretanto, por ser uma droga de uso recente,<sup>4</sup> pouco se sabe sobre a sua farmacocinética<sup>15,16,17,18</sup> e seus efeitos adversos. Alguns são hipersensibilidade,<sup>19</sup> dermatite,<sup>20</sup> onicolise, mucosite, mialgia<sup>21</sup> e toxicidade pulmonar, sendo a maioria deles descritos recentemente. Ainda mais, pouco se conhece sobre os efeitos crônicos da droga em seres vivos, seja pela ausência de tempo suficiente de seguimento clínico, seja pela falta de modelos experimentais para estudo.

A toxicidade pulmonar induzida por quimioterápicos não é novidade na prática clínica. A lesão induzida pela bleomicina, por exemplo, é bem conhecida e serve como modelo experimental para fibrose pulmonar idiopática.<sup>22,23</sup> Ainda, existe a possibilidade de lesão pulmonar crônica induzida por outras drogas menos conhecidas. Alguns estudos recentes mostram, por exemplo, que crianças tratadas para câncer com CCNU (carmustina) podem apresentar fibrose progressiva na idade adulta<sup>24</sup>

A pneumonia induzida por uso de taxane merece destaque, tanto pela incidência crescente ao longo dos anos (chegando a 10% em alguns estudos<sup>25,26</sup>), tanto pela sua alta mortalidade (podendo ser superior a 40%<sup>27</sup>). Normalmente ocorre em pacientes politratados,<sup>25,28</sup> em associações de esquemas quimioterápicos ou em radio-quimioterapia concomitantes,<sup>29,30</sup> sendo raramente reportada após uma única aplicação de quimioterapia. Vale salientar que inexistente um exame específico para o diagnóstico desta complicação, sendo dado por exclu-

são na maioria dos casos. Até o momento, não existe forma de prevenção ou tratamento específicos para os pacientes acometidos, sendo desconhecido o mecanismo pelo qual estas drogas induzem lesão pulmonar.

Um dado importante que poderia contribuir para compreensão da toxicidade dos taxanes está nas associações de drogas. Sabe-se que o docetaxel é metabolizado por via hepática, pelo citocromo P<sub>450</sub>, possuindo excreção biliar.<sup>17</sup> Estudo recente<sup>31</sup> realizado entre 6647 pacientes tratados para câncer de pulmão, demonstrou que 99% destes utilizavam alguma medicação capaz de interagir com o citocromo P<sub>450</sub>, sendo este um fator importante a ser considerado, uma vez que a associação de drogas é fator de risco para a toxicidade induzida pelo uso de taxanes.<sup>32</sup>

Vários são os mecanismos descritos para toxicidade pulmonar induzida por fármacos, sendo rapidamente abordados os principais.

## 1.2 Mecanismos de lesão pulmonar aguda induzida por drogas

A toxicidade induzida por drogas está frequentemente presente na prática médica, sendo considerada importante causa de morbidade. Em estudo de meta-análise publicado nos EUA, a incidência encontrada de efeitos adversos pelo uso de drogas foi de 6.7%, sendo fatal em 0.32% dos pacientes.<sup>33</sup> Diversas drogas são capazes de produzir lesão pulmonar pelos mais diversos mecanismos fisiopatológicos.<sup>34</sup> Os principais podem ser descritos como:

**Injúria oxidativa:** usualmente, moléculas oxidativas que são produzidas dentro de células fagocitárias (monocitos, macrófagos e neutrófilos) participam em reações de oxirredução, resultando em oxidação de ácidos graxos, os quais levam à instabilidade da membrana celular. Normalmente, os mecanismos de defesa celular (superóxido

dismutase, peroxidases,  $\alpha$ -tocoferol, p.e.) promovem o equilíbrio necessário para prevenção da injúria. Diversas drogas agem por este mecanismo, sendo a nitrofurantoína um exemplo típico deste mecanismo.

**Dano vascular pulmonar:** este mecanismo manifesta-se como edema pulmonar agudo, doença intersticial difusa aguda, oclusão vascular pulmonar, hipertensão pulmonar ou hemorragia pulmonar.<sup>35</sup> O mecanismo provável é por aumento da pressão hidrostática na microvasculatura, aumento da permeabilidade do endotélio vascular ou por ativação de mecanismos imunológicos ou inflamatórios.

**Depósito de fosfolípídeos intra-celular:** determinadas drogas podem levar ao acúmulo de fosfolípídeos dentro dos lisossomos, devido à inibição enzimática da fosfolipase A2. O mecanismo usualmente é reversível com a suspensão da droga. O mecanismo de toxicidade da amiodarona pode ser citado como exemplo nesta classe.<sup>36</sup>

**Lesão mediada pelo sistema imunológico:** algumas drogas podem funcionar como haptenos, induzindo à ativação da cascata imunológica. Depósitos de complexo antígeno-anticorpo podem desencadear a ativação da resposta inflamatória, levando à lesão celular. O lúpus eritematoso sistêmico induzido por drogas é um exemplo deste mecanismo.

**Depressão do sistema nervoso central:** determinadas drogas são capazes de causar edema pulmonar neurogênico agudo por causar descarga de neurotransmissores, levando à hipertensão intra-craniana, que por sua vez pode levar a uma descarga autonômica aguda. Drogas como o naloxane, heroína, interleucina 2, citarabina ou o metotrexato aplicado por via intra-tecal podem servir para exemplificar este mecanismo.<sup>37</sup>

**Efeito citotóxico direto:** alguns quimioterápicos são capazes de lesar diretamente o pulmão. A bleomicina, por exemplo, é capaz de provocar lesão por dano direto aos pneumócitos

tipo1, induzindo fibrose pulmonar (chamada de alveolite fibrosante). Este mecanismo é bem conhecido e estudado.<sup>38,39,40</sup>

A pneumonia induzida por taxane foi reportada pela primeira vez em 1997,<sup>41</sup> permanecendo desconhecida sua fisiopatologia e representado importante papel para pesquisa pelo impacto que estas drogas possuem no tratamento do câncer. Ainda, não existe modelo experimental, descrito até o momento desta revisão, para avaliação dos efeitos pulmonares oriundos da exposição ao docetaxel, sendo todo o conhecimento reportado através de relatos de caso ou como citação em estudos clínicos.<sup>25,26,27,28,41,42</sup> Este trabalho visa estudar a pneumonia induzida por docetaxel através de um modelo experimental em ratos.

## 2 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo principal avaliar as propriedades mecânicas do sistema respiratório e analisar a histologia dos pulmões de ratos submetidos a aplicação única, por via intra-peritoneal (i.p.), de docetaxel. Como objetivos secundários podem-se citar:

1. Avaliação da existência de proporcionalidade entre dose de docetaxel e lesão pulmonar induzida pela droga, em caso de ser encontrada pneumonia decorrente da aplicação deste quimioterápico;
2. Avaliação do provável mecanismo associado à lesão pulmonar induzida pela aplicação, por via intra-peritoneal, do agente quimioterápico docetaxel (forma anidro), caso exista lesão.

### 3 Material e Métodos

Tendo em vista o objetivo deste trabalho, houve divisão do estudo em três partes complementares, a saber:

1. Estudo piloto para determinação da dose letal em 50% da amostra ( $DL_{50}$ ) do docetaxel aplicado por via i.p. em ratos *Wistar*.
2. Avaliação das propriedades mecânicas do sistema respiratório de ratos submetidos a aplicação única do docetaxel, pelo método da pausa inspiratória.
3. Avaliação histológica pela técnica de morfometria do tecido pulmonar de ratos submetidos a aplicação única de docetaxel.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília, Instituto de Biologia (IB) - UnB. Em cada uma das fases adotamos metodologia própria descrita a seguir. Todo o trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Fisiologia Respiratória da Universidade de Brasília - UnB, com exceção da confecção das lâminas para análise histológica e de sua fotografia, que foram realizadas no Laboratório de análise patológica Micra em Brasília - DF. Este trabalho foi compilado e formatado seguindo padronização tipográfica e bibliográfica do *International Committee of Medical Journal Editors - ICMJE* (Vancouver, 1997).

#### 3.1 Estudo Piloto

Foi realizado estudo piloto para estabelecer a  $DL_{50}$  do docetaxel em ratos *Wistar*, que foi determinada em 250 mg/m<sup>2</sup>. A dose foi reduzida em 16% (para adequar a  $DL_{50}$  ao modelo estatístico escolhido), de forma a gerar um modelo experimental que permitisse o



ajuste da dose à intervalos regulares, considerando a dose terapêutica usual do docetaxel em  $70\text{mg}/\text{m}^2$  ( $60\text{-}100\text{mg}/\text{m}^2$ ).<sup>5</sup> Desta forma, as doses determinadas de quimioterápico aplicadas foram  $70\text{mg}/\text{m}^2$ ,  $140\text{mg}/\text{m}^2$ ,  $210\text{mg}/\text{m}^2$ , calculadas pela superfície corpórea (SC) individual de cada animal.

### 3.2 Protocolo Experimental

Foi realizado estudo experimental utilizando 42 ratos, raça *Wistar*, do gênero masculino, com massa entre 270 e 310 g, adquiridos no laboratório BioAgri, Planaltina - DF. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, conforme:

- **Grupo Controle (GC):** composto por 10 ratos, aos quais foi aplicada solução veículo;
- **Grupo 70 (G70):** composto por 10 ratos, aos quais foi aplicada solução de docetaxel anidro, na dose de  $70\text{mg}/\text{m}^2$ ;
- **Grupo 140 (G140):** composto por 10 ratos, aos quais foi aplicada solução de docetaxel anidro, na dose de  $140\text{mg}/\text{m}^2$ ;
- **Grupo 210 (G210):** composto por 12 ratos, aos quais foi aplicada solução de docetaxel anidro, na dose de  $210\text{mg}/\text{m}^2$ .

A dose foi calculada pela superfície corporal (SC) dos ratos, corrigida para  $\text{mg}/\text{cm}^2$ , pelo método proposto por Spector,<sup>43</sup> sendo considerada a fórmula:

$$SC = KW^{2/3} \quad (1)$$

onde K é a constante do rato de 9.6, W é o peso em g e a SC é apresentada em  $\text{cm}^2$ ;

Todos os animais foram pesados em balança adequada e submetidos a uma única aplicação de docetaxel no primeiro dia (D1), com dose calculada para sua SC correspondente, por via i.p. No grupo controle foi injetada solução de etanol a 13% em água destilada, sendo a mesma solução utilizada para diluição do docetaxel anidro. Os ratos foram mantidos em ciclos claro e escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*.

Após 4 semanas da aplicação (D28), foi realizada nova pesagem dos ratos e avaliação das propriedades mecânicas do sistema respiratório dos animais. Para tanto, foi realizada anestesia com ketamina 75 mg.kg<sup>-1</sup> i.m. e xilazina 10 mg.kg<sup>-1</sup> i.m. Este é o regime anestésico padrão utilizado no Laboratório de Fisiologia Respiratória - UnB.<sup>44,45</sup>

Inicialmente, foi realizada traqueostomia no animal através de incisão cervical, acima do esterno. Após divulsão da musculatura infra-hióidea e separação da traquéia do esôfago, foi realizada a inserção de uma cânula de polietileno rígida na traqueia. Ao mesmo tempo, foi feita inserção de cânula esofágica de polietileno, por via oral, separadamente. Esta manobra permitiu decompor os componentes do sistema respiratório (sr) em pulmões (L) e caixa torácica (cw). Com as cânulas em posição, os animais foram paralisados totalmente com administração de brometo de pancurônio, na dose de 5 mcg.kg<sup>-1</sup>, aplicados por via endo-venosa (e.v.) e levados ao sistema de registro, com volume ajustado entre frequência respiratória (FR) e fluxo respiratório, através de um fluxômetro, conforme previamente padronizado por outros autores.<sup>44,45</sup>

Após ajustes, os animais foram ventilados mecanicamente com FR de 100 incursões respiratórias por minuto, fluxo de 1,1 ml.s<sup>-1</sup>, volume de 0,3 ml e pressão positiva no final da expiração (PEEP) de 0 cmH<sub>2</sub>O.

Foram realizadas, ao menos, 10 manobras de oclusão das vias aéreas para cada rato e, ao término, ainda em ventilação mecânica, os animais foram mortos com administração e.v.

de  $2 \text{ mmol.kg}^{-1}$  de KCl. Após eutanásia, a traqueia de cada animal foi ocluída na capacidade residual funcional (CRF) e os ratos levados para a retirada conjunta do coração e pulmões, através de esternotomia longitudinal, com ampla exposição do interior da caixa torácica, sem pinçamento dos pulmões. Os pulmões D e E foram separados por secção completa do brônquio fonte correspondente.

O pulmão D foi pesado, em balança digital (Filizola Baby, SP, Brasil) no momento de sua retirada, sendo considerado o valor obtido como peso líquido (PL). Após, foi colocado em estufa (Brasmed, SP, Brasil) por 72 horas, a  $50^{\circ}\text{C}$ , e realizada nova medida em balança digital, sendo esse novo valor considerado como peso seco (PS).

O pulmão esquerdo foi imediatamente colocado em solução de formol tamponado a 9,8%. O mesmo foi processado para cortes histológicos em parafina (com 3 micrômetros de espessura) e realizada coloração com hematoxilina-eosina (HE), picrossírius (PCS) e resorcina fucsina de Weigert com oxidação (RF).<sup>46</sup> As lâminas produzidas foram analisadas histologicamente através de método morfométrico específico.

### **3.3 Método de avaliação das propriedades mecânicas do sistema respiratório**

Para análise das propriedades mecânicas do sistema respiratório foi utilizado o modelo da oclusão (ou pausa inspiratória), conforme descrito e padronizado por Bates.<sup>47,48</sup> Basicamente, o método da oclusão (ou pausa inspiratória) consiste na ventilação mecânica dos animais, com fluxo ( $\dot{V}$ ) e volume constantes e oclusão das vias aéreas ao final da inspiração. Após oclusão, observa-se queda rápida da pressão transpulmonar ( $\Delta P_1$ ), de um valor pré-oclusão até um ponto de inflexão, seguida de uma queda pressórica lenta ( $\Delta P_2$ ) até que um platô é alcançado ( $P_{el}$ ). A queda rápida na pressão pulmonar representa a dissipação de

energia contra a resistência das vias aéreas;  $\Delta P2$  reflete o *stress-relaxation* ou as propriedades visco-elásticas do sistema respiratório e de seus componentes, juntamente com a contribuição das inhomogeneidades de constante de tempo<sup>49</sup> (efeito *pendelluft* + esforço de adaptação do sistema respiratório). O traçado gerado pelo método encontra-se esquematizado na figura3.

