



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**LÍZIAS CLÁUDIA SAMPAIO QUINTELA**

**NOVO MODELO ANIMAL DE LESÃO POR EXTRAVASAMENTO  
INDUZIDA POR VINOURELBINA: ESTUDO DOS MECANISMOS PATOGÊNICOS  
COMO POTENCIAIS ALVOS TERAPÊUTICOS**

**FORTALEZA-CE**

**2023**

LÍZIAS CLÁUDIA SAMPAIO QUINTELA

NOVO MODELO ANIMAL DE LESÃO POR EXTRAVASAMENTO INDUZIDA  
POR VINORELBINA: ESTUDO DOS MECANISMOS PATOGÊNICOS COMO  
POTENCIAIS ALVOS TERAPÊUTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.

**FORTALEZA-CE**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- Q71n Quintela, Lízias Cláudia Sampaio.  
Novo modelo animal de lesão por extravasamento induzida por vinorelbina: estudo dos mecanismos patogênicos como potenciais alvos terapêuticos / Lízias Cláudia Sampaio Quintela. – 2023.  
58 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.
1. quimioterapia. 2. vinorelbina. 3. extravasamento. 4. neutrófilos. 5. citocinas. I. Título.  
CDD 571.9
-

LÍZIAS CLÁUDIA SAMPAIO QUINTELA

NOVO MODELO ANIMAL DE LESÃO POR EXTRAVASAMENTO INDUZIDA  
POR VINOURELBINA: ESTUDO DOS MECANISMOS PATOGÊNICOS COMO  
POTENCIAIS ALVOS TERAPÊUTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.

Aprovada em 28/04/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior (UFC)

Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves (UFC)

Profa. Dra. Camila Fernandes (UFC)

Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Lima (UFC)

Ao Criador.  
Aos meus pais e irmãs.

## AGRADECIMENTOS

Ao Criador por ter me permitido concluir este trabalho.

À Nossa Senhora de Fátima a quem recorri muitas vezes.

À minha família: meus pais José Bonifácio e Francisca e minhas irmãs Josy e Sarinha, vocês foram o alicerce que me manteve de pé.

À Lolita (*in memoriam*), que foi minha companhia em todos os longos momentos de estudo e que me faz tanta falta no presente.

A todos os meus animais de estimação que tornavam meus dias mais leves.

Aos Ratinhos que doaram suas vidas em prol da ciência.

Ao meu orientador Dr. Roberto César por todos os ensinamentos, por sua parcimônia e por dividir sua sabedoria.

À professora Deysi Wong por suas generosas contribuições.

À professora Dra. Ana Paula Negreiros por sua imensa contribuição nos trabalhos histopatológicos.

À minha amiga e companheira de laboratório Aurilene Cajado que se dedicou a este trabalho junto comigo e esteve presente em todos os momentos.

A todos os colegas do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (Lafica), agradeço imensamente pela contribuição de cada um.

Aos membros da banca professora Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves, Profa. Dra. Camila Fernandes e Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Lima por suas contribuições finais.

Aos órgãos governamentais de fomento: Capes, Funcap e CNPq.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Inicie por fazer o necessário, então o que é possível e, de repente, o impossível estará feito”. (*São Francisco de Assis*).

## RESUMO

Lesão por extravasamento é um termo que descreve as manifestações de dano tecidual resultantes do vazamento acidental de um fármaco para o espaço subcutâneo durante infusões intravenosas. Os alcaloides da vinca e seus derivados, como a vinorelbina, estão entre as drogas anticancerígenas vesicantes mais proeminentes. Nosso objetivo foi delinear um modelo experimental de lesão por extravasamento induzida por vinorelbina e testar o papel das células residentes no mecanismo da lesão. Para isto, Ratos Wistar machos foram divididos em grupos (n=6/grupo). Os animais anestesiados receberam injeção intradérmica de solução salina (grupo controle, 100 µL/sítio) ou vinorelbina (0,03, 0,1, 0,3 ou 1 mg/100 µL/sítio). Os animais foram eutanasiados após 2, 4, 8 ou 16 h após a injeção de quimioterapia. As amostras de pele foram analisadas pelo ensaio de mieloperoxidase (MPO) para determinar o curso temporal da inflamação. O experimento foi repetido seguindo o mesmo curso de tempo usando o método de extravasamento do corante azul de Evans para determinar a permeabilidade vascular cutânea. O corante (25 mg/kg, i.v.) foi administrado 1 h antes da eutanásia dos animais. Amostras de tecido foram analisadas histopatologicamente para analisar os danos causados pela vinorelbina e se estabelecer um histoescor para graduação da lesão. Posteriormente, um ensaio de imunofluorescência foi desenvolvido em amostras de pele para avaliar a expressão de iNOS e TNF- $\alpha$ . Em outro contexto experimental, os animais foram divididos em dois grupos: ratos com cavidades peritoneais lavadas com solução salina e ratos com cavidades peritoneais não lavadas. Esses grupos receberam solução salina (1 ml/cavidade, i.p.), vinorelbina (1 mg/ml/cavidade, i.p.) ou vinorelbina + dexametasona (3 mg/kg, s.c.) 30 min após a lavagem. O exsudato peritoneal foi coletado 4 h após a exposição à quimioterapia para quantificar o número de neutrófilos migrados. A maior concentração de vinorelbina testada (1 mg/sítio) causou aumento da acumulação de neutrófilos no maior tempo testado, qual seja, 16h. Esse achado foi acompanhado de uma resposta edematogênica tempo-dependente, detectada pela permeabilidade vascular cutânea ao azul de Evans com máximo testado 16 horas após a exposição à quimioterapia em comparação com o grupo salina (P <0,05). A vinorelbina não induziu sinais de inflamação em 2, 4 ou 8 horas após a injeção da droga. Ao histoescor padronizado neste estudo, observou-se um padrão intenso de lesão associado à vinorelbina quando extravasada para o tecido (escores 9[8–9]). Esses danos foram atenuados (P<0,05) ao se utilizar dexametasona previamente (escores 7,5[7–8]). A vinorelbina induziu a expressão de iNOS, mas não de TNF $\alpha$ , nas amostras de pele com injeção de vinorelbina, o que foi reduzido pela dexametasona. No ensaio de depleção de células residentes, verificou-se uma redução da população de células mononucleares na cavidade peritoneal dos ratos após a lavagem peritoneal com soro fisiológico. A capacidade da vinorelbina de induzir o acúmulo de neutrófilos foi ampliada na cavidade lavada, sugerindo uma independência de células residentes na capacidade inflamatória do quimioterápico. A dexametasona preveniu significativamente a migração de neutrófilos (P<0,05) indicando que a vinorelbina induz quimiotaxia de neutrófilos em um mecanismo independente de células residentes, mas de forma dependente de mecanismos químicos inflamatórios de natureza proteica. Assim, delineamos um novo modelo animal de lesão por extravasamento induzido por vinorelbina. Adicionalmente, elaboramos um sistema de graduação por histoescor padronizado para avaliação da lesão. O quimioterápico induziu o acúmulo de neutrófilos durante a lesão tecidual independentemente da estimulação das células residentes.

**Palavras-chave:** quimioterapia; vinorelbina; extravasamento; neutrófilos; citocinas.



## ABSTRACT

Extravasation injury is a term that describes the manifestations of tissue damage resulting from the accidental leakage of a drug into the subcutaneous space during intravenous infusions. Vinca alkaloids and their derivatives, such as vinorelbine, are among the most prominent vesicant anticancer drugs. We aimed to design an experimental model of vinorelbine-induced extravasation injury and test the role of resident cells in the injury mechanism. Male Wistar rats were divided into groups (n=6/group). Anesthetized animals received an intradermal injection of saline solution (control group, 100  $\mu$ l/site) or vinorelbine (0.03, 0.1, 0.3, or 1 mg/100  $\mu$ l/site). The animals were euthanized after 2, 4, 8, or 16 h after chemotherapy injection. Skin samples were analyzed by the myeloperoxidase (MPO) assay to determine the time course of inflammation. The experiment was repeated following the same time course using the Evans blue dye extravasation method to determine cutaneous vascular permeability. The dye (25 mg/kg, i.v.) was administered one h before the euthanasia of the animals. Tissue samples were analyzed histopathologically to analyze the damage caused by vinorelbine and to establish a histo-score for grading the lesion. Subsequently, an immunofluorescence assay was developed in skin samples to evaluate the expression of iNOS and TNF- $\alpha$ . In another experimental context, the animals were divided into two groups: rats with peritoneal cavities washed with saline solution and rats with unwashed peritoneal cavities. These groups received saline (1 ml/well, i.p.), vinorelbine (1 mg/ml/well, i.p.), or vinorelbine + dexamethasone (3 mg/kg, s.c.) 30 min after lavage. The peritoneal exudate was collected four h after chemotherapy exposure to measure the number of migrated neutrophils. The highest concentration of vinorelbine tested (1 mg/site) caused an increase in the accumulation of neutrophils in the longest time tested, that is, 16h. This finding was accompanied by a time-dependent edematogenic response, detected by cutaneous vascular permeability to Evans blue at 16 hours after exposure to chemotherapy compared to the saline group ( $P < 0.05$ ). Vinorelbine did not induce signs of inflammation at 2, 4, or 8 hours after drug injection. The histoscore standardized in this study showed an intense pattern of injury associated with vinorelbine when extravasated into the tissue (scores 9[8–9]). These damages were attenuated ( $P < 0.05$ ) when previously using dexamethasone (scores 7.5[7–8]). Vinorelbine induced iNOS expression, but not TNF $\alpha$ , in skin samples injected with vinorelbine, which was reduced by dexamethasone. In the resident cell depletion assay, a reduction in the population of mononuclear cells was observed in the peritoneal cavity of rats after peritoneal lavage with saline solution. The capacity of vinorelbine to induce the accumulation of neutrophils was enhanced in the washed cavity, suggesting the independence of resident cells in the inflammatory capacity of the chemotherapy agent. Dexamethasone significantly prevented neutrophil migration ( $P < 0.05$ ), indicating that vinorelbine induces neutrophil chemotaxis in a mechanism independent of resident cells but dependent on inflammatory chemical mechanisms of protein nature. Thus, we designed a new animal model of vinorelbine-induced extravasation injury. Additionally, we developed a standardized histo-score grading system for lesion assessment. The chemotherapeutic induced the accumulation of neutrophils during tissue injury regardless of stimulation of resident cells.