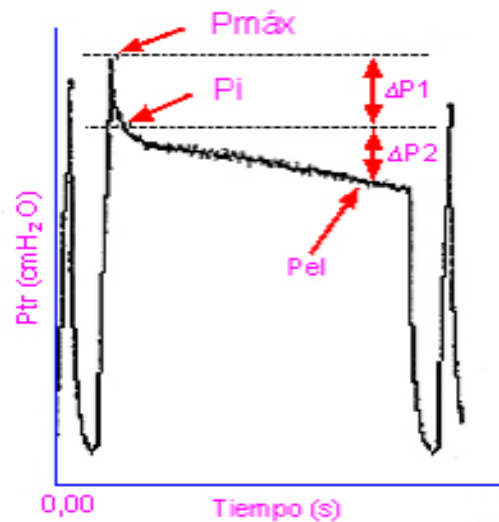


Figura 3: Traçado Obtido pelo Método da Pausa Inspiratória.

Onde: P<sub>MAX</sub>= pressão máxima; P<sub>i</sub> = Ponto de Inflecção; P<sub>el</sub> = elastância;  $\Delta P1$  = Queda pressórica rápida (P<sub>i</sub> - P<sub>MAX</sub>);  $\Delta P2$  = Queda pressórica lenta (P<sub>el</sub> - P<sub>i</sub>); P<sub>el</sub> = Plateau.

As variáveis aferidas foram o fluxo inspiratório ( $\dot{V}$ ) e a pressão do sistema (P<sub>sr</sub> ou P<sub>cw</sub>). Para determinação das propriedades mecânicas foi necessário o cálculo do volume corrente (V). Essa variável foi obtida através do cálculo da integral na curva de  $\dot{V}$  obtida. Foram calculadas as:

A) Elastância estática (E<sub>st</sub>), pela fórmula:

$$E_{st} = \frac{P_{el}}{V} \quad (2)$$

Onde P<sub>el</sub> equivale ao ponto de estabilização na curva de decaimento da pressão (pressão elástica) e

V equivale ao volume;

B) **Elastância dinâmica ( $E_{dyn}$ )** pela fórmula:

$$E_{dyn} = \frac{P_i}{V} \quad (3)$$

Onde  $P_i$  equivale ao ponto de inflexão na curva de decaimento da pressão e  $V$  equivale ao volume;

C) **Resistência total do sistema ( $R$ )**, pela fórmula:

$$R_X = \frac{\Delta P_{tot}}{\dot{V}} \quad (4)$$

Onde  $\Delta P_{tot}$  equivale a  $\Delta P1 + \Delta P2$ , sendo X o sistema estudado e  $\dot{V}$  equivale ao fluxo.

Para cada sistema avaliado foram realizadas as mesmas medidas descritas acima, ou seja, para o sistema respiratório (sr) foram avaliadas as  $E_{st,sr}$ ,  $E_{dyn,sr}$  e  $R_{sr}$ , para a caixa torácica (cw) foram avaliadas as  $E_{st,cw}$ ,  $E_{dyn,cw}$  e  $R_{cw}$  e para o pulmão (L) foram analisadas as  $E_{st,L}$ ,  $E_{dyn,L}$  e  $R_L$ . As medidas de cw e sr foram obtidas diretamente. As medidas de L foram obtidas subtraindo-se de sr os valores de cw ( $sr - cw = L$ ).

### 3.3.1 Processamento de sinais e coleta de dados

Para o registro das propriedades mecânicas do sistema respiratório dos ratos, as cânulas foram conectadas, separadamente, a um pneumotacógrafo (A. Fleisch, número 0, Godart-Statham<sup>®</sup>, Bilthoven, Holanda) conectado a um ventilador mecânico, alimentado por um compressor de ar, o qual possibilitou o controle dos tempos inspiratório e expiratório, com ajuste da frequência respiratória e da pausa no final da inspiração. O pneumotacógrafo, por sua vez, foi conectado a um transdutor (PT5A, Grass<sup>®</sup>, Quincy, MA, EUA) para medida

do diferencial de pressões da caixa torácica e do sistema respiratório, conforme descrito por Mortola.<sup>50</sup>

As pressões traqueais e esofágicas foram amplificadas por polígrafo Grass (7C, Grass, Quincy, MA, EUA), com amostras geradas em conversor de 200 Hz analógico-digital de 12-bits (EMG Syztem do Brasil, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) e gravados em mídia digital. Todos os dados de mecânica foram coletados e analisados utilizando o programa Windaq/Pro software (DATAq Instruments, Akron, OH, EUA)

### 3.4 Método para análise histológica por morfometria

Após processamento e coloração do tecido pulmonar dos ratos com HE, PCS e RF, foi realizada a análise histológica por morfometria de todas as lâminas. Foi utilizada a técnica de contagem de pontos, conforme descrita por Weibel,<sup>51,52</sup> a qual utiliza retículo substituindo uma ocular em microscópio óptico (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) conforme descrito na figura 4, com calibração conforme tabela 1.

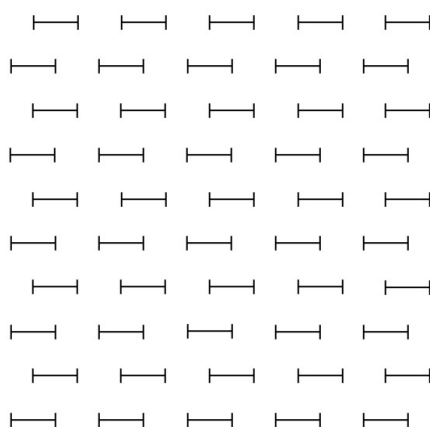


Figura 4: Retículo de 50 linhas e 100 pontos  
 $1\text{mm} = 1000\ \mu\text{m}$ .

Tabela 1: Valores da medida do retículo.

Aumento	Valor do Intercepto ( $\mu\text{m}$ )	Área do Retículo ( $\mu\text{m}^2$ )
10x	100	1.000.000
40x	25	62.500
100x	10	10.000

### 3.4.1 Descrição das medidas utilizadas para análise histológica por morfometria

As variáveis morfométricas medidas e utilizadas para avaliação histológica estão descritas abaixo. Para avaliação das medidas que utilizam aumento de 100x no microscópio óptico (MO) foi usado óleo de imersão sobre a lâmina.

1. **Proporção de fibras colágenas no parênquima pulmonar:** foi realizada com aumento de 100x no MO. Na lâmina, foram escolhidos 25 campos aleatórios e feita contagem da proporção de fibras colágenas que incidem sobre os pontos do retículo, dividido pela quantidade de pontos que incidem sobre os septos alveolares. A coloração utilizada foi o PCS e todos os campos foram avaliados sob luz polarizada.

$$\text{Proporção de fibras colágenas (PP)} : \frac{\text{Número de pontos incidentes sobre fibras colágenas}}{\text{Número de pontos incidentes sobre septos alveolares}} \quad (5)$$

2. **Proporção de fibras colágenas na vasculatura pulmonar:** foi realizada com aumento de 100x no MO. Na lâmina, foram escolhidas 5 artérias pulmonares aleatórias, com área de até  $10.000 \mu\text{m}^2$  e contada a proporção de fibras colágenas que incidem sobre os pontos do retículo, dividido pela quantidade de pontos que incidem sobre a área da mesma artéria. A coloração utilizada foi o PCS e os campos foram avaliados sob luz polarizada.

$$\text{Proporção de fibras colágenas (VP)} : \frac{\text{Número de pontos incidentes sobre fibras colágenas}}{\text{Número de pontos incidentes sobre área arterial}} \quad (6)$$

3. **Razão Superfície-Volume:** foi realizada com aumento de 40x no MO. Na lâmina, foram escolhidos 10 campos aleatórios e avaliada a proporção de interceptos que cruzaram os septos alveolares dividindo pelo comprimento cumulativo do intercepto, conforme a fórmula:

$$\frac{S}{V} = \frac{2I}{L} \quad (7)$$

Onde I é o número de interceptos que cruzaram o septo alveolar e L é o comprimento cumulativo do intercepto, obtido por:

$$L = \frac{Pd}{2} \quad (8)$$

Onde P é o número de pontos que incidem nos espaços aéreos e d é o comprimento do intercepto em  $\mu\text{m}$ .

4. **Proporção de fibras elásticas no parênquima pulmonar:** foi realizada com aumento de 100x no MO. Na lâmina, foram escolhidos 25 campos aleatórios e contada a proporção de fibras elásticas que incidem sobre os pontos do retículo, dividido pela quantidade de pontos que incidem sobre os septos alveolares. A coloração utilizada foi o RF.

$$\text{Proporção de fibras elásticas (PP)} : \frac{\text{Número de pontos incidentes sobre fibras elásticas}}{\text{Número de pontos incidentes sobre septos alveolares}} \quad (9)$$



5. **Proporção de fibras elásticas na vasculatura pulmonar:** foi realizada com aumento de 100x no MO. Na lâmina, foram escolhidas 5 artérias pulmonares aleatórias e contada a proporção de fibras elásticas que incidem sobre os pontos do retículo, dividido pela quantidade de pontos que incidem sobre a área da mesma artéria. A coloração utilizada foi o RF.

$$\text{Proporção de fibras elásticas (VP)} : \frac{\text{Número de pontos incidentes sobre fibras elásticas}}{\text{Número de pontos incidentes sobre área arterial}} \quad (10)$$

6. **Celularidade no parênquima pulmonar:** realizada com aumento de 100x no MO. Na lâmina, foram escolhidos 10 campos aleatórios e contada a proporção de pontos que incidem sobre o tipo celular escolhido, dividido pela quantidade de pontos que incidem sobre os septos alveolares. A coloração utilizada foi o HE e foram avaliadas a celularidade (infiltração) de células mononucleares (MN) e de células polimorfonucleares (PMN).

$$\text{Celularidade} : \frac{\text{Número de pontos incidentes sobre tipo celular escolhido}}{\text{Número de pontos incidentes sobre septos alveolares}} \quad (11)$$

7. **Índice de edema alveolar:** foi realizado com aumento de 40x no MO. Na lâmina, foram escolhidos 10 campos pulmonares aleatórios e contada a proporção de pontos que incidem sobre a área de edema intra-alveolar, dividido pela quantidade de pontos que incidem sobre o interior dos alvéolos. A coloração utilizada foi o HE.

$$\text{Índice de edema alveolar} : \frac{\text{Número de pontos incidentes sobre edema intra – alveolar}}{\text{Número de pontos incidentes no interior dos alvéolos}} \quad (12)$$

8. **Índice de edema peri-vascular (IEPV)**: foi realizado com aumento de 100x no MO. Na lâmina, foram escolhidos 5 artérias pulmonares aleatórias, com diâmetro de até 10.000  $\mu\text{m}^2$ . A coloração utilizada foi a RF, calculado conforme:

$$\text{IEPV} : \frac{\sqrt{NP}}{NI} \quad (13)$$

Onde NP é o número de pontos que incidem sobre as áreas de edema perivascular e NI é o número de interceptos que cruzam a membrana basal dos vasos.

9. **Diâmetro alveolar médio ( $L_M$ )**: foi realizado com aumento de 100x no MO. Na lâmina, foram escolhidos 10 campos pulmonares aleatórios e verificada a proporção de interceptos que cruzam o septo alveolar. A coloração utilizada foi o HE e o resultado é representado em  $\mu\text{m}$  e obtido conforme:

$$L_M : \frac{\text{Comprimento total da linha}}{\text{Interceptos que cruzam o septo alveolar}} \quad (14)$$

10. **Diâmetro interno das vias aéreas (DI)**: foi realizado com aumento de 40x no MO. Na lâmina, foram escolhidos 3 bronquíolos, com área de até 62.500  $\mu\text{m}^2$ . A coloração utilizada foi o HE e o resultado é representado em  $\mu\text{m}$ , calculado conforme:

$$DI : \frac{\text{Número de pontos sobre o lúmen da via aérea}}{\text{Número de pontos sobre epitélio e músculo liso das vias aéreas}} \quad (15)$$

### 3.5 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão (EP), exceto a variável peso apresentada como média e desvio padrão (DP). Elaboramos previamente uma hipótese nula para este estudo:

$H_0$   $\rightarrow$  Ausência de lesão pulmonar induzida pelo docetaxel após uma única aplicação por via i.p.

As variáveis foram submetidas ao teste de *Shapiro-Wilk* para avaliar normalidade.

Tratando-se de resultados com distribuição normal, realizou-se o teste de Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. Em caso de distribuição não-Gaussiana, foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* com pós-teste de *Mann-Whitney*. Foram considerados para análise erro  $\alpha = 5\%$  e  $\beta = 20\%$

Utilizamos o software Statistical Analysis System (Cary, NC, EUA) e Statistical Package for Social Science (IBM SPSS 18, version 18.0.) para todas as análises descritas.

## 4 Resultados

### 4.1 Análise descritiva da amostra

Foram estudados 42 ratos, havendo ocorrido a morte de 1 animal no G140 e 1 animal no G210. Em 9 de 10 animais do G70 foram observadas alterações histológicas e em todos os animais do G140 e G210 (10/10).

Em relação ao peso, a tabela 2 demonstra os valores aferidos no dia da aplicação do docetaxel (D1) e no dia da avaliação das propriedades mecânicas do sistema respiratório (D28). A comparação do peso entre grupos não demonstrou variação significativa entre D1 e D28 ( $p = 0.064$ ). Contudo, em todos os animais foi visto ganho ponderal significativo no intervalo, embora não uniforme - o grupo submetido à aplicação de docetaxel em doses mais altas (G210) apresentou ganho de peso significativamente menor que o GC. As análises comparativas dos pesos estão representados na figura 5.

Tabela 2: Valores médios do peso (g) no D1 e D28

	D1	D28
Controle	273.00 ± 47.21	349.50 ± 35.78
Grupo G70	278.00 ± 30.84	325.00 ± 24.03
Grupo G140	291.00 ± 44.33	341.11 ± 50.07
Grupo G210	290.00 ± 18.97	310.00 ± 22.36

Resultados apresentados em média ± DP

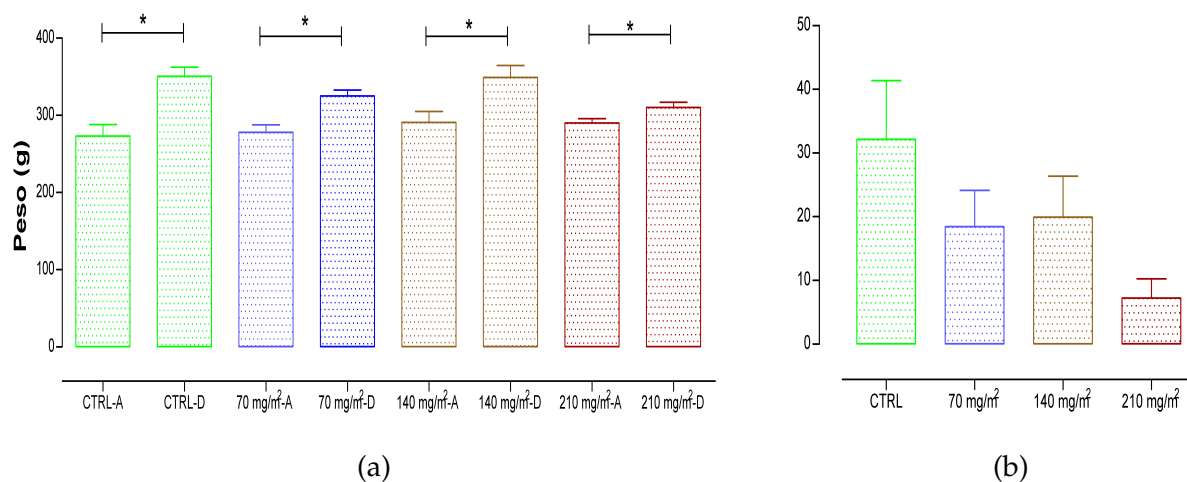


Figura 5: Relação de peso dos animais no começo e final do estudo nos próprios grupos (a) e comparação entre grupos do percentual de ganho ponderal (b) observado ao final do estudo. O GC ganhou peso de forma significativamente maior que o G210 (b).

\* $p < 0.05$

## 4.2 Relação PL/PS

Na avaliação da relação ao PL/PS não foi observada diferença significativa ( $p = 0.145$ ), embora os grupos nos quais foi realizada aplicação de quimioterapia com doses maiores tenha apresentado uma tendência a um maior peso seco (figura 6).

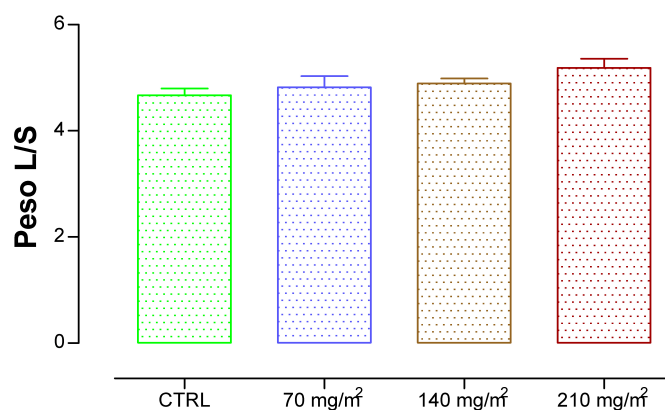


Figura 6: Relação entre peso Líquido (PL) e Peso seco (PS) do pulmão E (PL/PS)

### 4.3 Análise das propriedades mecânicas

Todas as variáveis apresentaram distribuição não-gaussiana. Os valores médios (com EP) das propriedades do sistema respiratório obtidos em todos os grupos estão apresentados na tabela 3, havendo diferença estatística e plausível nas medidas de  $E_{st,cw}$ ,  $E_{dyn,cw}$  e  $R_{cw}$ . A comparação das variáveis demonstra, ainda, tendência de queda da resistência do sistema respiratório ( $R_{rs}$ ), conforme demonstrado na figura 7(a). Os demais parâmetros não revelaram alterações explicáveis ou com plausibilidade biológica, conforme apresentado nas figuras 8 e 9.

Tabela 3: Comparação das propriedades mecânicas do sistema respiratório de ratos submetidos à aplicação, por via intra-peritoneal, de docetaxel, em diferentes doses

Variáveis	Grupo Controle	G70	G140	G210	$p^{**}$
	N = 10	N = 10	N = 9	N = 11	
	Média ± EP	Média ± EP	Média ± EP	Média ± EP	
$E_{st,rs}$	1,002 ± 0,063	1,285 ± 0,082	1,060 ± 0,071	1,277 ± 0,110	0.035 <sup>&amp;</sup>
$E_{dyn,rs}$	1,169 ± 0,071	1,516 ± 0,104	1,163 ± 0,072	1,530 ± 0,134	0.015 <sup>&amp;</sup>
$R_{rs}$	0,498 ± 0,289	0,075 ± 0,014	0,085 ± 0,014	0,070 ± 0,010	0.116
$E_{st,cw}$	0,214 ± 0,029	0,027 ± 0,012	0,146 ± 0,040	0,277 ± 0,037	<0.0001 <sup>a,e,f</sup>
$E_{dyn,cw}$	0,324 ± 0,033	0,145 ± 0,016	0,320 ± 0,082	0,326 ± 0,036	<0.0001 <sup>a,e</sup>
$R_{cw}$	0,028 ± 0,002	0,010 ± 0,0082	0,035 ± 0,005	0,023 ± 0,003	<0.0001 <sup>a,d,e</sup>
$E_{st,L}$	0,788 ± 0,060	1,258 ± 0,088	0,914 ± 0,070	1,000 ± 0,117	0.003 <sup>&amp;</sup>
$E_{dyn,L}$	0,845 ± 0,070	1,371 ± 0,113	0,843 ± 0,097	1,204 ± 0,140	0.01 <sup>a,d</sup>
$R_L$	0,174 ± 0,035	0,209 ± 0,040	0,161 ± 0,060	0,148 ± 0,027	0.787

$R_{rs}$  - Resistência total sistema respiratório (cmH<sub>2</sub>O);  $E_{st,rs}$  - elastância estática sistema respiratório (cmH<sub>2</sub>O ml<sup>-1</sup>);  $E_{dyn,rs}$  - elastância dinâmica sistema respiratório (cmH<sub>2</sub>O ml<sup>-1</sup>);  $R_{cw}$  - Resistência total caixa torácica (cmH<sub>2</sub>O);  $E_{st,cw}$  - elastância estática caixa torácica (cmH<sub>2</sub>O ml<sup>-1</sup>);  $E_{dyn,cw}$  - elastância dinâmica caixa torácica (cmH<sub>2</sub>O ml<sup>-1</sup>);  $R_L$  - Resistência total do pulmão (cmH<sub>2</sub>O);  $E_{st,L}$  - elastância estática pulmão (cmH<sub>2</sub>O ml<sup>-1</sup>);  $E_{dyn,rs}$  - elastância dinâmica pulmão (cmH<sub>2</sub>O ml<sup>-1</sup>)

\*\*Comparação entre grupos com significância (pós-teste): a = (GC x G70); b = (GC x G140); c = (GC x G210); d = (G70 x G140); e = (G70 x G210); f = (G140 x G210); & = pós-teste não foi capaz de definir diferença entre grupos.

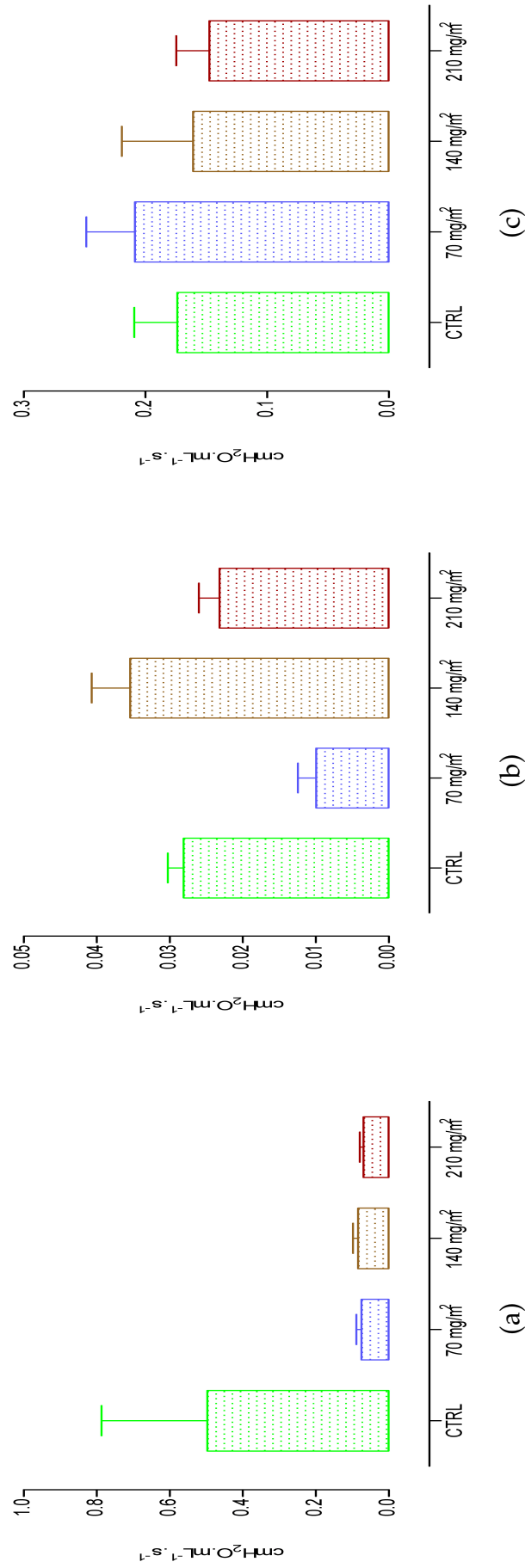


Figura 7: Análise da resistência do sistema respiratório (a), da caixa torácica (b) e do pulmão (c) nos animais submetidos à aplicação de docetaxel. A análise demonstrou tendência a diminuição da resistência no sistema respiratório dos animais expostos ao docetaxel, embora sem significância estatística.

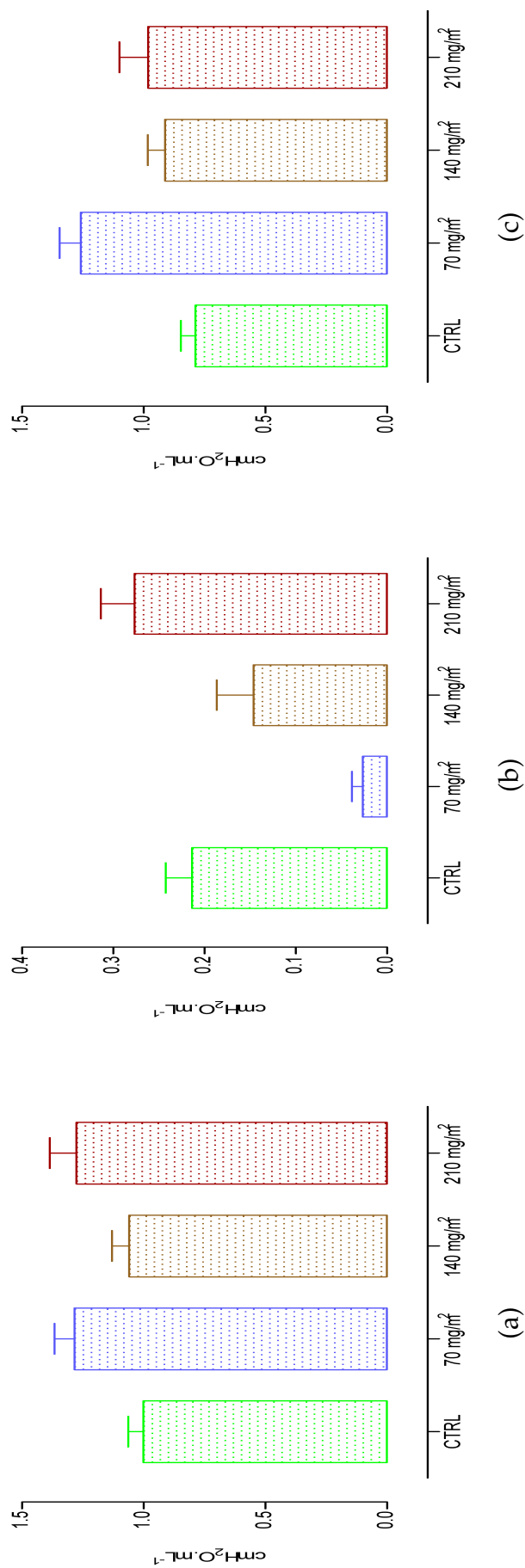


Figura 8: Análise da elasticidade estática do sistema respiratório (a), caixa torácica (b) e pulmão (c) nos animais submetidos à aplicação de docetaxel. A análise estatística demonstrou alteração estatisticamente significativa na cw.



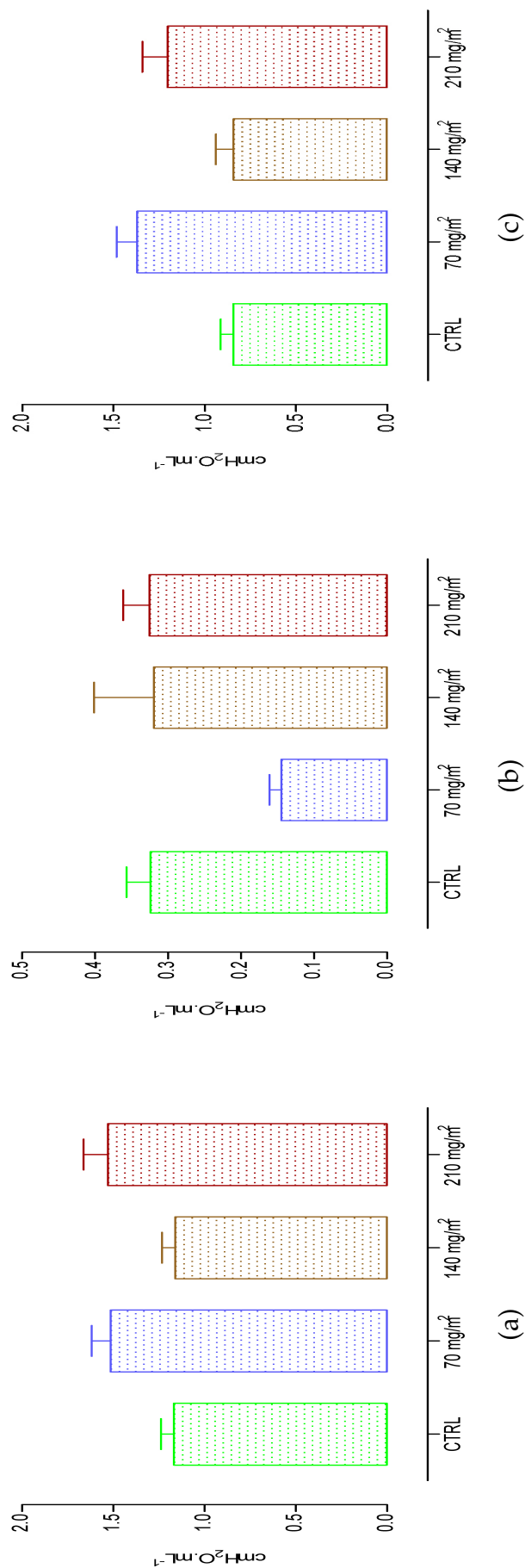


Figura 9: Análise da elasticidade dinâmica do sistema respiratório (a), caixa torácica (b) e pulmão (c) nos animais submetidos à aplicação de docetaxel. A análise estatística demonstrou alteração estatisticamente significativa na cw.