**Keywords:** chemotherapy; vinorelbine; extravasation; neutrophils; cytokines.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho experimental para determinar concentração e tempo de indução da inflamação por vinorelbina.....	21
Figura 2 - Desenho experimental do modelo de extravasamento por vinorelbina. ....	22
Figura 3 - Desenho experimental da depleção de células residentes peritoneais e migração de neutrófilos induzida por vinorelbina. ....	23
Figura 4 - A injeção intradérmica de vinorelbina aumenta o infiltrado neutrofilico. ....	30
Figura 5 - Curva temporal da atividade de mieloperoxidase.....	31
Figura 6 - A vinorelbina induz edema cutâneo.....	32
Figura 7 - Curva temporal da permeabilidade vascular. ....	33
Figura 8 - A vinorelbina induz lesão tissular cutânea de forma tempo-dependente.....	34
Figura 9 - Dexametasona atenua parcialmente o dano histológico induzido pela vinorelbina	37
Figura 10 - A lesão cutânea provocada por vinorelbina aumenta a expressão de iNOS. ....	39
Figura 11 - O TNF $\alpha$ não foi expresso 16 horas após a indução de lesão cutânea por vinorelbina .....	40
Figura 12 - A vinorelbina induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de forma independente de células residentes. ....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escores histológicos de lesão cutânea por vinorelbina no dorso de ratos .....	25
Tabela 2 - Grau do dano cutâneo determinado pelo somatório dos escores histológicos.....	226
Tabela 3 - Escores histológicos de lesão por critério patológico .....	35

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>18</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>4 MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
4.1 Aspectos éticos.....	20
4.2 Animais.....	20
4.3 Compostos .....	20
4.4 Protocolos experimentais.....	20
4.4.1 Protocolo I: Determinação da concentração e tempo para indução da inflamação por vinorelbina.....	20
4.4.2 Protocolo II: Indução da lesão por extravasamento de vinorelbina.....	21
4.4.3 Protocolo III: Depleção de células residentes peritoneais e migração de neutrófilos induzida por vinorelbina.....	22
<b>4.5 Avaliação dos parâmetros inflamatórios para determinação do modelo .....</b>	<b>23</b>
4.5.1 Atividade da mieloperoxidase (MPO).....	23
4.5.2 Permeabilidade vascular cutânea pelo Método do Azul de Evans.....	24
<b>4.6 Análise histológica .....</b>	<b>24</b>
4.6.1 Análise qualitativa temporal da injeção intradérmica de vinorelbina.....	24
4.6.2 Determinação dos escores e grau histológico do dano .....	25
<b>4.7 Expressão de iNOS e TNF-alfa por imunofluorescência 16 horas após a injeção de vinorelbina.....</b>	<b>26</b>
<b>4.8 Migração de células para a cavidade intraperitoneal .....</b>	<b>27</b>
4.8.1 Contagem total e diferencial.....	27
<b>4.9 Análise estatística .....</b>	<b>27</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>

5.1 Atividade de Mieloperoxidase (MPO) em amostras obtidas do dorso dos animais .....	29
5.2 Permeabilidade vascular cutânea ao Azul de Evans .....	31
5.3 Análise qualitativa temporal da injeção intradérmica de vinorelbina sobre as alterações histológicas em amostras de pele de dorso de rato. ....	33
5.4 Padronização de histocores para a lesão cutânea induzida por vinorelbina e efeito protetor da dexametasona .....	34
5.5 Expressão de iNOS por imunofluorescência em lesão cutânea por vinorelbina e efeito do tratamento com dexametasona em ratos. ....	38
5.6 Análise da expressão de TNF $\alpha$ por imunofluorescência em lesão cutânea induzida por vinorelbina. ....	40
5.7 Efeito da depleção de células residentes peritoneais sobre a migração de neutrófilos induzida por vinorelbina.....	41
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que ocasiona alta mortalidade devido ao diagnóstico muitas vezes tardio, quando já se apresenta em estágios avançados. Em uma estimativa mundial produzida pela Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer, em 2020, incluindo-se o câncer de pele não melanoma, ocorreram 19,3 milhões de casos novos e 10,0 milhões de óbitos. (SUNG et al., 2020). No Brasil, segundo a estimativa de 2023 feita pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) do Ministério da Saúde, para o triênio 2023-2025 a ocorrência de novos casos será de 704 mil a cada ano, realçando o impacto desta doença bem como a importância de se implementar ações de prevenção e controle.

Para o tratamento do câncer, existem várias abordagens: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia, terapias alvo-direcionadas e imunoterapia, cuja combinação potencializa a atividade antitumoral (ALMEIDA et al, 2005; GUIMARAES et al, 2008; LEAL et al, 2010; MARTA et al, 2011; DA COSTA e CHAGAS, 2013; ALVARENGA et al, 2014; LEI et al, 2019). Quando surge a necessidade de um tratamento sistêmico, como nos casos em que há metástase, a quimioterapia é com frequência utilizada em cerca de 60 a 70 % dos casos. (SPENCE; JONHSTON, 1996), visto que se destinam à inibição da rápida proliferação celular por negativamente modular a replicação e reparo do DNA ou reprimir o ciclo celular (ECCLES; WELCH, 2007).

### 1.2 Os alcaloides da vinca no tratamento contra o câncer

A descoberta de novos fármacos antineoplásicos de origem vegetal tem impulsionado as pesquisas na área da Oncologia. Um dos exemplos mais importantes é o da *Catharanthus roseus* ou Vinca rosea utilizada pela população de Madagascar para o tratamento do diabetes. Durante os testes da atividade hipoglicemiante, os extratos desta planta produziram granulocitopenia em consequência da supressão da medula óssea dos animais suscitando a ideia de se estudar este efeito em modelos de leucemias e linfomas (DE CARVALHO, 2006; DUFLOS; KRUCZYNSKI; BARRET, 2002.).

Após a confirmação das atividades nestes modelos, foram isolados dois alcaloides: vincristina e vimblastina, que a partir de 1960 foram introduzidos no tratamento da leucemia infantil, câncer testicular, doença de Hodgkin, dentre outros (MANN, 2002). Os alcaloides da vinca compõem uma das classes mais antigas de medicamentos antineoplásicos utilizados em tumores animais e humanos e são conhecidos por inibirem a polimerização de microtúbulos. A

vinorelbina, um análogo semissintético da vimblastina, porém com toxicidade neurológica menor, foi sintetizado pela primeira vez em 1978, tornando-se uma droga mais lipossolúvel que outros alcaloides da vinca mais antigos (BUDMAN, 1997). Apesar de existirem muitos compostos derivados de alcaloides da vinca, apenas os dois compostos naturais, vinblastina e vincristina, e dois derivados semissintéticos, vindesina e vinorelbina, estão em uso clínico como antineoplásicos (DUFLOS; BARRET, 2002.).

O mecanismo de ação principal da vinorelbina baseia-se em interferir com o rearranjo dos microtúbulos, inibindo sua proliferação do fuso mitótico, causando uma parada do ciclo celular na metáfase (ZHANG; YANG; GUO, 2017). Inibe a polimerização da tubulina e age principalmente sobre os microtúbulos mitóticos. Age intervindo também com o metabolismo dos aminoácidos, o transporte de cálcio, a respiração celular e a síntese dos ácidos nucleicos. É considerado um agente específico de fase do ciclo celular (fase M) (BRASIL, 2019; ZHANG; YANG; GUO, 2017).

Em 1989, após passar por testes clínicos na Europa, a vinorelbina começou a ser utilizada no tratamento de carcinoma de pulmão de não pequenas células na França, e em 1994 a droga foi aprovada nos Estados Unidos para tratar também o mesmo tipo de câncer (BUDMAN, 1997). No entanto, os agentes antineoplásicos são tóxicos a qualquer tecido de rápida proliferação, normais ou cancerosos, por isso tem como consequência o aparecimento de efeitos colaterais (FONSECA; ALMEIDA; MASSUNAGA, 2000). Um exemplo de toxicidade é a neuropatia periférica, que se desenvolve pela inibição do transporte axonal de neurotransmissores, sendo, portanto, efeito colateral comum e dose-limitante associado aos alcaloides da vinca (ISLAM *et al.*, 2019).

### 1.3 Os alcaloides da vinca e a interação com os microtúbulos

Os microtúbulos são polímeros longos de proteínas em forma de tubos ocos que fazem parte do citoesqueleto e são essenciais em células eucariotas. As proteínas que formam os microtúbulos são chamadas de tubulinas. Existem dois tipos de tubulinas chamadas de  $\alpha$  tubulina e  $\beta$  tubulina que se associam formando dímeros que se polimerizam formando protofilamentos. Os microtúbulos além de função estrutural na célula, participam do transporte de componentes, movimentação das organelas, sinalização celular e na mitose atuando no deslocamento dos cromossomos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). No processo de mitose, qualquer disfunção nos microtúbulos pode causar a interrupção da mitose e consequente morte

celular, e por este motivo os microtúbulos são importantes alvos de alguns antineoplásicos, como os alcaloides da vinca (ISLAM *et al.*, 2019).

Os alcaloides da vinca ligam-se às  $\beta$ -tubulinas inibindo a polimerização dos microtúbulos (FLORIAN; MITCHISON, 2016.). Estudos com a planta *Catharanthus roseus* deram origem a dois representantes naturais dessa classe de medicamentos antimitóticos: a vincristina e a vimblastina. Desde então, a planta passou por processos biotecnológicos com o intuito de aproveitar melhor suas propriedades e foi a partir disto que vários análogos semissintéticos destes medicamentos têm sido pesquisados, como por exemplo a vinorelbina, sintetizada pela primeira vez em 1978 como uma promessa de apresentar maior atividade terapêutica e menos efeitos adversos (GREGORY; SMITH, 2000; MANGENEY *et al.*, 1979). Esse mecanismo difere de outros fármacos que têm como alvo o fuso mitótico, como o paclitaxel e docetaxel, que atuam como estabilizadores de microtúbulos formados (CAPASSO, 2012).

Assim, a vinorelbina possui um amplo espectro de atividade antitumoral e tem sido utilizada contra a recidiva de câncer de mama em estágio avançado, quando há falha terapêutica com as antraciclina. A vinorelbina tem um índice terapêutico melhor do que os compostos parentais, vincristina e vimblastina, provavelmente devido à sua maior afinidade pelos microtúbulos mitóticos (CAPASSO, 2012).

Tais achados contribuem para uma alta eficácia clínica tanto para o tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) quanto para o de câncer de mama (CM), juntamente com uma boa tolerabilidade em doses terapêuticamente eficazes (GREGORY; SMITH, 2000). Apesar de uma excelente atividade antitumoral, a administração da vinorelbina por via intravenosa pode cursar com emergências clínicas devido ao extravasamento para os tecidos durante erros de administração em infusões intravenosas (CICCHETTI; JEMEC; GAULT, 2000.) e cujo manejo é uma emergência de enfermagem.

#### 1.4 Lesão por extravasamento e flebite associadas a antineoplásicos

Apesar do notório avanço terapêutico a ponto de melhorar o prognóstico de vários tumores, os pacientes oncológicos continuam sofrendo com toxicidades decorrentes dos tratamentos (SCHIRRMACHER, 2019). Além disso, o conhecimento insuficiente acerca da patogênese de boa parte dessas reações adversas repercute no número bastante restrito de opções terapêuticas protetoras. Como resultado, efeitos adversos sérios levam muitas vezes à descontinuação do tratamento, afetando a eficácia da terapia oncológica (BOSSI, *et al.* 2015).



A interrupção do tratamento, dependendo da doença e da fase da terapia, aumenta as despesas para o sistema de saúde, gerando uma questão de saúde pública. Nos Estados Unidos calcula-se um impacto econômico anual de 100-330 bilhões de dólares associado à falta de adesão ao tratamento oncológico (BOSSI, et al 2015). Por outro lado, no Brasil, há um claro vácuo de informações relativas às toxicidades do tratamento oncológico, dada a indisponibilidade de dados demográficos e de farmacoeconomia.

Na Oncologia, o termo “extravasamento” é usado para designar a administração não intencional de drogas quimioterápicas vesicantes fora do sistema venoso. É uma situação de emergência clínica associada ao uso de cateter de inserção periférica para administração de fármacos (CICCHETT; JEMEC; GAULT, 2000). Apesar das lesões por extravasamento acontecerem mais geralmente no tecido, elas também podem ocorrer no mediastino, no pulmão e em outras áreas quando ocorre o rompimento dos cateteres venosos centrais ou quando migram para fora da veia. Além disso, também podem ocorrer no músculo quando a droga é administrada imprudentemente através de injeção (SCHULMEISTER, 2007).

Os antineoplásicos irritantes e vesicantes possuem o inconveniente de causar danos teciduais quando extravasam do vaso sanguíneo para o tecido ao serem administrados por cateter venoso periférico e esta é uma das principais preocupações da equipe de enfermagem ao se trabalhar com este tipo de fármaco. A diferença entre antineoplásicos vesicantes e irritantes se dá por estes causarem desconforto, ardor, calor e inflamação temporária enquanto que os fármacos vesicantes além de também causarem sintomas de inflamação como dor, queimação, vermelhidão e edema, podem levar ao surgimento de vesículas e destruição do tecido (necrose tecidual) podendo causar desde a perda de função do membro até danos neurológicos, afetando a qualidade de vida do paciente e aumentando os custos do tratamento (FIDALGO *et al*, 2012; ANDRADE; SILVA, 2007; KREIDIEH; MOUKADEM; EL SAGHIR, 2016).

As reações imediatas do extravasamento destacam-se pela queimação, desconforto local, eritema e reações sistêmicas. As reações tardias, verificadas dias ou semanas após o evento de extravasamento, caracterizam-se principalmente por dor, edema, endurecimento, ulceração, vesículas, necrose tecidual secundária ao extravasamento, celulite e inflamação. Alguns danos são reversíveis, porém outros podem ser irreversíveis como a ulceração, necrose tissular grave, destruição progressiva de tecidos, que pode acometer nervos e tendões, além de déficits funcionais e estéticos de longo prazo (LANGER, 2010).

O risco de extravasamento é inversamente proporcional ao calibre do vaso sanguíneo, aumentando com o uso de veias de menor calibre. Riscos são precipitados por erros técnicos na

punção venosa periférica e na administração das drogas, escolha inadequada do local de punção venosa, quimioterapia anterior no mesmo vaso, linfadenectomia axilar, radioterapia anterior em área de punção, alterações nutricionais, neuropatia preexistente, uso simultâneo de drogas que podem causar sonolência, confusão mental, agitação motora e vômito ou tosse (BONASSA; SANTANA, 2005).

As taxas de incidência das lesões por extravasamento variam muito. Estima-se que ocorram entre 0,01% e 7% a depender do estudo. Há uma clara sugestão de que a incidência tem diminuído devido a melhorias nos procedimentos de infusão, reconhecimento precoce de vazamento de drogas e treinamento em técnicas de gestão (FIDALGO *et al.*, 2012).

Algumas ações se fazem necessárias quando da verificação do extravasamento do quimioterápico. A principal ação envolve a interrupção da infusão. Tal procedimento deve ser acompanhado da conexão de uma seringa e aspiração da medicação residual, além de manter elevado o membro afetado – acima do nível do coração (WENGSTRÖM; MARGULIES, 2008; FIDALGO *et al.*, 2012). A realização de compressas frias ou quentes dependendo da medicação extravasada, durante 15 a 20 min e não realizar pressão manual direta sobre a área afetada são também incluídas nas principais medidas a serem tomadas ao se constatar a ocorrência de extravasamento (ANDRADE; SILVA, 2007; FIDALGO *et al.*, 2012).

Destacam-se também entre as opções de tratamento das lesões a remoção imediata do fluido do espaço perivenoso subcutâneo com infiltração de hialuronidase e múltiplas punções cutâneas ao redor da área de extravasamento, lavagem salina e lipossucção (GAULT; CHALLANDS, 1997) dimetil sulfóxido tópico (DMSO) (KASSNER, 2000), desbridamento cirúrgico e retalhos ou enxertos de pele nos casos mais graves onde ocorre perda do tecido (HEITMANN; DURMUS; INGIANNI, 1998). O curativo a vácuo (VAC) é reportado como capaz de aumentar a velocidade e eficácia na cicatrização, é uma terapia bem conhecida para o tratamento de pacientes com feridas de tecidos moles e pode ser coadjuvante do tratamento de lesões por extravasamento mais graves (HERSCOVICI *et al.*, 2003).

Quando a infusão de vinorelbina é mais longa, a incidência de toxicidade dermatológica aumenta (Gilbar e Carrington, 2006). Gilbar e Carrington demonstraram em 2006 que os casos de flebite são mais comuns que os casos de extravasamento quando do uso de vinorelbina. Contudo, ao se comparar a gravidade das lesões provocadas por vinorelbina e docetaxel, o primeiro apresentou necrose tissular em maior gravidade, assim como uma maior extensão de área ulcerada, profundidade de necrose e comprometimento muscular (ZHU *et al.*, 2014).

Uma das complicações locais de certos agentes quimioterápicos é a necrose tecidual decorrente do extravasamento. Um estudo de 1990, avaliou a eficácia da corticoterapia como

meio de minimizar a necrose e a necessidade de cirurgia reconstrutiva (TSAVARIS *et al.*, 1990). Para tanto, 53 pacientes com lesões de extravasamento por doxorubicina, epirrubina, vinblastina, mitoxantrona ou mitomicina C foram avaliados. O manejo clínico da lesão envolveu uma pomada de betametasona aplicada na lesão a cada 12 horas nos primeiros 2 dias e depois a cada 24 horas até a cura completa, evitando o desenvolvimento de necrose tecidual e a necessidade de cirurgia reconstrutiva (TSAVARIS *et al.*, 1990).

Por outro lado, em uma série retrospectiva de 175 casos de extravasamento, até 46% dos pacientes recebendo injeções intralesão de corticoides necessitaram, ainda, de desbridamento cirúrgico versus 13% daqueles sem uso corticoides, sugerindo um efeito deletério destes agentes (FIDALGO *et al.*, 2012). No contexto de lesões por extravasamento por antracíclicos, os corticoides não são recomendados devido às lesões não terem um componente inflamatório subjacente como plano de fundo da patogênese (LANGER; SEHESTED; JENSEN, 2009). O uso de corticoides, portanto, parece controverso. Ao que se observa na literatura, os mecanismos de lesão por extravasamento variam de acordo com o quimioterápico envolvido, requerendo, por conseguinte, uma abordagem específica, a depender do caso (WENGSTRÖM; MARGULIES, 2008).

Há um relato de um modelo experimental de lesão por extravasamento induzido por vinorelbina, doxorubicina ou paclitaxel (SUGIMOTO *et al.*, 2012). Naquele estudo, houve uma avaliação geral macroscópica e histopatológica. Macroscopicamente, as lesões cutâneas foram reduzidas por injeções locais de esteroides em ratos injetados com doxorubicina ou vinorelbina. Histologicamente, a doxorubicina, a vinorelbina e o paclitaxel induziram lesões teciduais profundas, marcadas por edema, inflamação e necrose. De forma interessante, a injeção local de corticoides não foi eficaz em prevenir esses danos (SUGIMOTO *et al.*, 2012). Uma limitação desse estudo foi a deficiência na descrição detalhada dos achados histopatológicos, a ausência de uma curva temporal das alterações, a falta da avaliação de mediadores inflamatórios e mecanismos envolvidos, além, de um teste de administração sistêmica de corticoides.

Desta forma, o presente estudo propõe o desenvolvimento de um modelo experimental de lesão por extravasamento de vinorelbina que permita a testagem de drogas com potencial terapêutico e o estudo de mecanismos, visando evidenciar uma racionalidade nessa testagem pautada em alvos específicos

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar das lesões por extravasamento serem pouco frequentes na prática clínica, elas podem provocar graves e/ou irreversíveis complicações que, se não tratadas, podem comprometer cápsulas articulares, tendões, nervos e vasos, gerando sequelas graves como rigidez articular permanente, síndromes de compressão nervosa, défices neurológicos e distrofia simpática residual (FREITAS; POPIM, 2015). Além da doença repercutir de maneira significativa na vida do paciente oncológico promovendo diversas limitações e alterações psicológicas, os efeitos colaterais decorrentes da quimioterapia prejudicam a qualidade de vida do paciente.

Em 2020, a incidência de câncer de mama ultrapassou a incidência de câncer de pulmão, estimando-se um número de 2,3 milhões de novos casos no mundo, enquanto que o câncer de pulmão se manteve como a principal causa de morte em se tratando de câncer. Já no Brasil, a estimativa é 74 mil novos casos de câncer de mama ocupando a segunda posição na classificação nacional. O câncer de pulmão ocupou o quinto mais incidente na estimativa 2023 (INCA, 2022).

A vinorelbina tem sido um fármaco amplamente utilizado no tratamento de câncer de pulmão e mama, que estão entre os tipos de câncer mais incidentes no mundo. Considerando a alta na incidência de câncer, é razoável notar que será necessária uma maior demanda de antineoplásicos, como a vinorelbina, para tratar estas doenças, o que conseqüentemente implica numa maior observância na frequência de toxicidades, como as lesões por extravasamento.

Embora todos os fármacos vesicantes possam causar dano tecidual por extravasamento, as antraciclina, como a doxorrubicina, têm o maior potencial vesicante quando comparadas a outros agentes quimioterápicos. Contudo, os estudos das lesões por extravasamento associadas especificamente aos antracíclicos têm sido mais bem documentados e abordagens terapêuticas têm sido indicadas, como o dexrazoxane aprovado pelo *Food and Drug Administration*, agência de vigilância de fármacos dos Estados Unidos (EL-SAGHIR et al., 2004). Por outro lado, a literatura não dispõe de estudos que abordem os mecanismos que levam à total compreensão de como ocorrem estas lesões quando se trata do extravasamento da vinorelbina. As pesquisas parecem ainda não ter alcançado um consenso sobre o padrão de tratamento efetivo para as lesões de pele causadas pelo extravasamento de vinorelbina, fatos que justificam a escolha deste fármaco como objeto deste estudo e a necessidade de se elaborar um modelo experimental que forneça informações necessárias para responder aspectos importantes da patogênese da lesão por extravasamento.

### 3 OBJETIVOS

#### Objetivo geral

Delimitar um modelo experimental de lesão por extravasamento induzida por vinorelbina e testar o papel das células residentes no mecanismo da lesão.

#### Objetivos específicos

- Descrever de forma tempo-dependente as alterações inflamatórias e histopatológicas de estruturas afetadas pelo extravasamento de vinorelbina;
- Desenvolver um sistema de classificação de dano tecidual provocado por extravasamento de vinorelbina;
- Estudar o efeito da vinorelbina sobre a expressão de mediadores inflamatórios clássicos, sobre a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, bem como o papel de células residentes nesse mecanismo.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará e aprovado em 30 de abril de 2020 sob o número 4753300919. Todos os preceitos considerados para esta aprovação seguiram a Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

### 4.2 ANIMAIS

Neste estudo, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos adultos, pesando entre 180 e 300 g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, respeitando o número máximo de 3 ratos por gaiola, sob ciclo claro-escuro de 12/12 horas com livre acesso à ração comercial e à água, em ambiente com temperatura controlada (22-25 °C) e exaustão de ar.

### 4.3 COMPOSTOS

Para a execução dos protocolos, usamos: **vinorelbina** (Navelbine®, Laboratório Pierre Fabre do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil), **dexametasona** (Azium® injetável, MSD, Merck Sharp & Dohme Corp., Brasil), **cetamina** (100 mg/kg, i.p., Quetamina, 10 g/100 mL, ampolas contendo 10 mL, Vetnil, São Paulo, Brasil) e **xilasina** (10 mg/kg, i.p., Xilazin®, 2 g/100 mL, ampolas contendo 10 mL, Syntec, São Paulo, Brasil).