## 4.4 **Análise Morfométrica do parênquima pulmonar**

Todas as variáveis apresentaram distribuição gaussiana. Os resultados são descritos a seguir.

### 4.4.1 **Avaliação da proporção de fibras colágenas do parênquima pulmonar**

Os animais expostos ao docetaxel, independentemente da dose, apresentaram diferença significativa em relação ao controle, mesmo em dosagens consideradas terapêuticas (70 mg/m<sup>2</sup>). O G70 apresentou alteração em 90% dos indivíduos, com valor médio de  $1,256 \pm 0,227$ . Nos G140 e G210 foi observada lesão em 100% dos animais, com valores médios de  $1,041 \pm 0,206$  e  $3,379 \pm 0,525$  respectivamente. O GC apresentou valores de  $0,065 \pm 0,015$ . A tabela 4 resume a comparação entre os grupos GC, G70, G140 e G210, para os quais foi encontrado resultado significativo.

Ainda, doses mais altas apresentaram maior quantidade de deposição de colágeno no parênquima pulmonar, sugerindo lesão irreversível dos septos alveolares e relação de proporcionalidade entre a dose de docetaxel e a lesão pulmonar detectada (figura 10).

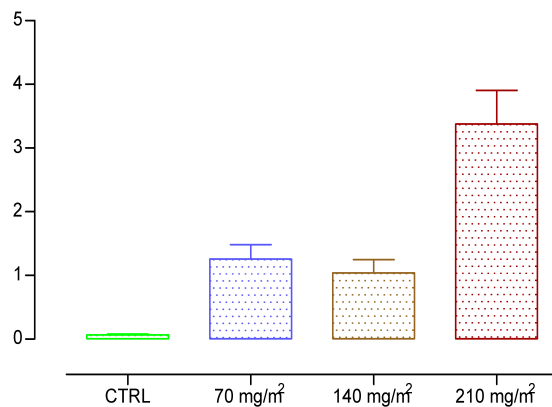


Figura 10: Comparação entre a proporção de fibras colágenas no parênquima pulmonar de animais submetidos à aplicação única de docetaxel.

\* $p < 0.0001$ , demonstrando proporcionalidade entre a quantidade de colágeno presente no interstício pulmonar e a dose de aplicação do docetaxel.

As fotos abaixo demonstram a presença de colágeno no interstício pulmonar do

G210 (figura 11)

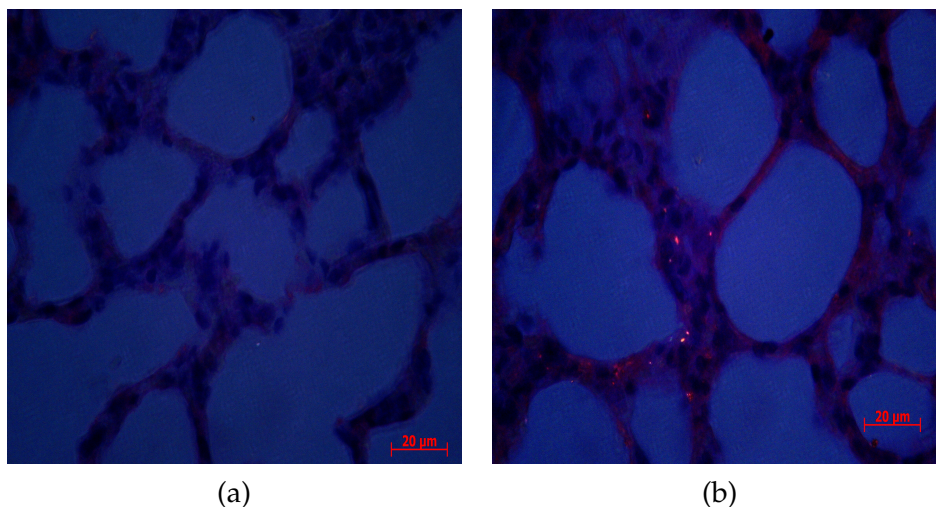


Figura 11: Foto de pulmão sob luz polarizada para análise de fibras colágenas (coloração PCS, 100x). O G210 (b) apresenta quantidade superior de colágeno no interstício pulmonar, representada pelos depósitos de coloração avermelhada. No GC (a) observa-se pouca presença de colágeno.

#### 4.4.2 Avaliação da proporção de fibras colágenas na vasculatura pulmonar

A proporção de fibras colágenas nos vasos pulmonares mostrou valores percentuais médios de  $3,489 \pm 1,164$  para o GC,  $5,852 \pm 1,289$  para o G70,  $5,394 \pm 0,962$  para o G140 e  $8,758 \pm 1,938$  para o G210, não sendo observada diferença estatisticamente significativa na comparação entre grupos (figura 16).

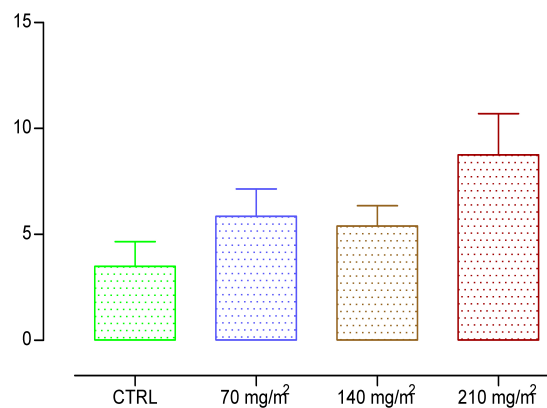


Figura 12: Comparação entre a proporção de fibras colágenas na vasculatura pulmonar de animais submetidos à aplicação única de docetaxel.  
 $p=0.084$

A figura 24 demonstra o aspecto microscópico do colágeno vascular avaliado sob a luz polarizada no MO.

#### 4.4.3 Razão superfície-volume (RSV)

A análise da RSV mostrou valores percentuais médios de  $9.116 \pm 0.333$  para o GC, de  $8,545 \pm 0,200$  para o G70, de  $8,559 \pm 0,246$  para o G140 e  $7,887 \pm 0,137$  para o G210, com  $p = 0.007$  na comparação entre GC e G210. A RSV encontra-se representada na figura 13.

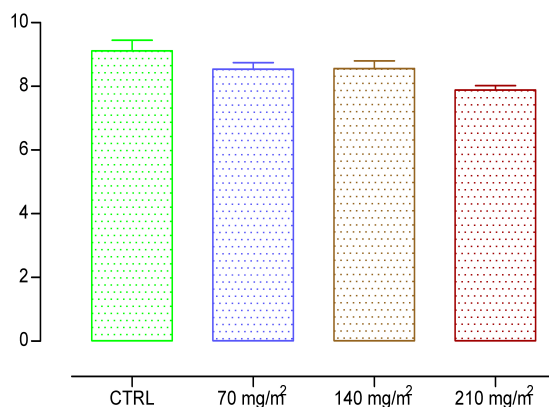


Figura 13: Comparação da variável RSV de animais submetidos à aplicação única de docetaxel\*. \* $p=0.007$ .

As fotos abaixo mostram o aumento na espessura dos septos alveolares, causados pela intensa infiltração celular (figura 14)

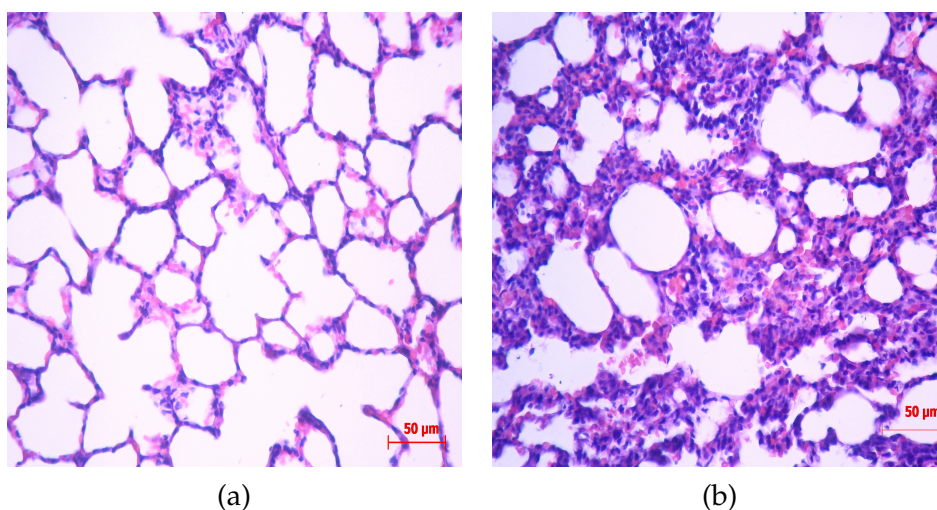


Figura 14: Lâmina de pulmão comparando RSV no GC e no G210 (coloração HE, 40x). O G210 (b) apresenta aumento da espessura dos septos alveolares comparado ao GC (a).

#### 4.4.4 Avaliação da proporção de fibras elásticas no parênquima pulmonar

A proporção de fibras elásticas nos parênquima pulmonar mostrou valores percentuais médios de  $39,530 \pm 1,415$  para o GC,  $39,500 \pm 2,089$  para o G70,  $39,480 \pm 2,143$  para o G140 e  $35,940 \pm 3,563$  para o G210, não sendo observada diferença estatisticamente significativa na comparação entre grupos (figura 16).

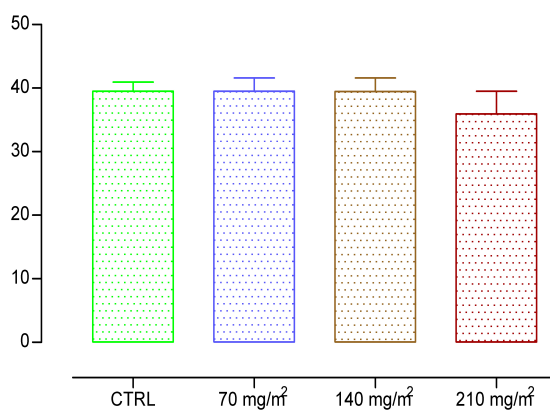


Figura 15: *Proporção de fibras elásticas no parênquima pulmonar de animais submetidos à aplicação única de docetaxel.*

A figura 24 demonstra o aspecto microscópico das fibras elásticas pela coloração RF no MO.

#### 4.4.5 Avaliação da proporção de fibras elásticas na vasculatura pulmonar

A proporção de fibras elásticas nos vasos pulmonares mostrou valores percentuais médios de  $0,333 \pm 0,009$  para o GC,  $0,297 \pm 0,015$  para o G70,  $0,316 \pm 0,007$  para o G140 e  $0,321 \pm 0,011$  para o G210, não sendo observada diferença estatisticamente significativa na comparação entre grupos ( $p=0.147$ ) (figura 16).

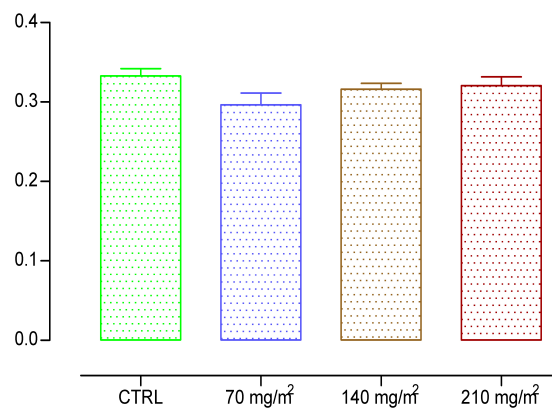


Figura 16: Comparação entre a proporção de fibras colágenas na vasculatura pulmonar de animais submetidos à aplicação única de docetaxel.

A figura 24 demonstra o aspecto microscópico das fibras elásticas pela coloração RF no MO.

#### 4.4.6 Avaliação de celularidade

Não foram observadas diferenças entre o GC e o G70. Nos grupos expostos a doses mais altas (G140 e G210), observamos aumento significativo no grau de inflamação intersticial, composta principalmente por células mononucleares. Os valores aferidos para células mononucleares foram  $20,240 \pm 2,785$  para o GC,  $32,130 \pm 2,202$  para o G70,  $37,520 \pm 3,807$  para o G140 e  $36,440 \pm 2,077$  para o G210. A tabela 4 resume a comparação entre os grupos GC, G70, G140 e G210, para os quais foi encontrado resultado significativo ( $p < 0.0001$ ).

Ainda, doses mais altas apresentaram maior quantidade de células mononucleares infiltrando o parênquima pulmonar, sugerindo relação de proporcionalidade entre a dose de docetaxel e o grau de infiltração celular no parênquima pulmonar (figura 17).



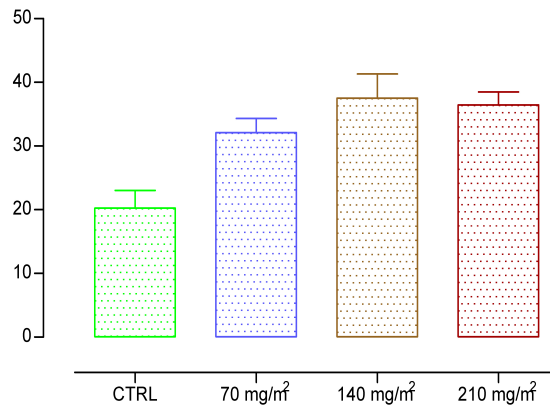


Figura 17: Comparação entre a proporção de infiltração pulmonar por células mononucleares em animais submetidos à aplicação única de docetaxel.

\* $p < 0.0001$ , demonstrando proporcionalidade entre infiltração celular mononuclear no interstício pulmonar e a dose de aplicação do docetaxel.

As fotos abaixo mostram a intensa infiltração celular observada no interstício pulmonar (figura 18)

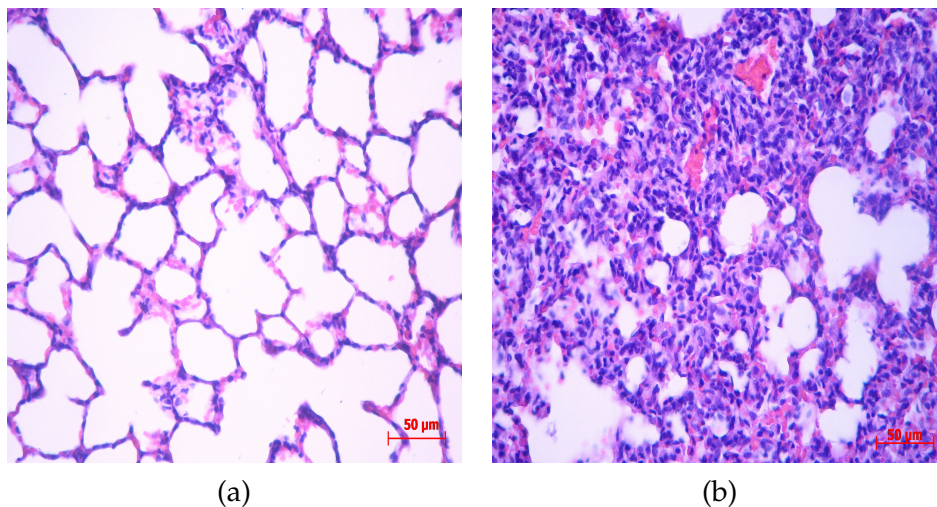


Figura 18: Lâmina de pulmão comparando infiltrado intersticial no GC e no G210 (coloração HE, 40x).