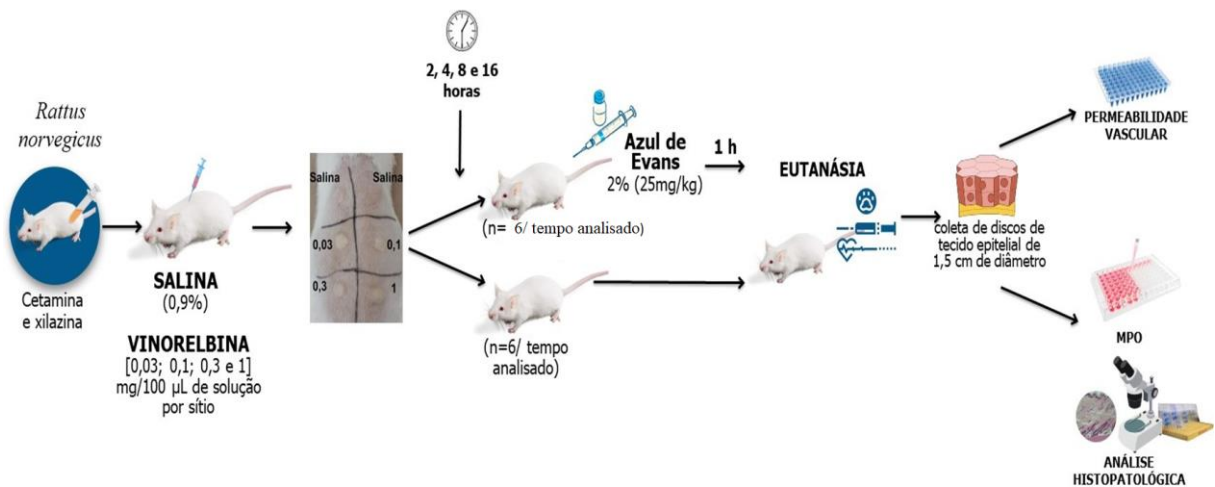
### 4.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### 4.4.1 Protocolo I: Determinação da concentração e tempo para indução da inflamação por vinorelbina

Ratos Wistar anestesiados com cetamina e xilazina tiveram o dorso tricotomizado e dividido em 6 quadrantes. Cada animal recebeu injeções de salina 0,9% (100 µL de solução por

sítio) e vinorelbina nas concentrações 0,03; 0,1; 0,3 ou 1 (mg/100  $\mu$ L de solução por sítio). As administrações ocorreram por via intradérmica, com formação de pápula no dorso do animal (**Figura 1**). Nesse ponto, os animais foram divididos em dois grupos para análise de parâmetros inflamatórios e histológicos a partir do material biológico coletado nos tempos de 2, 4, 8 e 16 horas após a injeção de salina e vinorelbina. No grupo designado para a análise de permeabilidade vascular, passado os tempos estipulados, foi administrada por via intravenosa, na veia dorsal peniana, a solução de Azul de Evans 2% (25 mg/kg) (n=6/ tempo analisado) e, 1 hora depois, foi realizada a eutanásia dos animais por overdose de anestésicos. Após confirmação de morte, foram coletados discos de tecido epitelial de 1,5 cm de diâmetro. Já no grupo destinado à análise da atividade da mieloperoxidase (MPO) e de parâmetros histológicos (n=6/tempo analisado) os discos de tecido epitelial coletados foram divididos e reservados para as respectivas análises (**Figura 1**).

Figura 1 - Desenho experimental para determinar concentração e tempo de indução da inflamação por vinorelbina.



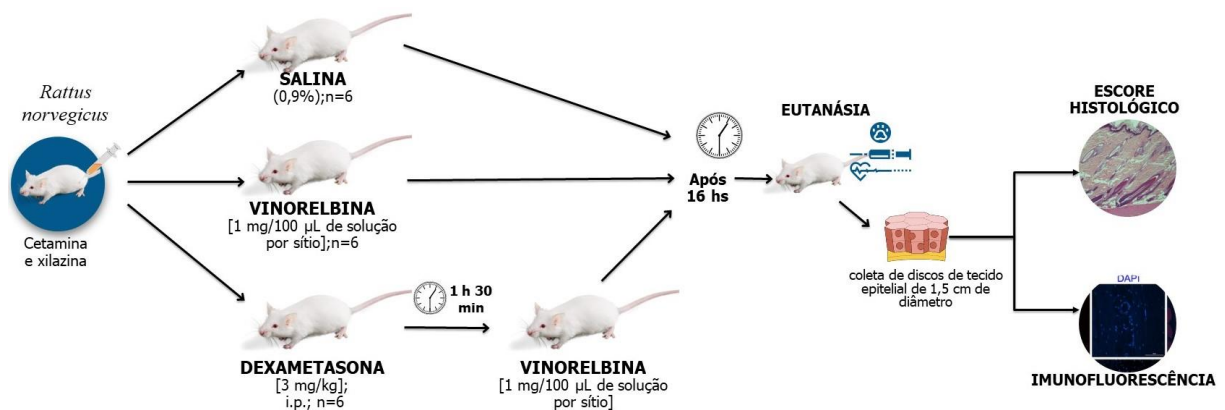
Fonte: autoria própria.

#### 4.4.2 Protocolo II: Indução da lesão por extravasamento de vinorelbina

Após serem anestesiados, ratos Wistar tiveram o dorso tricotomizado e dividido em quadrantes, com posterior administração de salina 0,9% (100  $\mu$ L de solução por sítio; n=6) e vinorelbina (1 mg/100  $\mu$ L de solução por sítio; n=6) isolada ou em combinação com dexametasona (3 mg/kg; via intraperitoneal; n=6). A administração de dexametasona foi realizada 1 hora e 30 min antes da injeção de vinorelbina e, passadas 16 horas, os animais foram

eutanasiados para coleta do tecido epitelial. Inicialmente, foi injetado cetamina (80 mg/kg, i.p.) e xilasina (10 mg/kg, i.p.) para eutanásia (**figura 2**). Após confirmação de morte, fragmentos do tecido epitelial foram fixados em formol tamponado 10% para análise histológica e quantificação da área fluorescente de marcadores inflamatórios por imunofluorescência a partir dos blocos de parafina.

Figura 2 - Desenho experimental do modelo de extravasamento por vinorelbina.



Fonte: autoria própria.

#### 4.4.3 Protocolo III: Depleção de células residentes peritoneais e migração de neutrófilos induzida por vinorelbina

Ratos Wistar foram anestesiados e divididos nos grupos não lavado (sham), com manutenção das células residentes na cavidade peritoneal, e lavado (W), onde houve depleção das células residentes. Cada grupo foi subdividido em salina (0,9%; 1 mL/cavidade, i.p.; n=6) e vinorelbina (1 mg/mL/cavidade, i.p.; n=6) sozinho ou combinado com dexametasona (3 mg/kg; via subcutânea; n=6). Nos animais do grupo contendo dexametasona o tratamento foi feito 1 hora e 30 minutos antes da injeção de vinorelbina (**Figura 3**).

Para a depleção das células residentes, os animais tiveram o peritônio lavado com solução salina (0,9%). Em resumo, após administração de 30 mL de solução na cavidade peritoneal, foi realizado massagem por todo o peritônio durante 1 minuto afim de soltar as células aderidas e, em seguida, foi feito um corte na região inguinal dos animais para remoção do fluido peritoneal contendo as células residentes.

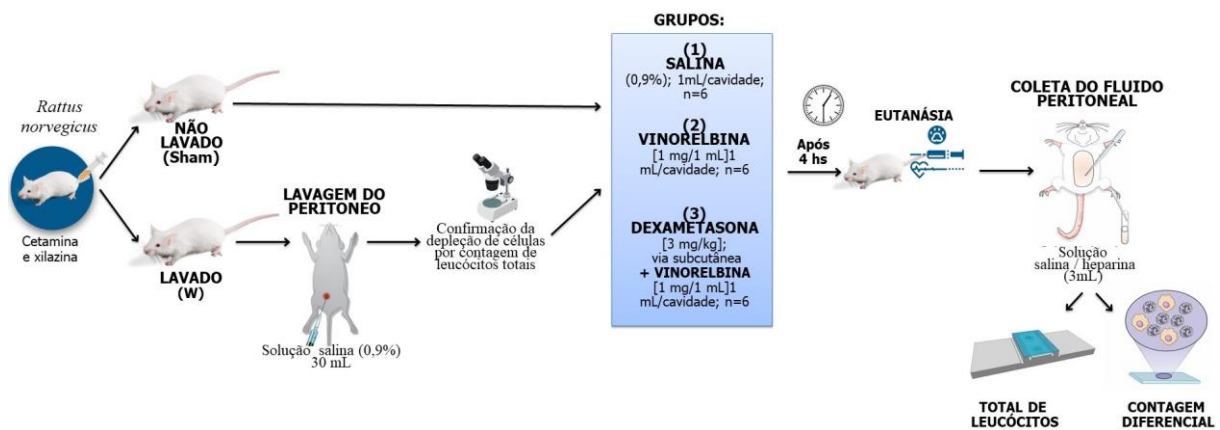
A depleção das células foi comprovada por contagem de células totais, para isso, foi injetado, adicionalmente, 3 mL de solução salina no peritônio, seguido de massagem e coleta do fluido peritoneal. Foram mantidos no experimento apenas os animais cuja depleção das



células foi confirmada. Finalmente, foi realizada a sutura dos animais e a administração dos tratamentos conforme divisão previamente estabelecida.

Após 4 horas da injeção de salina ou vinorelbina, os animais foram anestesiados e eutanasiados. Nesse momento, foi injetado 3 mL de solução contendo salina/heparina (200 u de heparina /mL) na cavidade peritoneal, seguido de massagem e coleta do fluido peritoneal para determinar a migração leucocitária através de contagem celular total e diferencial (mononucleares ou neutrófilos/cavidade).

Figura 3 - Desenho experimental da depleção de células residentes peritoneais e migração de neutrófilos induzida por vinorelbina.



Fonte: autoria própria

## 4.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS PARA DETERMINAÇÃO DO MODELO

### 4.5.1 Atividade da mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO), uma enzima presente em grânulos de neutrófilos, é utilizada como marcador da presença dessas células no tecido inflamado. Sua presença foi determinada por método colorimétrico e a leitura final realizada em leitor de placas. Resumidamente, cada amostra foi pesada e homogeneizada em solução NaCl e EDTA dissódico diluídos em Tampão Fosfato (0,02M) e triturada em TissueLyser LT da Qiagen usando *beads* de aço de 4,5 mm. As amostras foram, então, centrifugadas (3000 rpm, 15 min, 4°C) com posterior descarte do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* em solução hipotônica (NaCl 0,2%) para lise celular. Após nova centrifugação, o *pellet* resultante foi ressuspensão em 300 µL de tampão NaPO<sub>4</sub> 0,05 M, pH 5,4, contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB, Sigma-Aldrich/Merck

Millipore, São Paulo, Brasil). A atividade da MPO foi determinada utilizando uma mistura 1:4 de tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM). A reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (2M) e a absorbância foi analisada a 450 nm usando um espectrofotômetro. As leituras de absorbância foram plotadas em uma curva padrão de neutrófilos peritoneais de camundongos, como descrito por Dornelas-Filho e colaboradores (DORNELAS-FILHO et al., 2018). Os resultados obtidos foram expressos como atividade de MPO (neutrófilos/mg de tecido).