O G210 (b) apresenta intensa infiltração do interstício pulmonar por células mononucleares, comparado ao GC (a).

Em relação à avaliação da infiltração por PMN, não observamos diferenças em nenhum dos grupos em relação ao controle ( $p > 0.05$ ), sendo raramente observada a existência deste tipo celular no interstício pulmonar. Os resultados foram desconsiderados por não

serem representativos.

#### 4.4.7 Edema Alveolar

Todos os grupos apresentaram diferença significativa em relação ao controle e, ainda, foi observada proporcionalidade entre a quantidade percentual de alvéolos alterados com a dose administrada do quimioterápico docetaxel. Os valores observados foram: G70 -  $1,899 \pm 0,124$ ; G140 -  $2,585 \pm 0,200$ ; G210 -  $3,300 \pm 0,261$  e GC -  $0,782 \pm 0,087$ . A tabela 4 resume a comparação entre os grupos GC, G70, G140 e G210, para os quais foi encontrado resultado significativo ( $p < 0.0001$ ).

A figura 19 representa graficamente a relação proporcional entre a dose de aplicação do docetaxel e a quantidade de edema intra-alveolar observada.

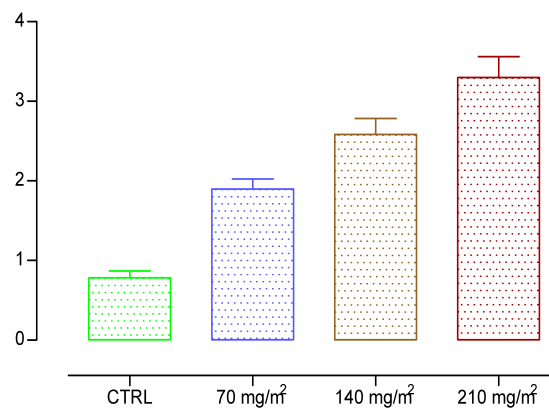


Figura 19: Comparação entre a proporção de alvéolos com edema intra-alveolar de animais submetidos à aplicação única de docetaxel.

A análise estatística entre grupos foi significativa ( $p < 0.0001$ ) demonstrando proporcionalidade entre a quantidade de edema intra-alveolar e a dose de aplicação do docetaxel.

As fotos abaixo demonstram a maior quantidade de edema intra-alveolar nos grupos expostos ao docetaxel (figura 20)

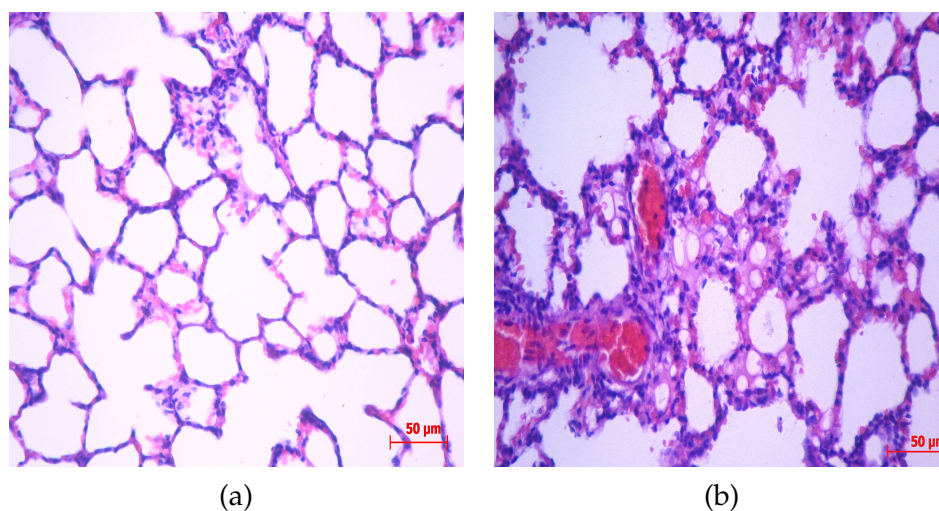


Figura 20: Lâmina de pulmão comparando edema intra-alveolar no GC e no G210 (coloração HE, 40x).

O G210 (b) apresenta considerável presença de edema intra-alveolar com alguns focos de hemorragia, comparado ao GC (a).

#### 4.4.8 Índice de edema peri-vascular (IEPV)

O IDPV não apresentou variação significativa ou proporcional entre grupos. As medidas médias foram: G70 -  $0,610 \pm 0,031$ ; G140 -  $0,645 \pm 0,018$ ; G210 -  $0,910 \pm 0,017$  e GC -  $0,661 \pm 0,029$ . A figura 22 demonstra a análise dos grupos, sem diferença estatística ( $p=0.152$ ).

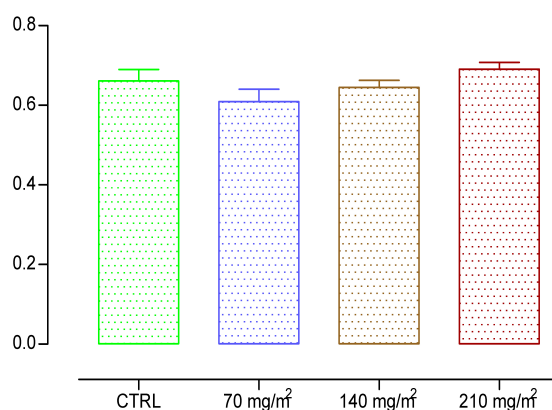


Figura 21: Comparação do índice de edema peri-vascular, de animais submetidos à aplicação única de docetaxel\*.

\*Não foi observada diferença significativa na comparação entre grupos ( $p=152$ ).

#### 4.4.9 Diâmetro Alveolar Médio ( $L_M$ )

O  $L_M$  apresentou variação significativa ou proporcional entre grupos. As medidas médias, em  $\mu\text{m}$  foram: G70 -  $1,102 \pm 0,009$ ; G140 -  $1,137 \pm 0,016$ ; G210 -  $1,101 \pm 0,009$  e GC -  $1,143 \pm 0,010$ . A figura 22 demonstra a análise dos grupos, com diferença estatística ( $p=0.014$ ).

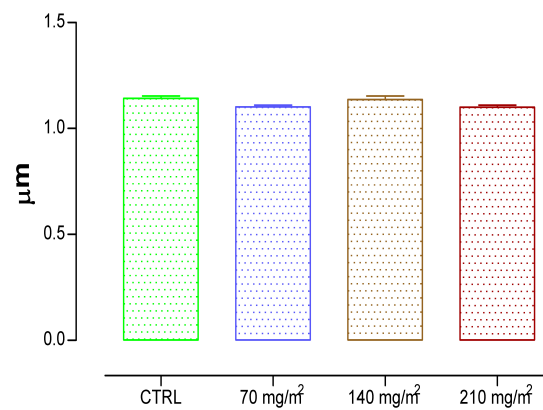


Figura 22: Comparação do diâmetro alveolar médio, em  $\mu\text{m}$ , de animais submetidos à aplicação única de docetaxel\*.

\*Foi observada diferença significativa na comparação entre grupos ( $p=0.014$ ).

#### 4.4.10 Diâmetro interno das vias aéreas (DI)

O DI não apresentou variação significativa ou proporcional entre grupos. As médias médias, em  $\mu\text{m}$  foram: G70 -  $17,130 \pm 1,094$ ; G140 -  $15,310 \pm 1,607$ ; G210 -  $19,170 \pm 1,276$  e GC -  $15,110 \pm 1,873$ . A figura 23 demonstra a análise dos grupos, sem diferença estatística ( $p=0.175$ ). Ainda, vale ressaltar que o G210 apresentou maior DI (dilatação), sendo compatível com os dados obtidos pela avaliação das propriedades mecânicas do sistema respiratório (observar figura 7).

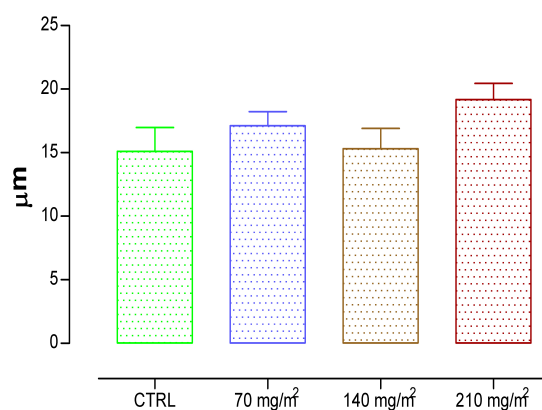


Figura 23: Análise comparativa do diâmetro interno de vias aéreas (em  $\mu\text{m}$ ), de animais submetidos à aplicação única de docetaxel\*.

\*Não houve diferença significativa na comparação entre grupos ( $p=0.175$ ).

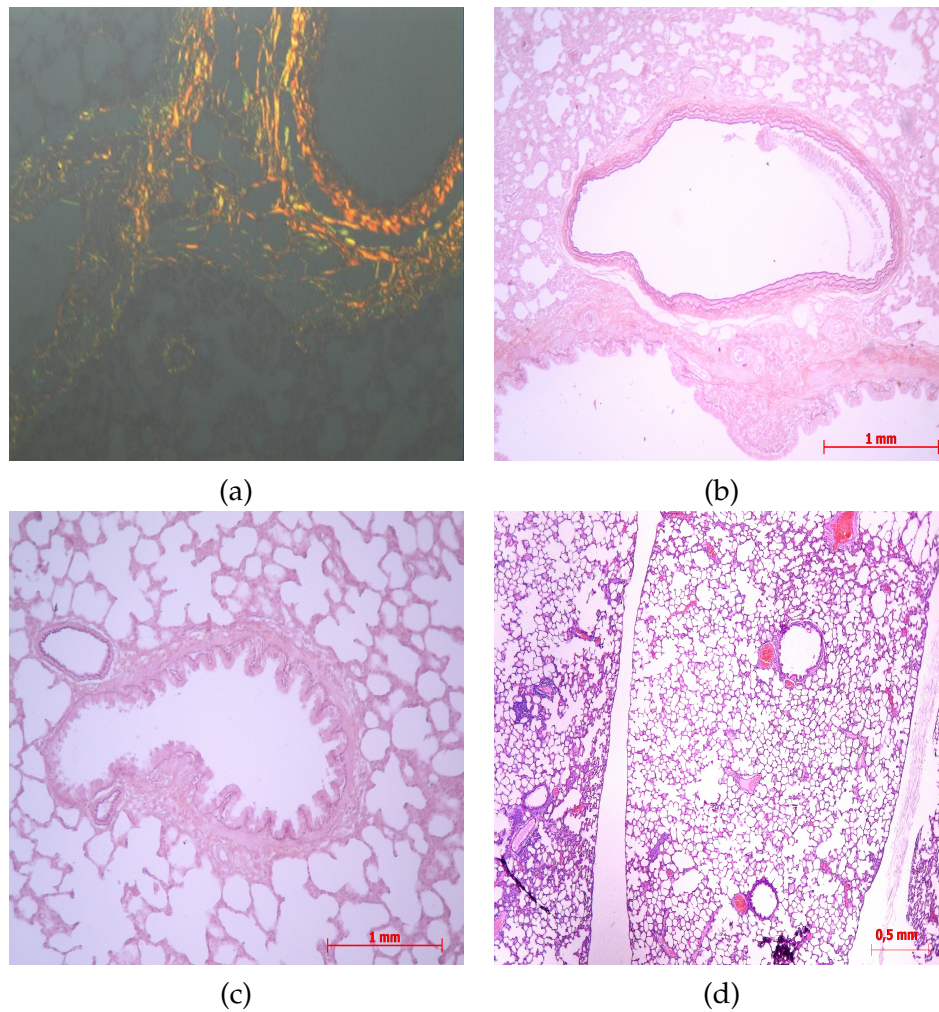


Figura 24: *Aspecto das diversas colorações realizadas no pulmão de ratos expostos ao docetaxel no microscópio óptico*

Em (a) observa-se o aspecto do colágeno vascular sob a luz polarizada (PCS, 40x). Em (b) observa-se o aspecto das fibras elásticas no vaso normal (RF, 40x). Em (c) observa-se o aspecto das fibras elásticas em um brônquio normal (RF, 40x). Em (d), observa-se um pulmão normal de rato Wistar no MO (HE, 10x).

## 4.5 Resumo dos achados histológicos

Os resumo da análise histológica, por morfometria, dos pulmões de ratos *Wistar* tratados com diferentes doses de docetaxel por via i.p., encontra-se descrito na tabela 4. Foram encontradas alterações na proporção de fibras colágenas nos septos alveolares (PP), na infiltração do interstício pulmonar por células mononucleares, no índice de edema alveolar, todos sugerindo proporcionalidade entre o grau de lesão pulmonar e a dose de docetaxel injetada.

Tabela 4: Resumo das principais alterações histológicas encontradas em pulmões de ratos *Wistar* submetidos a injeção única de docetaxel por via intra-peritoneal.