#### **4.5.2 Permeabilidade vascular cutânea pelo Método do Azul de Evans**

A permeabilidade vascular foi mensurada através do extravasamento do Azul de Evans. O corante Azul de Evans se liga à albumina que é uma proteína presente no plasma. Caso ocorra extravasamento de albumina para o interstício, resultando em edema, o corante é observado e a partir disso pode ser mensurado. Deste modo, os animais foram anestesiados e em seguida receberam injeções intradérmicas de solução salina e vinorelbina conforme descreve o protocolo I. Após a eutanásia, os animais tiveram a pele do dorso removida cirurgicamente e os discos de tecido epitelial foram embebidos em solução de formamida e mantidas por 12 hs a 65°C. Finalmente, a solução de formamida contendo o corante extravasado do tecido foi quantificada em espectrofotômetro a 630 nm e a quantidade de Azul de Evans extravasada foi expressa em µg/mL.

### **4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA**

#### **4.6.1 Análise qualitativa temporal da injeção intradérmica de vinorelbina**

Após a eutanásia dos animais, parte das amostras coletadas no Protocolo I, para determinar a concentração e tempo da indução da inflamação por vinorelbina, foram fixadas em formol tamponado 10%, processadas para coloração pelo método HE (hematoxilina-eosina) e observadas em microscópio óptico.

Inicialmente, foram observadas características histológicas como edema, dano nas fibras musculares, necrose e infiltrado inflamatório ao longo do tempo. Dessa forma, foi estabelecido as principais características alteradas no tecido epitelial após injeção de vinorelbina.

#### 4.6.2 Determinação dos escores e grau histológico do dano

Devido à ausência de escores histológicos descritos na literatura para lesão cutânea e a definição prévia das principais alterações envolvidas no dano histológico após a injeção de vinorelbina ao longo do tempo conforme descrito no item 4.6.1 foi proposto escores histológicos de dano à mucosa com adaptações do método previamente descrito para modelo de lesão por pressão elaborado por Wang e colaboradores (2016).

A análise histológica foi realizada por um patologista de forma cega e foram verificados danos na epiderme e fibras musculares, além da presença de inflamação (infiltrado inflamatório, edema, ectasia, hemorragia e necrose). Cada critério foi avaliado quanto à presença ou ausência e, para os dados de infiltrado inflamatório e edema, foram atribuídos escores quanto à intensidade. Atribuiu-se escore 0 (ausência de lesão) ou 1 (presença de lesão) para os parâmetros de lesão em fibras musculares, quais sejam a) Dissociação de fibras; b) Presença de atrofia das fibras; c) Centralização dos núcleos; e de Inflamação, quais sejam: a) Ectasia vascular; b) Hemorragia; c) Necrose. Quanto à intensidade de a) infiltrado inflamatório e b) edema, as alterações foram cada uma qualificadas como ausentes (escore 0), leve (escore 1), moderada (escore 2) ou intensa (escore 3) (**Tabela 1**). Ao final, as pontuações foram somadas e as lesões classificadas variando de ausente à intenso conforme detalha a **Tabela 2**.

Tabela 1 - Escores histológicos de lesão cutânea por vinorelbina no dorso de ratos

Características observadas	Escores histológicos			
	0	1	2	3
<b>Fibras musculares</b>				
Dissociação das fibras	Ausência	Presença	-	-
Presença de atrofia das fibras	Ausência	Presença	-	-
Centralização dos núcleos	Ausência	Presença	-	-
<b>Inflamação</b>				
Infiltrado inflamatório (Fenótipo)	Ausência	Leve	Moderado	Intenso
Edema	Ausência	Leve	Moderado	Intenso
Ectasia (vascular)	Ausência	Presença	-	-
Hemorragia	Ausência	Presença	-	-
Necrose	Ausência	Presença	-	-

Fonte: autoria própria.

Tabela 2 - Grau do dano cutâneo determinado pelo somatório dos escores histológicos

<b>Grau histológico do dano</b>	<b>Varição do somatório dos escores</b>
Ausência	0
Discreto	1-4
Moderado	5-8
Intenso	9-12

Fonte: autoria própria.

#### **4.7 EXPRESSÃO DE INOS E TNF-ALFA POR IMUNOFLOURESCÊNCIA 16 HORAS APÓS A INJEÇÃO DE VINORELBINA**

Foram obtidos cortes das lesões biopsiadas a partir de tecidos fixados em parafina. As lâminas contendo os cortes foram mantidas em estufa por 1 hora a 60°C, seguido por dois banhos em Xilol por 10 minutos para desparafinação dos tecidos. O excesso de Xilol e hidratação dos tecidos foi feito por banhos sucessivos de Etanol em concentrações decrescente de, a saber: 2 banhos de 10 min de Etanol absoluto; 1 banho de Etanol a 90%, 70%, 50% por 5 minutos, nessa ordem. As lâminas foram, então, lavadas em água corrente por 10 min, seguido por 3 banhos de PBS por 5 min, cada. A recuperação antigênica foi feita em Tampão Citrato de Sódio 0,1 M (pH 6,0), à temperatura de 95 °C, por 30 minutos, seguida de resfriamento, à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Após essa etapa foi feito 3 banhos de 5 min de PBS. A permeabilização das membranas foi feita em solução contendo 200 µL de PBS, 4 mL de Albumina Sérica Bovina (BSA) 5% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e 200 µL de triton X-100 0,1% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) durante 10 min. Em seguida, foram feitas 3 lavagens com PBS de 5 min cada. O Bloqueio das ligações inespecíficas foi feito com Glicina 0,3 M (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) em BSA 5% por 30 min. Os tecidos foram incubados em temperatura de 2 – 4°C, *overnight*, com os anticorpos primários feitos em coelho anti-TNF $\alpha$  (1:100, Sigma Aldrich, EUA), e rato anti-iNOS (1:250, Santa Cruz Biotechnology, EUA). Completado o tempo de incubação do anticorpo primário, foram feitas 3 lavagens de 5 min cada com PBS para posterior incubação com o anticorpo secundário de donkey, anti-igG de coelho (1:200) ou de rato (1:250), Alexa Fluor 568 (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) durante 1 hora e 30 min na mesma concentração estabelecida para o anticorpo primário. A partir desse ponto, as etapas que sucedem foram feitas protegidos da luz. Após o término da incubação do anticorpo secundário, foram feitas 3 lavagens com PBS durante 5 min cada. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) (4 µL em

200 mL de PBS) durante 30 min, seguido por lavagens sucessivas em água destilada, totalizando 3 lavagens de 5 min cada. Para montagem das lâminas, foi utilizado o meio Prolong Gold Antifade Mountant (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para a aquisição das fotomicrografias, foi utilizado um microscópio de fluorescência (ByoTek Cytation Imaging, Agilent, Santa Clara, CA, EUA).

As imagens obtidas foram analisadas através de um “software” de imagem (Fiji Image J, National Institutes of Health, Washington, DC, EUA). A quantificação da área fluorescente foi feita por diferenciação dos pixels fluorescentes relacionados a fluorescência vermelha (Alexa Fluor 568) e a coloração azul para a identificação dos núcleos celulares marcados com o DAPI. Foram estabelecidos limiares de cores de detecção, estes foram padronizados em todas as quantificações. Os dados obtidos foram expressos em área de fluorescência por meio da comparação da intensidade de fluorescência do marcador alvo com o DAPI (100%).

## **4.8 MIGRAÇÃO DE CÉLULAS PARA A CAVIDADE INTRAPERITONEAL**

### **4.8.1 Contagem total e diferencial**

O fluido peritoneal coletado no protocolo III, para análise da migração de neutrófilos induzida por vinorelbina, foi contabilizado por meio de contagem total e diferencial de células. Para a contagem global de células inflamatórias, foi adicionado 380µl de solução de Turk em 20µl do fluido peritoneal. O número de leucócitos totais foi contabilizado em câmara de Neubauer.

Para a contagem diferencial, 40µL do fluido peritoneal foi levado à citocentrífuga e submetido a rotação de 1000 rpm por 10 minutos. Dessa forma, foi obtido uma monocamada de células que foram, em seguida, coradas usando o kit da HEMA3 da Fisher Healthcare™. Finalmente, foi feita contagem diferencial das células com auxílio de microscópio óptico com objetiva de imersão (1000×). O número de macrófagos e mastócitos (mononucleares), neutrófilos e eosinófilos, foram contabilizados até o somatório de 100. Nesse ponto, foi considerado para análise, apenas, o número de neutrófilos.

## **4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Realizou-se o teste de Shapiro-Wilk para análise da normalidade dos dados. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M) para as variáveis com

distribuição normal ou pela mediana (mínimo-máximo) para as variáveis sem distribuição normal. A análise estatística entre os grupos foi realizada empregando-se a análise de variância (ANOVA) e teste de Bonferroni. Para as análises de curso temporal foi usado o teste de comparação múltipla de Sidak's. Os dados da análise de imunofluorescência e avaliação histopatológica foram expressos como mediana e intervalos com valores mínimos e máximos e analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis e Dunn. A significância foi estabelecida como  $p < 0,05$ . Para a realização dos testes estatísticos foi utilizado o Software GraphPad Prism®, versão 7.0.

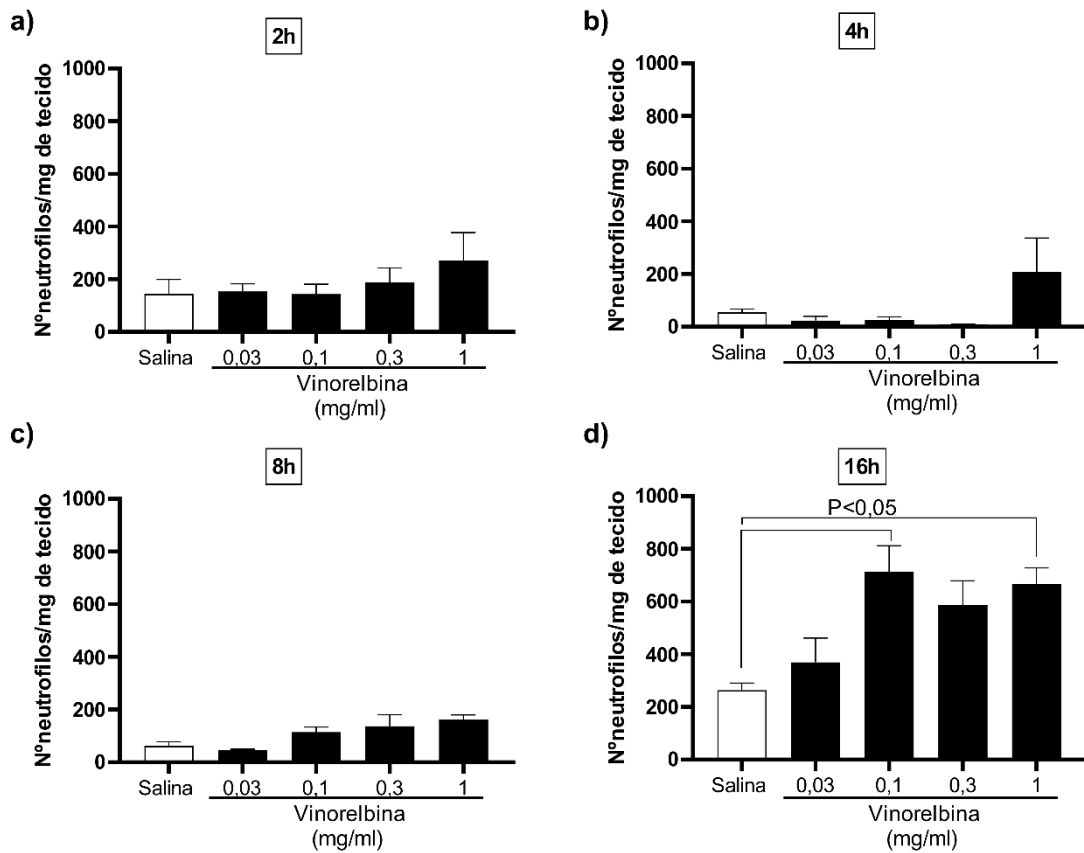
## 5 RESULTADOS

### 5.1 ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO) EM AMOSTRAS OBTIDAS DO DORSO DOS ANIMAIS

A injeção intradérmica de vinorelbina induziu um aumento significativo na atividade da MPO 16 horas após a sua administração ( $p < 0,05$ ). Não houve aumento significativo na atividade de MPO nos tempos de 2, 4 e 8 horas de eutanásia. No tempo de 16 horas, percebe-se que o aumento da atividade da MPO é concentração-dependente, ou seja, quanto maior a concentração de vinorelbina, maior a atividade de MPO, porém, somente as concentrações de 0,1 mg/100  $\mu$ l/sítio e 1 mg/100  $\mu$ l/sítio de vinorelbina induziram um aumento significativo na atividade de MPO quando comparados ao grupo controle com injeção intradérmica de solução 0,9% de soro fisiológico ( $p < 0,05$ ). Não houve aumento significativo na atividade de MPO nas concentrações de 0,03 mg/100 $\mu$ L/sítio e 0,3 mg/100  $\mu$ l/sítio (**Figura 4**).

A **Figura 5** ilustra o curso temporal dos dados da **Figura 4** em relação à análise da atividade de MPO após o estímulo inflamatório com injeção intradérmica de vinorelbina (1 mg/100  $\mu$ l/sítio) em comparação ao grupo controle (**Figura 5**). Estes experimentos iniciais demonstraram que a atividade de MPO encontra-se elevada no tecido onde foram injetados vinorelbina, causando uma inflamação aguda. O pico de infiltração de neutrófilos nos tempos testados foi estabelecido no tempo de 16 horas após o estímulo com vinorelbina 1 mg/100  $\mu$ l/sítio.

Figura 4 - A injeção intradérmica de vinorelbina aumenta o infiltrado neutrofilico.

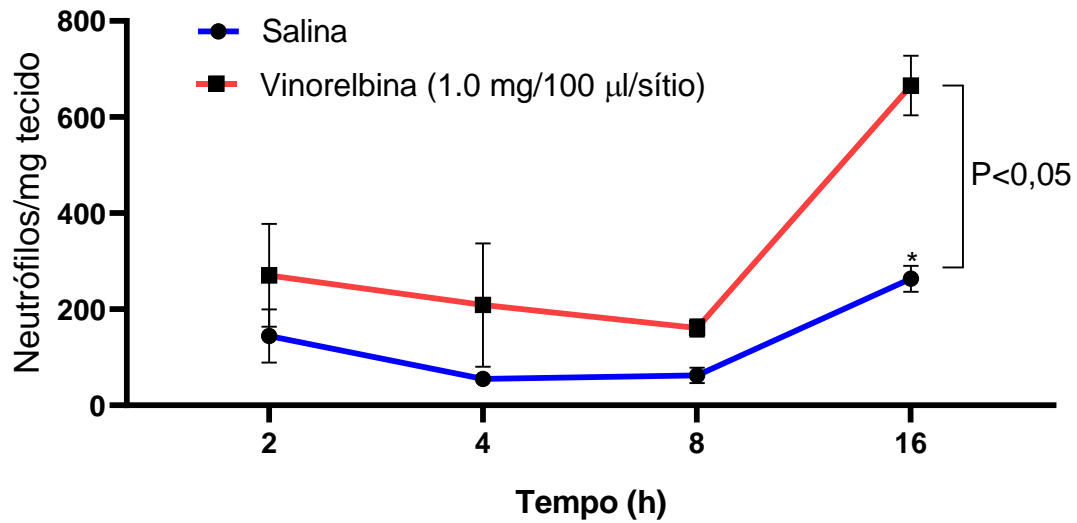


Fonte: autoria própria.

A atividade da mieloperoxidase é mantida em níveis basais após 2 horas (a), 4 horas (b) e 8 horas (c). Contudo, após 16 horas (d), a injeção de vinorelbina (0,1 e 1 mg/100 $\mu$ l/sítio) aumenta a migração de neutrófilos para a área afetada. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM dos resultados. A significância estatística foi estabelecida em  $P < 0,05$ .



Figura 5 - Curva temporal da atividade de mieloperoxidase (continua).



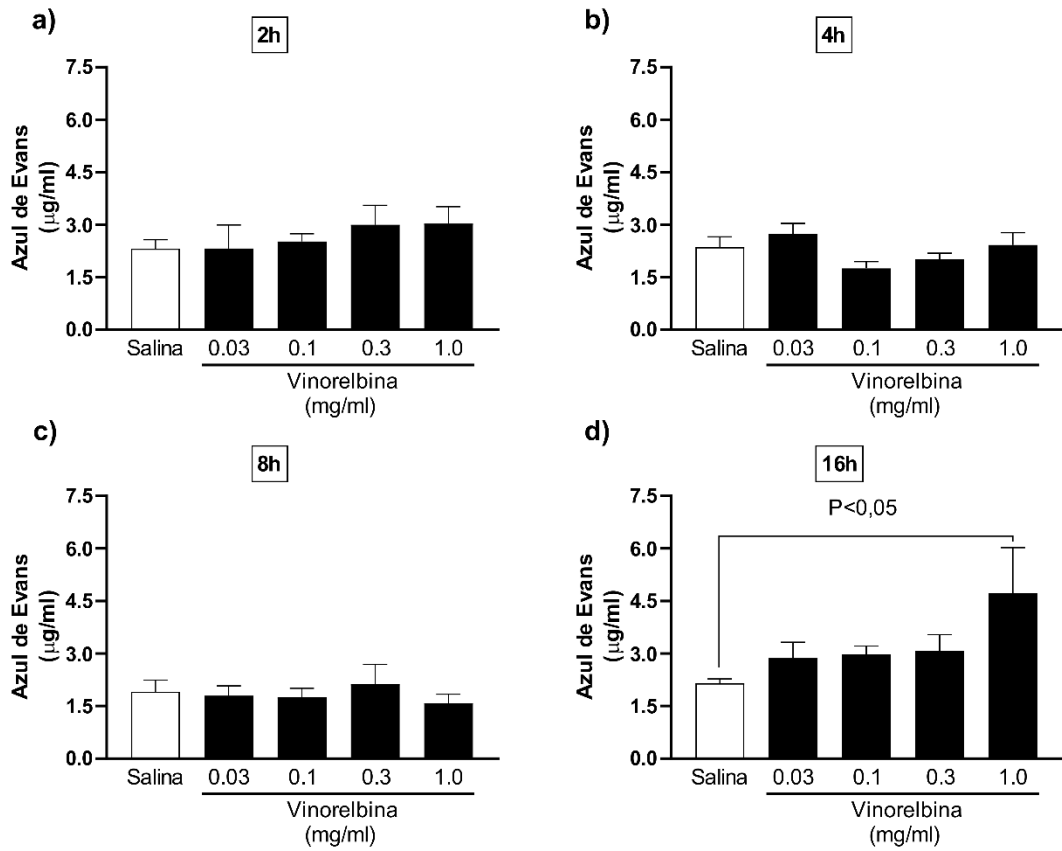
Fonte: autoria própria.

O gráfico representa a atividade da MPO após a injeção de vinorelbina (1 mg/100µl/sítio) (vermelho) e de salina (azul) ao longo do tempo. A análise indica que a atividade da MPO é aumentada significativamente 16 horas após a injeção de vinorelbina versus o grupo salina. A diferença também ocorre no curso temporal do grupo salina, onde há aumento do infiltrado no tempo de 16 horas se comparado aos tempos de 2, 4 e 8 horas. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM dos resultados. A significância estatística, \*, foi estabelecida em  $P < 0,05$ .

## 5.2 PERMEABILIDADE VASCULAR CUTÂNEA AO AZUL DE EVANS

A injeção intradérmica de vinorelbina 1 mg/ml induziu a um aumento significativo na permeabilidade vascular cutânea 16 horas após a eutanásia dos animais quando comparado ao grupo controle, o qual recebeu uma injeção intradérmica de SF 0,9% ( $p < 0,05$ ). Não houve aumento significativo na permeabilidade nos grupos de 2, 4 e 8 horas de eutanásia, nem nas concentrações de 0,03, 0,1 e 0,3 mg/100 µl/sítio de vinorelbina (**Figura 6**). A **Figura 7** ilustra o curso temporal de estabelecimento da permeabilidade vascular ao Azul de Evans frente à injeção de vinorelbina (1 mg/100 µl/sítio).

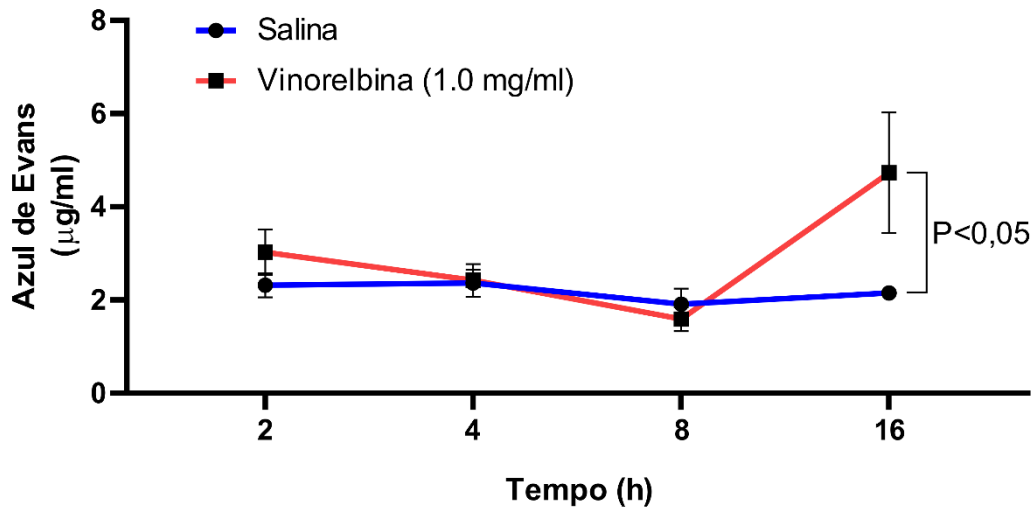
Figura 6 - A vinorelbina induz edema cutâneo.



Fonte: autoria própria.

A Permeabilidade vascular cutânea avaliada pela mensuração do extravasamento do corante Azul de Evans mostra níveis basais após 2 horas (a), 4 horas (b) e 8 horas (c), alcançando níveis elevados de edema 16 horas (d) após a administração de vinorelbina, na concentração de 1,0 mg/100 µl/sítio. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM dos resultados. A significância estatística foi estabelecida em  $P < 0,05$ .

Figura 7 - Curva temporal da permeabilidade vascular.



Fonte: autoria própria.