Variáveis Morfométricas	Grupo Controle		G70		G140		G210		p**
	N = 10	Média ± EP	N = 10	Média ± EP	N = 9	Média ± EP	N = 11	Média ± EP	
Proporção de fibras colágenas PP	0,065 ± 0,015	0,065 ± 0,015	1,256 ± 0,227	1,041 ± 0,206	3,379 ± 0,525	3,379 ± 0,525	3,379 ± 0,525	3,379 ± 0,525	<0,0001 <sup>c,d,e</sup>
Proporção de fibras colágenas VP	3,489 ± 1,164	3,489 ± 1,164	5,852 ± 1,289	5,394 ± 0,962	8,758 ± 1,938	8,758 ± 1,938	8,758 ± 1,938	8,758 ± 1,938	0,149
Razão superfície-volume	9,116 ± 0,333	9,116 ± 0,333	8,545 ± 0,200	8,559 ± 0,246	7,887 ± 0,137	7,887 ± 0,137	7,887 ± 0,137	7,887 ± 0,137	0,007
Proporção de fibras elásticas PP	39,530 ± 1,415	39,530 ± 1,415	39,500 ± 2,089	39,480 ± 2,143	35,940 ± 3,563	35,940 ± 3,563	35,940 ± 3,563	35,940 ± 3,563	0,996
Proporção de fibras elásticas VP	0,333 ± 0,009	0,333 ± 0,009	0,297 ± 0,015	0,316 ± 0,007	0,321 ± 0,011	0,321 ± 0,011	0,321 ± 0,011	0,321 ± 0,011	0,147
Infiltração de MN	20,240 ± 2,785	20,240 ± 2,785	32,130 ± 2,202	37,520 ± 3,807	36,440 ± 2,077	36,440 ± 2,077	36,440 ± 2,077	36,440 ± 2,077	<0,0001 <sup>a,b,c</sup>
Edema alveolar	0,782 ± 0,087	0,782 ± 0,087	1,899 ± 0,124	2,585 ± 0,200	3,300 ± 0,261	3,300 ± 0,261	3,300 ± 0,261	3,300 ± 0,261	<0,0001 <sup>a,b,c,e,f</sup>
IEPV	0,661 ± 0,029	0,661 ± 0,029	0,610 ± 0,031	0,645 ± 0,018	0,910 ± 0,017	0,910 ± 0,017	0,910 ± 0,017	0,910 ± 0,017	0,152
Diâmetro alveolar médio (µm)	1,143 ± 0,010	1,143 ± 0,010	1,102 ± 0,009	1,137 ± 0,016	1,101 ± 0,009	1,101 ± 0,009	1,101 ± 0,009	1,101 ± 0,009	0,014 <sup>c</sup>
Diâmetro interno das vias aéreas (µm)	15,110 ± 1,873	15,110 ± 1,873	17,130 ± 1,094	15,310 ± 1,607	19,170 ± 1,276	19,170 ± 1,276	19,170 ± 1,276	19,170 ± 1,276	0,175

EP - Erro padrão; NS - Não significante; PP - Parênquima pulmonar; VP - Vasculatura pulmonar; MN - Mononucleares; IEPV - Índice de edema peri-vascular; µm - micrômetros

\*\*Comparação entre grupos com significância (pós-teste): a = (GC x G70); b = (GC x G140); c = (GC x G210); d = (G70 x G140); e = (G70 x G210); f = (G140 x G210); & = pós-teste não foi capaz de definir diferença entre grupos.



## 5 Discussão

### 5.1 Considerações gerais

Os modelos animais experimentais devem aproximar-se da prática clínica. O acompanhamento do peso é muito importante em pacientes oncológicos. A literatura é vasta em demonstrar a relação entre massa corpórea e toxicidade relacionada à quimioterapia.<sup>53,54,55,56,57</sup> Ainda, sabe-se que a toxicidade dos quimioterápicos é diferente para cada órgão e tecido corporal e está relacionada à dose administrada,<sup>58,59</sup> sendo comum menor ganho ponderal em esquemas mais agressivos de quimioterapia.<sup>59</sup> Este estudo observou que animais tratados com doses mais altas de docetaxel apresentaram menor ganho ponderal, observação perfeitamente compatível com a literatura médica existente.

A toxicidade do tratamento com docetaxel está relacionada à dose utilizada, podendo haver alta mortalidade com doses elevadas.<sup>60</sup> Estes efeitos foram observados. Houve morte de 2 animais; um exposto à dose de 140 mg/m<sup>2</sup> e outro à dose de 210 mg/m<sup>2</sup>. Importante observar que os animais expostos a doses usuais de docetaxel não apresentaram mortalidade e obtiveram maior ganho ponderal, comprovando experimentalmente a relação da mortalidade com a dose de exposição do taxane.

Antes de prosseguir faz-se necessário abordar alguns pontos sobre a anatomia normal e elementos celulares do interstício pulmonar. Este normalmente é composto por fibras reticulares, fibras elásticas e fibras colágenas, sendo esta última importante estrutura do arcabouço da matriz extracelular,<sup>61</sup> que ainda é composta por outros elementos proteicos e polissacarídeos, como proteoglicanos e glicosaminoglicanos ("ground elements"<sup>62</sup>). O revestimento epitelial dos alvéolos é formado por células especializadas, denominadas pneumócitos tipo I e II. Ainda, uma rede densa de capilares faz contato com toda a superfície

alveolar, sendo que as lâminas basais do epitélio (pneumócito tipo I) e do endotélio vascular podem fundir-se.<sup>63</sup>

O pulmão, por ser uma estrutura que necessita de elasticidade (elastância) para desempenhar sua função, possui uma delicada relação entre fibras elásticas e colágeno em sua estrutura de sustentação, estando este último usualmente presente como uma malha de fibras esparsas.<sup>62</sup> A fisiologia torna-se ainda mais complexa ao serem levadas em consideração a presença do surfactante (áreas molhadas e secas) e a estrutura de inter-dependência alveolar.<sup>63,62</sup> O conjunto de todos os elementos do parênquima pulmonar - células, matriz extra-celular, elementos proteicos, micro e macro-vasculares e suas interações físicas - é que determinam as propriedades fisiológicas e mecânicas do pulmão normal.

## 5.2 Relação PL/PS

O primeiro parâmetro utilizado na avaliação da toxicidade pulmonar induzida pelo docetaxel foi a relação PL/PS. Usualmente, esta relação serve para mensuração do grau de edema associado ao tecido (no caso, pulmonar) e pode estar alterada na toxicidade tecidual aguda.<sup>64</sup> Este estudo não foi capaz de demonstrar diferença na relação PL/PS, embora, à primeira vista contraditoriamente, tenha observado o acúmulo significativo de edema intra-alveolar entre os grupos (vide tabela 4). A provável explicação deve residir no momento, após a aplicação do docetaxel, em que foram realizadas as medidas morfométricas. É possível que o docetaxel induza alterações agudas no tecido pulmonar, as quais poderiam estar em resolução após 28 dias. Manali *et al*<sup>65</sup> demonstraram experimentalmente que os elementos presentes na inflamação pulmonar aguda induzida pela bleomicina não estão presentes - ou pelo menos estão muito diminuídos - quando do aumento da quantidade de colágeno no interstício pulmonar. Este achado poderia ser análogo à lesão produzida pelos taxanes. Ou

seja, é plausível que houvesse maior edema intra-alveolar logo após a aplicação do docetaxel. Esta observação é compatível com o fato que taxanes são capazes de induzir lesão endotelial após aplicação endovenosa e gerar edema.<sup>66,67</sup>

### 5.3 Correlação entre as propriedades mecânicas do sistema respiratório e os achados histológicos

A análise das propriedades mecânicas do sistema respiratório dos animais demonstrou queda significativa das  $E_{st,cw}$ ,  $E_{dyn,cw}$  e  $R_{cw}$ . Ainda, mesmo que não significativo, foi observada queda  $R_{sr}$ . As alterações na elastância  $cw$  podem representar possíveis alterações na musculatura respiratória inter-costal. Este resultado foi mensurado após o estudo experimental, sendo que sua análise não fazia parte do delineamento inicial, que visava avaliar as alterações no parênquima pulmonar induzidas pela droga. A miosite associada ao docetaxel foi descrita pela primeira vez em 2005<sup>68,69</sup> e, embora seja considerada complicação rara, poderia ser uma explicação plausível. Novos estudos, com delineamento específico, seriam necessários para avaliar o possível comprometimento da musculatura inter-costal após uso do docetaxel, uma vez que inexistem qualquer modelo experimental para avaliação da miosite induzida por taxane.

Ainda, chama a atenção o fato de serem observadas alterações intersticiais irreversíveis (principalmente representado pelo acúmulo de colágeno no intersício pulmonar) e a relação com as alterações na mecânica do sistema respiratório. Na realidade, a correlação entre eventuais alterações histológicas e alterações na mecânica pulmonar dependem da intensidade da lesão, aguda ou crônica. O asbesto, por exemplo, é capaz de produzir lesão (histológica e mecânica) nos pulmões de hamsters, mensuráveis 24 horas após administração intra-traqueal, principalmente por causa da lesão inflamatória aguda produzida por esta

substância.<sup>70</sup>

Comparativamente, a bleomicina, utilizada em modelos para estudo de fibrose pulmonar idiopática, é capaz de induzir lesão com alteração da mecânica pulmonar em camundongos, somente após 21 dias da instilação por via intra-traqueal, quando a concentração tecidual total de colágeno ultrapassa os 300 microgramas (valores 3 vezes acima do controle).<sup>65</sup> Ou seja, alterações mensuráveis à histologia podem, ou não, ter relação com alterações nas propriedades mecânicas do sistema respiratório, a depender do seu tipo, quantidade e intensidade.

As observações em estudos clínicos são ainda mais curiosas. Doenças como fibrose pulmonar idiopática são consideradas progressivas e fatais. Entretanto, pouco se sabe sobre a correlação entre suas alterações histológicas e mecânicas.<sup>71,72</sup> Claro que simploriamente poder-se-ia afirmar que a simples presença ou não de colágeno ou fibras elásticas, em maior ou menor quantidade, seria o fator responsável pelas alterações eventualmente observadas nas propriedades mecânicas do sistema respiratório de pacientes com fibrose idiopática. Entretanto, esta explicação seria muito superficial.

Na realidade, a elastância e resistência do sistema respiratório dependem de, pelo menos, quatro fatores distintos: a quantidade de fibras elásticas, a quantidade de colágeno, a malha total de fibras conectivas (incluindo proteoglicanos e glicosaminoglicanos) e a quantidade de células intersticiais.<sup>73,74</sup> Grosseiramente, as fibras elásticas são responsáveis pela elastância e as fibras colágenas são responsáveis pela resistência. Por óbvio que existe relação entre a quantidade de fibras elásticas e colágenas com a mecânica do sistema respiratório,<sup>75</sup> entretanto a complexidade da fisiologia respiratória e de seus elementos não poderia ser resumida por esta simples assertiva. Esta complexidade foi demonstrada por Yuan *et al*<sup>76</sup> que observaram diminuição da elastância pulmonar após digestão de fibras elásticas e colá-

genas, demonstrando a importância da matriz extra-celular nas propriedades mecânicas do pulmão.

A dinâmica entre estes componentes é que poderia ser responsável, em parte, pela dinâmica da mecânica do sistema pulmonar. Ainda, e talvez mais importante, o comportamento da  $E_{st}$ ,  $E_{dyn}$  dependem da interação destes fatores, junto com elementos da matriz extra-celular. Diversas teorias tentam explicar como estes relacionam-se, tanto em nível molecular, como em nível macroscópico. Aparentemente, a interação da malha colágeno-elastina-proteoglicano parece ser o principal elemento que transfere as características visco-elásticas e de histerese ao sistema respiratório<sup>77</sup> e não simplesmente a concentração absoluta de fibras colágenas.<sup>78</sup> Claro que diversos outros mecanismos tentam trazer luz à complexa fisiologia pulmonar, como por exemplo a conformação espacial das proteínas da matriz extra-celular e a ação "lubrificante" que os proteoglicanos e glicosaminoglicanos exercem sobre a malha colágeno-elastina.<sup>78,79</sup>

Além, pouco se conhece sobre as relações que interações moleculares do tecido pulmonar possuem sobre a dinâmica macroscópica do sistema respiratório e sobre seu remodelamento.<sup>62</sup> Acredita-se que pequenas moléculas proteicas à base de leucina - conhecidas como decorinas - são responsáveis pela interação entre o colágeno e a matriz extracelular de proteoglicanos,<sup>80,81</sup> que por sua vez, e através da interação com o fator de transformação- $\beta$ , seriam responsáveis pelo sistema de controle de remodelamento do interstício pulmonar.<sup>82</sup> Ainda, sabe-se que no processo de remodelamento pulmonar existe alteração tanto em fibras colágenas, como em fibras elásticas, em diferentes proporções.<sup>62</sup> Neste estudo não foram observadas alterações na quantidade de fibras elásticas do parênquima pulmonar de ratos expostos ao docetaxel, podendo ser plausível que a simples variação da concentração colágena, embora significativa, não seja fator suficiente para trazer quaisquer alterações

funcionais bem definidas. Assim sendo, não é totalmente inesperado que, embora tenham sido observadas diversas alterações microscópicas (histológicas) no parênquima pulmonar destes animais, poucas alterações puderam ser definidas do ponto de vista da mecânica do sistema respiratório. É possível que a exposição contínua ao docetaxel possa levar a um maior grau de lesão e que essas alterações eventualmente possam ter repercussões mais claras à mecânica, lembrando que toda a literatura confirma que os casos reportados de pneumonia induzida por taxane acontecem após múltiplas exposições a quimioterápicos ou após múltiplas aplicações de docetaxel.<sup>25,28</sup> Ainda mais, restaria necessário entender eventuais impactos do docetaxel nos elementos da matriz extra-celular do interstício pulmonar para poder-se formular alguma teoria sobre uma fisiologia tão complexa.

Em relação à queda da  $R_{sr}$ , foi observado um aumento do DI (figura 23). Devemos lembrar que a resistência ao fluxo em sistemas tubulares é regida pela lei de Poiseuille,<sup>63</sup> conforme:

$$R = \frac{8\eta l}{\pi r^4} \quad (16)$$

Onde:  $R$  = resistência,  $\eta$  = viscosidade,  $l$  = comprimento do tubo e  $r$  = raio.

Observe-se que alterações pouco significativas no raio de um tubo podem ser capazes de produzir grandes alterações na resistência ao fluxo em seu interior, positiva ou negativamente. Neste estudo foi observado aumento do diâmetro interno das vias aéreas nos grupos submetidos a doses mais altas de docetaxel. Assim, esta alteração explica de forma anatômica a diminuição aferida na resistência nas vias aéreas.

O docetaxel está associado a pneumonia, com incidência sugerida em até 10% dos pacientes,<sup>25,26</sup> existindo, inclusive, casos relatados de bronquiolite obliterante (BOOP).<sup>83</sup> O

curioso é que inexistem dados concretos sobre este tipo de complicação. Todo o conhecimento advem de relatos de caso ou da observação clínica. O primeiro dado importante observado neste estudo diz respeito à incidência de alterações pulmonares induzidas pelo docetaxel. Foi visto que 90% dos animais tratados com doses consideradas usuais ( $70\text{mg}/\text{m}^2$ ) apresentavam alterações inflamatórias ou na concentração do colágeno, chegando a 100% em doses mais altas. Isto pode sugerir que a lesão pulmonar induzida por esta droga possa ser muito mais comum do que reportado na prática clínica, sobretudo levando-se em consideração que os animais aqui estudados foram submetidos a uma única aplicação do quimioterápico.