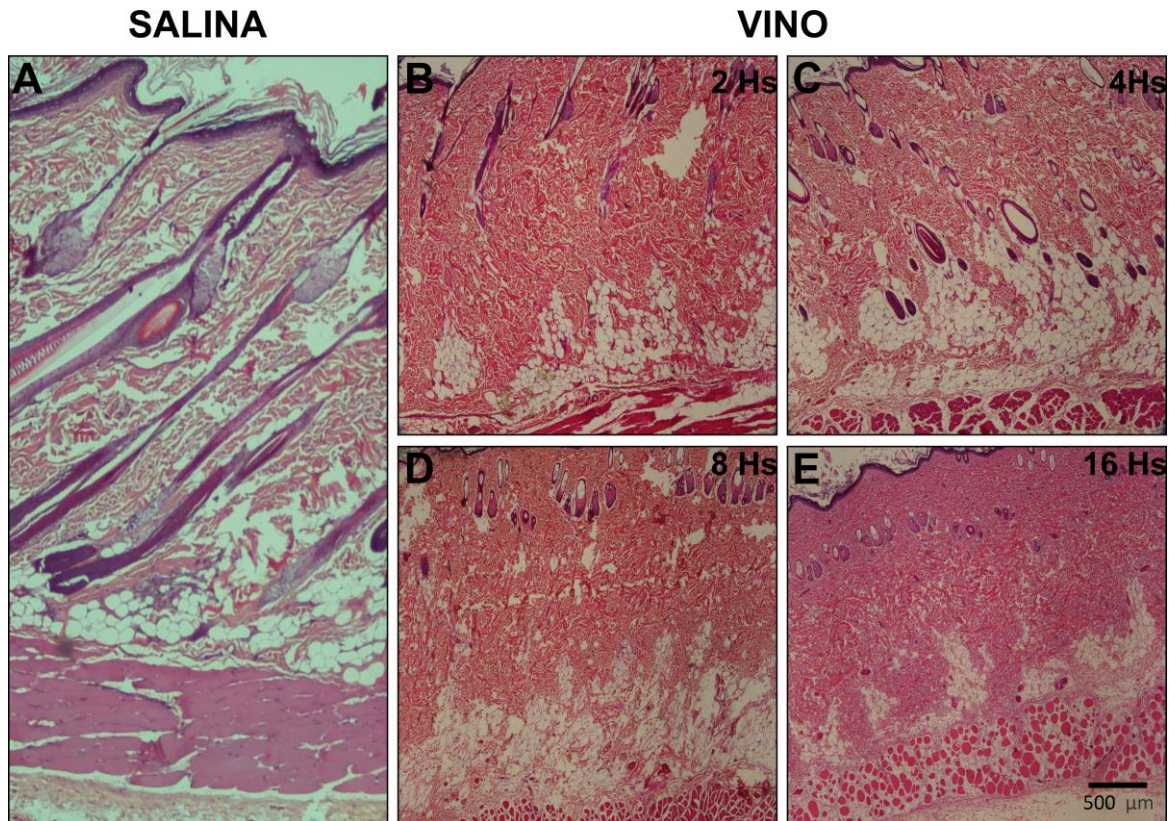
O gráfico representa a variação da permeabilidade vascular ao corante Azul de Evans no grupo vinorelbina (1,0 mg/100 µl/sítio) (vermelho) e grupo salina (azul) em ao longo do tempo (2, 4, 8 e 16 horas). A injeção intradérmica de vinorelbina aumenta o edema comparado ao grupo salina após 16 horas de administração. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM dos resultados. A significância estatística foi estabelecida em  $P < 0,05$ .

### 5.3 ANÁLISE QUALITATIVA TEMPORAL DA INJEÇÃO INTRADÉRMICA DE VINOURELBINA SOBRE AS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM AMOSTRAS DE PELE DE DORSO DE RATO.

Na **Figura 8A**, injeção com SF 0,9%, temos corte apresentando pele e camada muscular. Observa-se a derme constituída por tecido conjuntivo onde se destaca na figura um folículo piloso. Logo abaixo observam-se os adipócitos e, por fim, a camada muscular. As estruturas se apresentam organizadas e sem sinais de inflamação. Após 2 horas de injeção intradérmica de vinorelbina (1 mg/100 µl/sítio), existiram evidências de formação de edema, podia-se observar núcleo e membrana nas células, as células musculares possuíam algumas estrias preservadas em algumas áreas e outras áreas apresentavam-se com perda das estrias (**Figura 8B**). Não se observaram áreas de necrose (**Figura 8B**). Após 4 horas de injeção intradérmica de vinorelbina na concentração citada, observa-se a presença de necrose causada por ação citotóxica direta da vinorelbina no tecido, mas não são observadas células inflamatórias (**Figura 8C**). Após 8 horas de injeção intradérmica de vinorelbina, observa-se a presença de necrose coagulativa. As

células já são observadas com ausência de núcleo (**Figura 8D**). E após 16 horas de injeção intradérmica de vinorelbina, a pele encontra-se com estruturas desorganizadas, células sem núcleo, algumas áreas com núcleos eosinofílicos e fragmentados, perda de estrias das células musculares e intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear e macrófagos (**Figura 8E**).

Figura 8 - A vinorelbina induz lesão tissular cutânea de forma tempo-dependente.



Fonte: autoria própria.

As fotomicrografias representam fragmentos de pele do dorso de ratos coradas com H&E após administração intradérmica de SF (0,9%) (A) ou vinorelbina (1 mg/100μL/sítio) após 2 horas (B), 4 horas (C), 8 horas (D) e 16 horas (E). As imagens apresentam magnificação de 40 ×.

#### 5.4 PADRONIZAÇÃO DE HISTOESCORES PARA A LESÃO CUTÂNEA INDUZIDA POR VINOELBINA E EFEITO PROTETOR DA DEXAMETASONA

As amostras sem lesão eram constituídas por epiderme representada por epitélio escamoso ceratinizado sob o qual havia derme de tecido conjuntivo fibroso denso mostrando anexos cutâneos seguida por camada de adipócitos e tecido muscular esquelético. Abaixo do músculo havia tecido conjuntivo frouxamente disposto permeado por feixes nervosos. Foram analisadas alterações nas fibras musculares quanto a dissociação das fibras, atrofia das fibras e



Tabela 3 - Escores histológicos de lesão por critério patológico (conclusão).

Características analisadas	Escores histológicos dos grupos experimentais																	
	salina					vinorelbina (1,0 mg/ml)						dexa (3 mg/kg) + vino (1,0 mg/ml)						
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	
Infiltrado inflamatório	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	3 <sup>c</sup>	3 <sup>c*</sup>	3 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup>	
Edema	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Ectasia	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Hemorragia	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	
Necrose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>Total dos escores</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	

Fonte: autoria própria.

<sup>a</sup> perda/fragmentação de fibras musculares

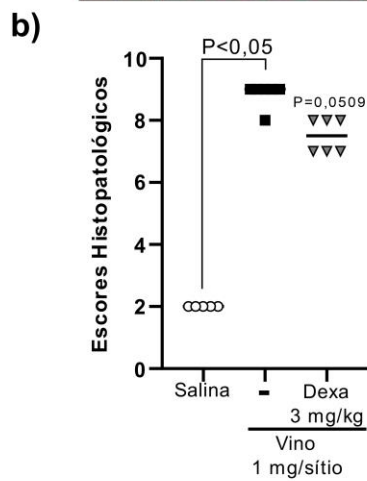
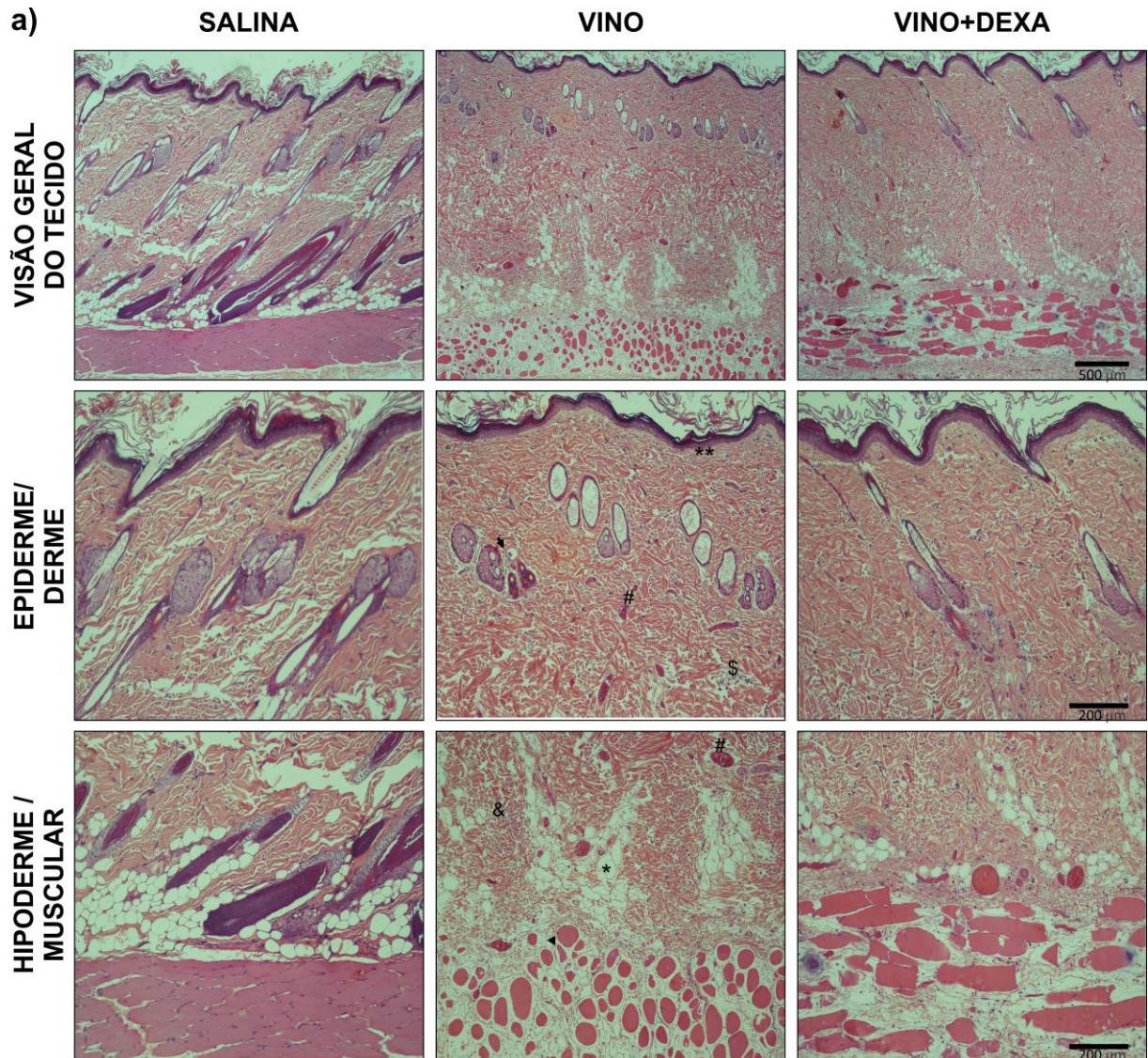
<sup>b</sup> infiltrado mononuclear

<sup>c</sup> infiltrado leucocitário/polimorfonuclear

\*difuso

Resumidamente, após 16 horas da injeção intradérmica de solução de vinorelbina (1 mg/100 µl/sítio) existiram evidências histológicas de formação de um processo inflamatório e dano intenso à epiderme, derme mais profunda e camada muscular onde pode-se observar formação de edema, destruição de fibras musculares, infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares com predominância de macrófagos, desorganização das estruturas celulares caracterizadas por áreas amorfas, necrose e hiperpigmentação dos núcleos (picnose), fragmentação dos núcleos (cariorrexe), desaparecimento dos núcleos (cariorrexe avançada) e perda de estrias nas células musculares (Figura 7). A Figura 7A ilustra a visão histológica representativa dos tecidos grupos salina, vinorelbina (Vino) e Dexametasona associada à vinorelbina (Dexa + vino). Os painéis B e C da **Figura 9** representam a análise estatística comparativa dos dados catalogados na **Tabela 3**.