A análise da histologia demonstrou intenso infiltrado mononuclear nos interseptos alveolares. Ainda, foi observado pequena quantidade de edema alveolar (já discutida anteriormente) e alteração na RSV. Todos estes dados são absolutamente compatíveis com pneumonia intersticial. A RSV demonstra que houve aumento da espessura dos septos alveolares em animais tratados com doses altas de docetaxel, o que demonstra as características morfométricas da pneumonia induzida pelo docetaxel: espessamento do intersepto alveolar por infiltrado de células mononucleares, edema intra-alveolar e depósito de colágeno no interstício pulmonar, com quase ausência de infiltração de células polimorfonucleares. Estas características, recriadas experimentalmente, foram descritas em humanos em alguns relatos de caso.<sup>25,30,83,84</sup>

Observe-se que a presença disseminada de colágeno, necessariamente, representa alteração da estrutura normal do órgão. Na literatura, existem relatos de casos isolados que mostram fibrose pulmonar em pacientes que foram submetidos a quimioterapia com docetaxel.<sup>84</sup> Entretanto, pelo fato destes pacientes serem poli-tratados e haverem permanecidos intubados por período prolongado, tornar-se-ia difícil conseguir fazer uma associação direta entre droga e lesão pulmonar, uma vez que a própria intubação prolongada é capaz

de produzir lesão pulmonar, mesmo em pacientes sem lesão pulmonar prévia.<sup>85,86,87</sup>

Este estudo foi capaz de mostrar alguns aspectos importantes. Em primeiro lugar, o docetaxel foi capaz de causar dano tecidual pulmonar em doses terapêuticas. A presença de colágeno no parênquima pulmonar dos animais do G210, em valores significativamente acima do grupo controle, demonstra este evento de forma clara. Ainda, foi observada proporcionalidade entre o grau da lesão no interstício pulmonar e a dose administrada da droga, o que torna os achados biologicamente plausíveis. Mais, foram observadas, de forma significativa, proporcionalidade na RSV, no índice de edema alveolar e celularidade, dados que demonstram aumento da espessura dos septos alveolares, principalmente por infiltração de células mononucleares e edema intra-alveolar. Estes elementos reforçam o significado das alterações na quantidade de colágeno observada. Estas observações são curiosas por vários motivos.

Em primeiro lugar, a exposição ao docetaxel foi única e sem nenhuma associação medicamentosa. Contrariamente, a literatura existente reporta alteração pulmonar clinicamente detectável (pneumonia) após várias aplicações ou em tratamentos com associação de quimioterápicos.<sup>28,29,30,41,42,83</sup>

Em segundo lugar, não se pode deixar de questionar a possibilidade de cronificação das alterações histológicas encontradas no sistema respiratório após múltiplas exposições a esta droga, tal como reportado alhures para outros quimioterápicos.<sup>24</sup> Sob este prisma, a continuidade do conhecimento através de outros estudos experimentais ou através de estudos populacionais em humanos torna-se-ia absolutamente necessária.



## 5.4 Hipótese para o mecanismo da lesão pulmonar

Algumas hipóteses são descritas para o mecanismo da lesão pulmonar induzida pelo docetaxel. A própria presença de edema intra-alveolar pode revelar, ao menos, uma parte do mecanismo responsável, sendo explicado, simplificada, pela equação de *Starling*,<sup>63</sup> que diz:

$$\dot{Q}_f = K_f[(P_c - P_{is}) - \sigma(\pi_{pl} - \pi_{is})] \quad (17)$$

Onde:  $\dot{Q}_f$  = fluxo do fluido;  $K_f$  = coeficiente de filtração capilar;  $P_c$  = pressão hidrostática capilar;  $P_{is}$  = pressão hidrostática do fluido intersticial;  $\sigma$  = coeficiente de reflexão;  $\pi_{pl}$  = pressão coloido-osmótica do plasma e  $\pi_{is}$  = pressão coloido-osmótica intersticial.

Em outras palavras, os prováveis mecanismos de edema pulmonar decorrem de alterações na pressão hidrostática capilar ou intersticial, de alterações de permeabilidade a solutos (alteração do  $\sigma$ ), de diferenças nas pressões proteicas do plasma ou interstício ou de deficiência de drenagem linfática. Em nosso modelo, dois mecanismos poderiam explicar a presença de edema intra-alveolar pulmonar: a insuficiência de drenagem linfática por substituição colágena e/ou aumento da permeabilidade capilar por efeito citotóxico direto.

## 5.5 Críticas ao estudo

Uma crítica importante que pode ser feita é que o delineamento do trabalho procurou estabelecer lesão pulmonar com a maior dose não letal da droga. Esta estrutura não reflete exatamente o uso clínico do docetaxel, que usualmente é utilizado em doses menores e

por vários ciclos. Assim, seria necessário um novo trabalho para avaliar quais efeitos cumulativos possuiria o docetaxel sobre o parênquima pulmonar, ou seja, doses cumulativas com menor miligramagem são igualmente danosas a uma única aplicação da droga com maior miligramagem?

Na prática, o docetaxel é aplicado conjuntamente a um corticoesteróide (usualmente a dexametasona), pois o mesmo é capaz de produzir síndrome de retenção hídrica por provável lesão vascular endotelial.<sup>66,67</sup> Por óbvio, fazer-se-ia necessário avaliar se a presença de um corticóide seria capaz de inibir as alterações observadas no parênquima pulmonar. Este questionamento surge ao entender a complexa fisiologia pulmonar normal, tanto molecular como tecidual, e as eventuais interações do corticóide com elementos da matriz extra-celular. Vários estudos sugerem que deva existir esta interação e que possa ser importante.<sup>88,89</sup> Seria esse o motivo da incidência clínica de pneumonia induzida por docetaxel ser de 10% e este estudo ter demonstrado alteração histológica praticamente em todos os animais? Mesmo sabendo-se da complexidade em correlacionar histologia com função, deve-se levantar tal questionamento. Isso fica ainda mais evidente ao analisar a literatura médica reportando o uso de corticóide como forma de tratamento da pneumonia induzida por taxane.<sup>90,91</sup>

Outro elemento que deve ser discutido é o método de quantificação do colágeno aqui utilizado. Uma forma bem grosseira de divisão do colágeno é: 1) colágeno maduro e 2) colágeno imaturo. O colágeno maduro é aquele presente usualmente na estrutura e composição normal do tecido sadio. O imaturo corresponderia ao colágeno neossintetizado após o processo de remodelamento tecidual.<sup>92</sup>

Na literatura existem várias formas aceitas para quantificação desta proteína, alguns mais novos e complexos.<sup>92,93,94,95,96,97</sup> Basicamente, existem duas formas de analisar o conteúdo colágeno de um tecido: 1) por diluição ácida ou 2) por diluição neutra. A forma mais

comum é realizada através da dosagem de hidroxiprolina, que chega a compor 13,5% do colágeno, em diluição ácida.<sup>97</sup> Entretanto, até 5% do colágeno pulmonar não poderiam ser avaliados por este método.<sup>61</sup> Outra alternativa é fazer a medida pelo método do corante Sirius vermelho, utilizando a luz polarizada para medição, conforme idealizada por Junqueira et al.<sup>94</sup> Este método tem por base a ligação do corante no complexo [Gly-x-y] presente na tripla hélice de todas as fibras colágenas, de todos os subtipos.<sup>98</sup>

A crítica a este último é a falta de especificidade na determinação do subtipo do colágeno estudado, inclusive pela falta de dissociação tecidual, não podendo ser definido se a medida corresponde, ou não, ao colágeno neossintetizado (colágeno imaturo). Outro problema é que inexistem estudos comparando os métodos de análise quantitativa e qualitativa, o que torna a comparação entre trabalhos muito difícil e, analogamente, deste estudo experimental com outros.

Por tudo acima explicado, fica claro que este trabalho não encerra o estudo da ação dos taxanes sobre o parênquima e arquitetura pulmonares. Se por um lado, precisa-se estudar se a lesão induzida pelo docetaxel após várias aplicações em doses baixas são ou não equivalentes à aplicação em uma dose única de maior intensidade, de forma a aproximar ao máximo, o formato do estudo experimental à prática clínica, por outro lado é necessário entender se o uso do corticóide seria capaz de prevenir as lesões originadas pelo uso do docetaxel, uma vez que, conforme discutido, o remodelamento pulmonar depende de uma complexa rede de interações entre elementos celulares e da matriz extra-celular e o próprio corticóide possui influência sobre esta última. Talvez a resposta a todas estas perguntas surja do completo entendimento da bioquímica da fisiologia pulmonar.

Este é o primeiro estudo experimental a demonstrar que o docetaxel é capaz de produzir pneumonite intersticial e aumento do colágeno no parênquima pulmonar após

---

aplicação intra-peritoneal. Ainda, é a primeira vez que foi demonstrada relação de proporcionalidade direta entre a dose aplicada de docetaxel e a quantidade histológica de alterações pulmonares mensuráveis.

## 6 Conclusão

1. O docetaxel aplicado em dose única, por via i.p., alterou as propriedades mecânicas e histológicas do sistema respiratório de ratos *Wistar*.
2. A lesão pulmonar induzida pelo uso de docetaxel foi diretamente proporcional à dose aplicada por via i.p.
3. O docetaxel aplicado em dose única, por via i.p., induziu lesão pulmonar (pneumonia intersticial), caracterizada por aumento do depósito de fibras colágenas nos septos alveolares, infiltração intersticial de células mononucleares, espessamento septal alveolar e edema intra-alveolar. O estudo não foi capaz de esclarecer o mecanismo fisiopatológico das alterações observadas.

## Referências

- [1] Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2012: incidência de Câncer no Brasil*. Inca, 2011.
- [2] Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, and Heanue M. *Cancer incidence in five continents*, volume 160. IARC scientific publications, 2007.
- [3] Wall ME and Wani MC. Camptothecin and taxol: Discovery to clinic - thirteenth Bruce f. Cain memorial award lecture. *Cancer Research*, 55(4):763–760, 1995.
- [4] Souza MVN. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Quim Nova*, 27(2):308–312, 2004.
- [5] Rowinsky EK. The taxanes: dosing and scheduling. *Oncology (Williston Park)*, 11(3 Suppl 2):7–19, Mar 1997.
- [6] Marchettini P, Stuart OA, Mohamed F, Too D, and Sugarbaker PH. Docetaxel: pharmacokinetics and tissue levels after intraperitoneal and intravenous administration in a rat model. *Cancer Chemother Pharmacol*, 49(6):499–503, Jun 2002.
- [7] Mohamed F, Stuart OA, and Sugarbaker PH. Pharmacokinetics and tissue distribution of intraperitoneal docetaxel with different solutions. *J Surg Res*, 113(1):114–120, Jul 2003.
- [8] Bruno R and Sanderik GJ. Pharmacokinetics and metabolism of taxotere (docetaxel). *Cancer Surveys*, 17:305–313, 1993.
- [9] Fossella FV, Lee JS, and Berille J. Summary of phase 2 data of docetaxel (taxotere), an active in the first- and second-line treatment of non-small-cell lung cancer. *Semin Oncol*, 22(2 suppl 4):22–29, 1995.
- [10] Kaye SB. Docetaxel in the treatment of solid tumors others than breast and lung cancer. *Semin Oncol*, 2(2):30–33, 1995.
- [11] Cortes JE and Pazdur R. Docetaxel. *J Clin Oncol*, 13(10):2643–2655, Oct 1995.

- [12] Osanto S and Van Poppel H. Emerging novel therapies for advanced prostate cancer. *The Adv Urol*, 4(1):3–12, Feb 2012.
- [13] Fujimoto N, Shiota M, Kubo T, and Matsumoto T. Novel therapeutic strategies following docetaxel-based chemotherapy in castration-resistant prostate cancer. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 3(6):785–795, Nov 2010.
- [14] Serpa Neto A, Tobias-Machado M, Kaliks R, Wroclawski ML, Pompeo AC, and Del Giglio A. Ten years of docetaxel-based therapies in prostate adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis of 2244 patients in 12 randomized clinical trials. *Clin Genitourin Cancer*, 9(2):115–123, Sep 2011.
- [15] Baker SD, Sparreboom A, and Verweij J. Clinical pharmacokinetics of docetaxel: recent developments. *Clin Pharmacokinet*, 45(3):235–252, 2006.
- [16] van Zuylen L, Verweij J, Nooter K, Brouer E, Stoter G, and Sparreboom A. Role of intestinal p-glycoprotein in the plasma and fecal distribution of docetaxel in humans. *Clin Cancer Res*, 6(7):2598–2603, Jul 2000.
- [17] Clarke SJ and Rivory LP. Clinical pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Pharmacokinet*, 36(2):99–114, Feb 1999.
- [18] Sparreboom A, van Tellingen O, Nooijen WJ, and Beijnen JH. Preclinical pharmacokinetics of paclitaxel and docetaxel. *Anticancer drugs*, 9(1):1–17, Jan 1998.
- [19] Li X, Wang C, Liu Y, Mei X, and Jin Y. Highly efficient and lowly toxic docetaxel nanoemulsions for intravenous injection to animals. *Pharmazie*, 66(7):479–483–503, Jun 2011.
- [20] Basile FG and Creamer S. Docetaxel/cyclophosphamide-induced ultraviolet recall dermatitis. *J Clin Oncol*, 29(34):e840–841, 2011.
- [21] Eckhoff L, Nielsen M, Moeller S, and Knoop A. Taxtox - a retrospective study regarding the side effects of docetaxel given as part of the adjuvant treatment to patients with primary breast cancer in denmark from 2007 to 2009. *Acta Oncol*, 50(7):1075–1082, Aug 2011.

- [22] Mouratis MA and Aidinis V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Curr Opin Pulm Med*, 17(5):481–489, Sep 2011.
- [23] Degryse AL and Lawson WE. Progress toward improving animal models for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Med Sci*, 341(6):444–449, Jun 2011.
- [24] O’Driscoll BR, Hasleton PS, Taylor PM, Poulter LW, Gattameneri HR, and Woodcock AA. Active lung fibrosis up to 17 years after chemotherapy with carmustine (bcnu) in childhood. *N Engl J Med*, 323(6):378–382, 1990.
- [25] Urakami S, Yoshino T, Kikuno N, Imai S, Honda S, Yoneda T, Kishi H, Shigeno K, Shiina H, and Igawa M. Docetaxel-based chemotherapy as second-line treatment for paclitaxel-based chemotherapy-resistant hormone-refractory prostate cancer: a pilot study. *Urology*, 65:543–548, 2005.
- [26] Vassilis G, Ardavanis A, Tsiafaki X, Agelidou A, Mixalopoulou P, Anagnostopoulou O, Ziotopoulos P, Toubis M, Syrigos K, Samaras N, Polyzos A, Christou A, Kakolyris S, Kouroussis C, Androulakis N, Samonis G, and Chatzidaki D. Vinorelbine plus cisplatin versus docetaxel plus gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: A phase 3 randomized trial. *J Clin Oncol*, 1:2937–2945, May 2005.
- [27] Hanna N, Neubauer M, Yiannoutsos C, McGarry R, Arseneau J, Ansari R, Reynolds C, Govindan R, Melnyk A, Fisher W, Richards D, Bruetman D, Anderson T, Chowhan N, Nattam S, Mantravadi P, Johnson C, Breen T, White A, and Einhorn L. Phase iii study of cisplatin, etoposide, and concurrent chest radiation with or without consolidation docetaxel in patients with inoperable stage 3 non–small-cell lung cancer: The hoosier oncology group and u.s. oncology. *J Clin Oncol*, 10:5755–5760, Dec 2008.
- [28] Dunsford ML, Mead GM, Bateman AC, Cook T, and Tung K. Severe pulmonary toxicity in patients treated with a combination of docetaxel and gemcitabine for metastatic transitional cell carcinoma. *Ann Oncol*, 10:943–947, 1999.
- [29] Goldberg HL and Vannice SB. Pneumonitis related to treatment with paclitaxel. *J Clin Oncol*, 13:534–535, 1995.



- [30] Morris MJ, Santamauro J, Shia J, Schwartz L, Vander ELs N, Kelly K, and Scher H. Fatal respiratory failure associated with treatment of prostate cancer using docetaxel and estramustine. *Urology*, 60:1111, 2002.
- [31] Song X, Varker H, Eichelbaum M, Stoper P, Shahidi M, Wilson K, Kaiser R, and Finnern HW. Treatment of lung cancer patients and concomitant use of drugs interacting with cytochrome p450 isoenzymes. *Lung Cancer*, 74(1):103–111, Mar 2011.
- [32] Bareschino MA, Schettino C, Rossi A, Malone P, Sacco PC, Zeppa R, and Gridell C. Treatment of advanced non small cell lung cancer. *J thorac Dis*, 3(2):122–123, Jun 2011.
- [33] Lazarou J, Pomeranz BH, and Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA*, 279(15):1200–1205, Apr 1998.
- [34] Rosenow EC and Limper AH. Drug-induced pulmonary disease. *Semin Respir infect*, 10(2):86–95, Jun 1995.
- [35] Schwarz MI and Fontenot AP. Drug-induced diffuse alveolar hemorrhage syndromes and vasculitis. *Clin Chest Med*, 25(1):133–140, 2004.
- [36] Greenspon AJ, Kidwell GA, Hurley W, and Mannion J. Amiodarone-related postoperative adult respiratory distress syndrome. *Circulation*, 84(5 Suppl):III407–415, 1991.
- [37] O'Donnell AE, Mappin FG, Sebo TJ, and Tazelaar H. Interstitial pneumonitis associated with "crack" cocaine abuse. *Chest*, 100(4):1155–1157, 1991.
- [38] Krous HF and Hamlin WB. Pulmonary toxicity due to bleomycin. report of a case. *Arch Pathol*, 95(6):407–410, 1973.
- [39] Balikian JP, Jochelson MS, Bauer KA, Sharkin AT, Garnik MB, and Canellos GP. Pulmonary complications of chemotherapy regimens containing bleomycin. *AJR Am Roentgenol*, 139, 1982.
- [40] Bellamy EA, Husband JE, Blaquiére RM, and Law MR. Bleomycin-related lung damage: Ct evidence. *Radiology*, 156(1):155–158, 1985.

- [41] Merad M, Cesne AL, Baldeyrou P, Mesurolle B, and Chevalier TL. Docetaxel and interstitial pulmonary injury. *Ann Oncol*, 8:191–194, 1997.
- [42] Gandara DR, Chansky K, Albain KS, Leigh BR, Gaspar LE, Lara Jr PN, Burris H, Gumerlock P, Kuebler JP, Bearden III JD, Crowley J, and Livingston R. Consolidation docetaxel after concurrent chemoradiotherapy in stage 3b non-small-cell lung cancer: Phase 2 southwest oncology group study s9504. *J Clin Oncol*, 15:2003–2004, May 2003.
- [43] Spector WS. *Handbook of toxicology: prepared under the direction of the Committee on the Handbook of Biological Data, Division of Biology and Agriculture, The National Academy of Sciences, the National Research Council, Volume 1*. Saunders, 1956.
- [44] Stork CR, Pinho AGM, Alves AAA, Melo-Silva CA, Gaio CE, and Tavares P. Análise da mecânica pulmonar em modelo experimental de sepse. *J Bras Pneumol*, 32(4):316–321, 2006.
- [45] Melo-Silva CA, Gaio E, Trevizoli JE, Caio SS, Gonçalves AS, Souza GCC, Takano G, Tavares P, and Amado VM. Respiratory mechanics and lung tissue remodeling in hepatopulmonary syndrome rat model. *Resp Physiol Neurobiol*, 179(15):326–333, Dec 2011.
- [46] Weigert C. Über eine methode zur farbung elastischer fasern. *Pathol Anat*, 9(6):289–292, 1898.
- [47] Bates JHT, Rossi A, and Milic-Emili J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. *J Appl Physiol*, 58(6):1840–1848, 1985.
- [48] Bates JHT, Baconnier P, and Milic-Emili J. A theoretical analysis of interrupter technique for measuring respiratory mechanics. *J Appl Physiol*, 64(5):2204–2214, 1988.
- [49] Iotti GA. *Monitorização da mecânica respiratória*. Atheneu, 2004.
- [50] Mortola JP and Noworaj A. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. *J Appl Physiol*, 55:250–253, 1983.

- [51] Gundersen H, Bendtsen T, Korbo L, Marcusen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard J, Pakkenberg B, Sorensen F, Vesterby A, and West M. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96:379–394, 1988.
- [52] Weibel ER. *Models of lung disease*. Marcel Dekker, 1990.
- [53] Grosvenor RD, Bulcavage L, and Chebowski RT. Symptoms potentially influencing weight loss in a cancer population. correlations with primary site, nutritional status and chemotherapy administration. *Cancer*, 63:330–334, 1989.
- [54] Andreyev HJN, Norman AR, Oates J, and Cunningham D. Why do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for gastrointestinal malignancies? *Eur J Cancer*, 34(4):503–509, Mar 1998.
- [55] Hess LM, Barakat R, Tian C, Ozols RF, and Alberts DS. Weight change during chemotherapy as a potential prognostic factor for stage 3 epithelial ovarian carcinoma: A gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol*, 107(2):260–265, 2007.
- [56] Gil KM, Frasura HE, Hopkins MP, Jenison EL, and von Gruenigen VE. Body weight and composition changes in ovarian cancer patients during adjuvant chemotherapy. *Gynecol Oncol*, 103(1):247–252, 2006.
- [57] Prado C, Antoun S, Sawyer MB, and Baracos VE. Two faces of drug therapy in cancer: drug-related lean tissue loss and its adverse consequences to survival and toxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 14(3):250–254, 2011.
- [58] Banfi A, Podestà M, Fazzuoli L, Sertoli MR, Venturini M, Santini G, Cancedda R, and Quarto R. High-dose chemotherapy shows a dose-dependent toxicity to bone marrow osteoprogenitors: a mechanism for post-bone marrow transplantation osteopenia. *Cancer*, 92(9):2419–2428, Jul 2001.
- [59] Tannock IF, Boyd G, DeBoer G, Erlichman C, Fine S, Larocque G, Mayers C, Perrault D, and Sutherland H. A randomized trial of two dose levels of cyclophosphamide,

- methotrexate and fluoruracil chemotherapy for patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 6(9):1377–1387, 1988.
- [60] Salminen E, Bergman S, Huhtala S, and Ekholm E. Docetaxel: Standard recommended dose of 100mg/m<sup>2</sup> is effective but not feasible for some metastatic breast cancer patients heavily pretreated with chemotherapy - a phase ii single-center study. *J Clin Oncol*, 1(4):1127, 1999.
- [61] Last JA and Reiser KM. Collagen biosynthesis. *Environ Health Perspect*, 55:169–177, 1984.
- [62] Faffe D and Zin WA. Lung parenchymal mechanics in health and disease. *Physiol Rev*, 89:759–775, 2009.
- [63] Levitzky MG. *Pulmonary physiology, seventh edition*. Lange, 2003.
- [64] Duninho SM, Martin J, Forster JS, Matthew B, Moran TS, Carpin LB, and Sciuto AM. Acute changes in lung histopathology and bronchoalveolar lavage parameters in mice exposed to the choking agent gas phosgene. *Toxicol Pathol*, 30(3):339–349, Jun 2002.
- [65] Manali ED, Moschos C, Triantafilidou C, Kotanidou A, Psallidas I, Karabela SP, Roussos C, Papiris S, Armaganidis A, Stathopoulos GT, and Maniatis NA. Static and dynamic mechanics of the murine lung after intratracheal bleomycin. *BMC Pulmonary medicine*, 11:33, 2011.
- [66] Behar A, Pujade-Lauraine E, Maurel MD, Lagrue G, and Feuihade F nad Hille D. The pathophysiological mechanism of fluid retention in advanced cancer patients treated with docetaxel, but not receiving corticosteroid comedication. *Br J Clin Pharmacol*, 43(6):653–658, June 1997.
- [67] Piccart MJ, Klijn J, Paridanes R, Nooij M, Mauriac L, Coleman R, Bontenbal M, Awada A, and Van Glabekke M. Corticosteroids significantly delay the onset of docetaxel-induced fluid retention: final results of a randomized study of the european organization for research and treatment of cancer investigational drug branch for breast cancer. *J Clin Oncol*, 15(9):3149–3155, 1997.

- [68] Hughes BG and Stuart-Harris R. Docetaxel-induced myositis: report of a novel side-effect. *Intern Med J*, 35(6):369–370, 2005.
- [69] Ardavanis AS, Ioannidis GN, and Rigatos GA. Acute myopathy in a patient with lung adenocarcinoma treated with gencitabine and docetaxel. *Anticancer Research*, 25:523–526, 2005.
- [70] Glassroth JL, Bernardo J, Lucey EC, Center DM, Jung-Legg YJ, and Snider GL. Interstitial pulmonary fibrosis induced in hamsters by intratracheally administered chrysotile asbestos. histology, lung mechanics and inflammatory events. *Am Rev Respir Dis*, 130(2):242–248, Aug 1984.
- [71] Nava S and Rubini F. Lung and chest wall mechanics in ventilated patients with end stage idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*, 54:390–395, 1999.
- [72] Katzenstein ALA and Myers J. Idiopathic pulmonary fibrosis. clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med*, 157:1301–1315, 1998.
- [73] Mercer RR and Crapo JD. Spatial distribution of collagen and elastin fibers in the lungs. *J Appl Physiol*, 69:756–765, 1990.
- [74] Weibel ER. *Functional morphology of lung parenchyma*. In: *Handbook of Physiology. The Respiratory system. Mechanics of Breathing*, volume III. Bethesda MD: Am Physiol Soc, 1986.
- [75] Faffe DS, D’Alessandro ES, Xisto DG, Antunes MA, Romero PV, Negri EM, Rodrigues NRD, Capelozzi VL, Zin WA, and Rocco PRM. Mouse strain dependence of lung tissue mechanics role of specific extracellular matrix composition. *Respir Physiol Neurobiol*, 152:186–196, 2006.
- [76] Yuan H, Kononov S, Cavalcante FSA, Lutchen KR, Ingenito EP, and Suki B. Effects of collagenase and elastase on the mechanical properties of lung tissue. *J Appl Physiol*, 89:3–14, 2000.
- [77] Brown RE, Butler JP, Rogers RA, and Leith DE. Mechanical connections between elastin and collagen. *Connect Tissue Res*, 30:295–308, 1994.

- [78] Tanaka R, Al-Jamal R, and Ludwig MS. Maturation changes in extracellular matrix and lung tissue mechanics. *J Appl Physiol*, 91:2314–2321, 2001.
- [79] Tanaka R and Ludwig MS. Changes in viscoelastic properties of rat lung parenchyma with maturation. *J Appl Physiol*, 87:2081–2089, 1999.
- [80] Iozzo RV. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 32:141–174, 1997.
- [81] Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*, 667:609–652, 1998.
- [82] Yamaguchi Y, Mann DM, and Rouslahti E. Negative regulation of transforming growth factor- $\beta$  by the proteoglycan decorin. *Nature*, 346:281–284, 1990.
- [83] Hasskarl J, Schroettner P, von den Berg A, Rueckert A, Frydrychowicz A, Kayser G, and Waller CF. Severe organizing pneumonia after two cycles of docetaxel as fourth-line chemotherapy for advanced non-small cell carcinoma of the lung. *Case Rep Oncol*, 2(1):12–19, Feb 2009.
- [84] Leimgruber K, Negro R, Baier S, Moser B, Resch G, Sansone S, Adami M, Zanon P, Graiff C, Egarter-Vigl E, and Wiedermann CJ. Fatal interstitial pneumonitis associated with docetaxel administration in a patient with hormone-refractory prostate cancer. *Tumori*, 92:542–544, 2006.
- [85] Tsangris I, Lekka ME, Kitsioulis E, Constantopoulos S, and Nakos G. Bronchoalveolar lavage alterations during prolonged ventilation of patients without acute lung injury. *Eur Respir J*, 21:495–501, 2003.
- [86] de Prost N, Ricard JD, Saumon G, and Dreyfuss D. Ventilator-induced lung injury: historical perspectives and clinical implications. *Ann Intensive Care*, 1:28, 2011.
- [87] Ricard JD, Dreyfuss D, and Saumon G. Ventilator-induced lung injury. *Eur Respir J Suppl*, 42:2s–9s, 2003.

- [88] Sobol SE, Keswani S, Parvadia JK, and Potsic WP. Effect of corticoisteriod-antibiotic agents on granulation tissue in a murine model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 131(4):330–335, 2005.
- [89] Richardson DW and Dodge GR. Dose-dependent effects of corticoisteriods on the expression of matrix-related genes in normal and cytokine-treated articular chondrocytes. *Inflammation Research*, 52(1):39–49, 2003.
- [90] Grande C, Villanueva MJ, Huidobro G, and Casal J. Docetaxel-induced interstitial pneumonitis following non-small-cell lung cancer treatment. *Clin Transl Oncol*, 9(9):578–581, 2007.
- [91] Read WL, Mortimer JE, and Picus J. Severe interstitial pneumonitis associated with docetaxel administration. *Cancer*, 94(3):847–853, Feb 2002.
- [92] Corrine RK, Judson ME, Crum LP, and Oury TD. A novel method for accurate collagen and biochemical assessment of pulmonary tissue utilizing one animal. *Int J Clin Exp Pathol*, 4(4):349–355, 2011.
- [93] Whitaker P, Kloner RA, Bougher DR, and Pickening JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrossirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol*, 89:397–410, 1994.
- [94] Junqueira LC, Bignolas G, and Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem*, 11:447–455, 1979.
- [95] Woessner JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys*, 93:440–447, 1961.
- [96] Jackson DS and Bentley JP. On the significance of the extractable collagens. *J Biophys Biochem Cytol*, 7:37–42, 1960.
- [97] Neuman RE and Logan MA. The determination of hydroxyproline. *J Biol Chem*, 184:299–306, 1950.

- 
- [98] Mathew DS and Raines TR. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*, 78:929–958, 2009.