Figura 9 - Dexametasona atenua parcialmente o dano histológico induzido pela vinorelbina



c)

Grupos	Mediana (min-máx)	Grau histológico do dano
Salina	2(2-2)	Discreto
Vino	9 (8-9)	Intenso
Dexa+ Vino	7,5 (7-8)	Moderado

Fonte: autoria própria.

As imagens histológicas coradas com H&E dos grupos salina e vinorelbina sozinho ou combinado com dexametasona (a). No grupo vinorelbina é percebido adelgaçamento da epiderme (\*\*), perda do folículo

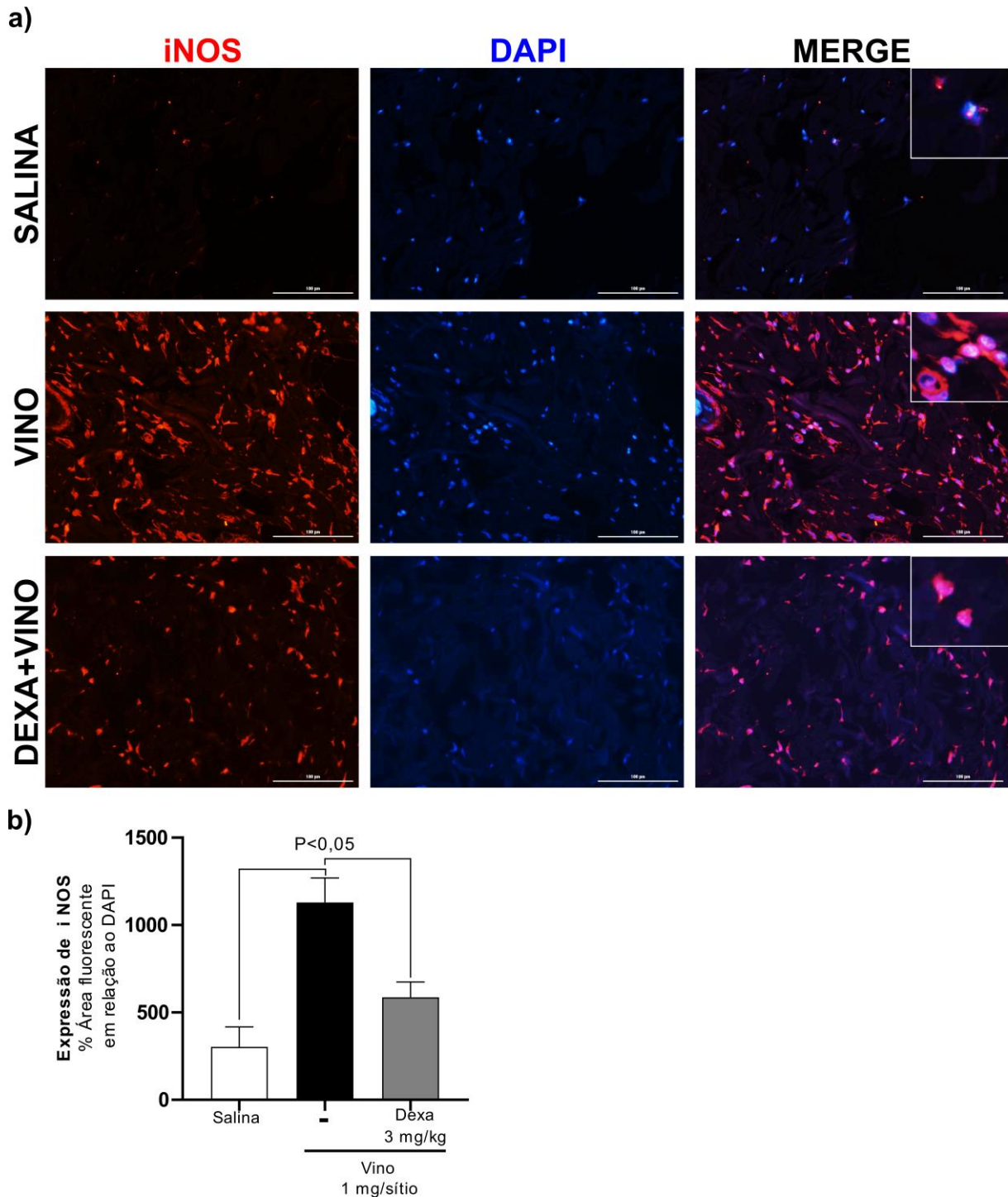
piloso (seta preta), focos de hemorragia (#), infiltrado inflamatório (\$), desorganização das fibras colágenas (&), edema (\*) e dissociação e atrofia da fibra muscular (cabeça de seta). A somatória dos histocores (b) no grupo vinorelbina induz dano intenso, já o tratamento com dexametasona atenua o dano para grau moderado (c). O gráfico representa a mediana da somatória dos histocores. A significância estatística foi estabelecida em  $P < 0,05$ .

#### 5.5 EXPRESSÃO DE INOS POR IMUNOFLORESCÊNCIA EM LESÃO CUTÂNEA POR VINOELBINA E EFEITO DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA EM RATOS.

De acordo com os critérios de imunofluorescência utilizados, 16 horas após a injeção intradérmica de vinorelbina (1 mg/100  $\mu$ l/sítio) em pele de rato, houve um aumento na expressão de iNOS principalmente na derme superficial e profunda indicando que a vinorelbina provocou danos nessas estruturas. A expressão foi menor no grupo tratado com dexametasona (3 mg/kg) 1,5 h antes da vinorelbina, indicando que as alterações na derme superficial e profunda foram reduzidas (**Figura 10**).



Figura 10 - A lesão cutânea provocada por vinorelbina aumenta a expressão de iNOS.



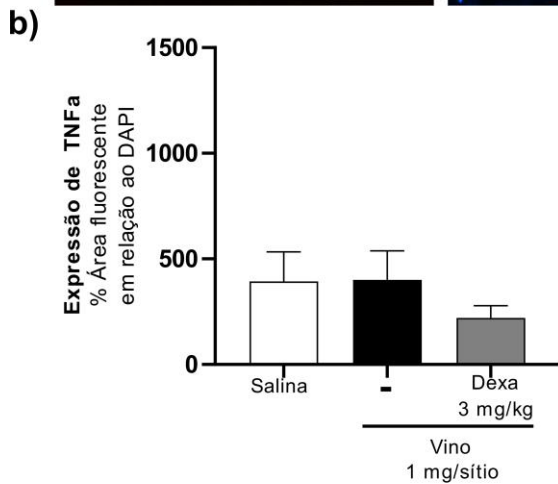
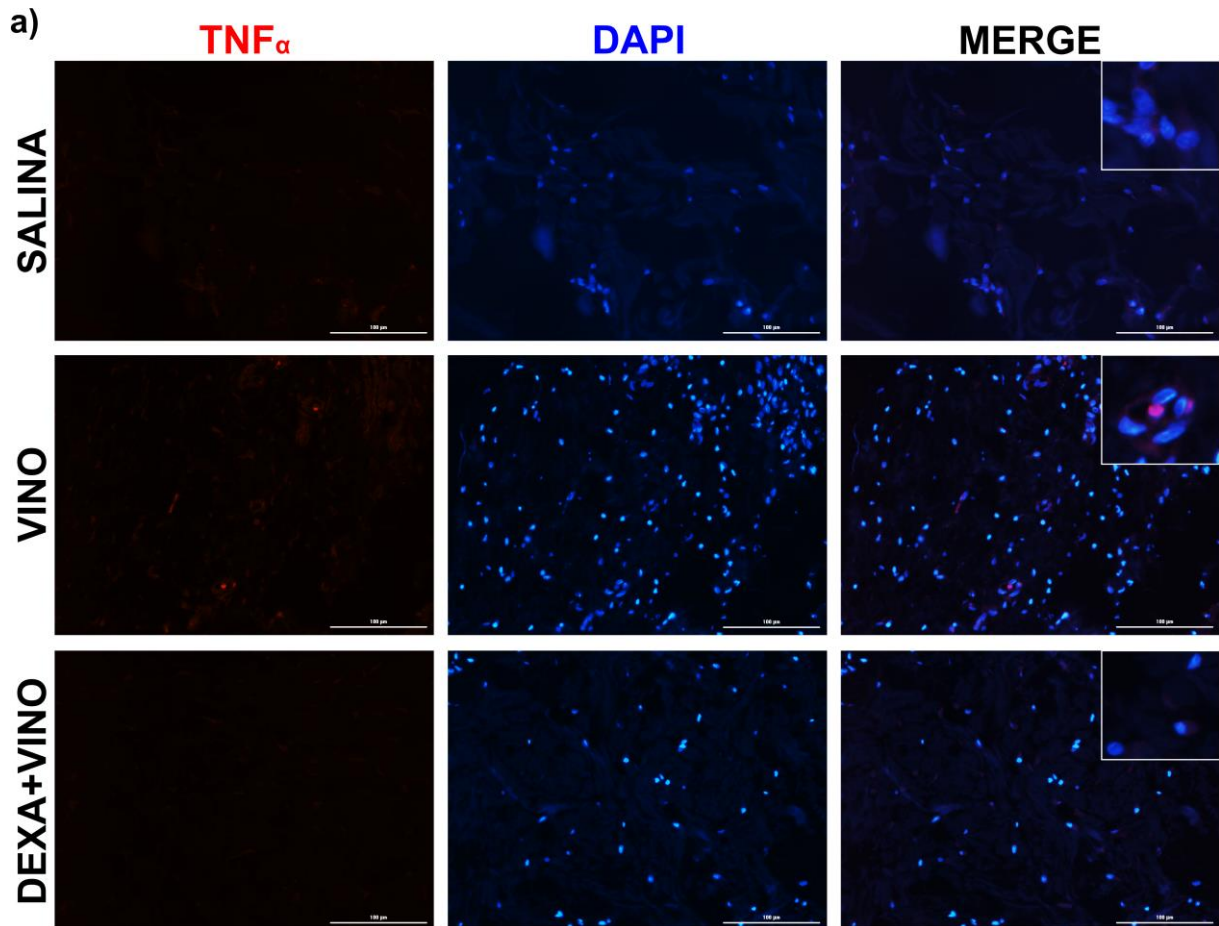
Fonte: autoria própria.

Imagens representativas da expressão de iNOS por imunofluorescência na escala de 100  $\mu$ m nos grupos salina e vinorelbina isolada ou combinada com dexametasona (a). A vinorelbina (1mg/100  $\mu$ l/sítio) induziu a expressão de iNOS medido 16 horas após o estímulo, o que foi reduzido pela dexametasona (b). Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM dos resultados. A significância estatística foi estabelecida em  $P < 0,05$ .

## 5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TNF $\alpha$ POR IMUNOFLOURESCÊNCIA EM LESÃO CUTÂNEA INDUZIDA POR VINOURELBINA.

Não foi observada expressão de TNF $\alpha$  16 horas após a injeção intradérmica de vinorelbina (1 mg/100  $\mu$ l/sítio) em pele de rato (**Figura 11**).

Figura 11 - O TNF $\alpha$  não foi expresso 16 horas após a indução de lesão cutânea por vinorelbina.



Fonte: autoria própria.

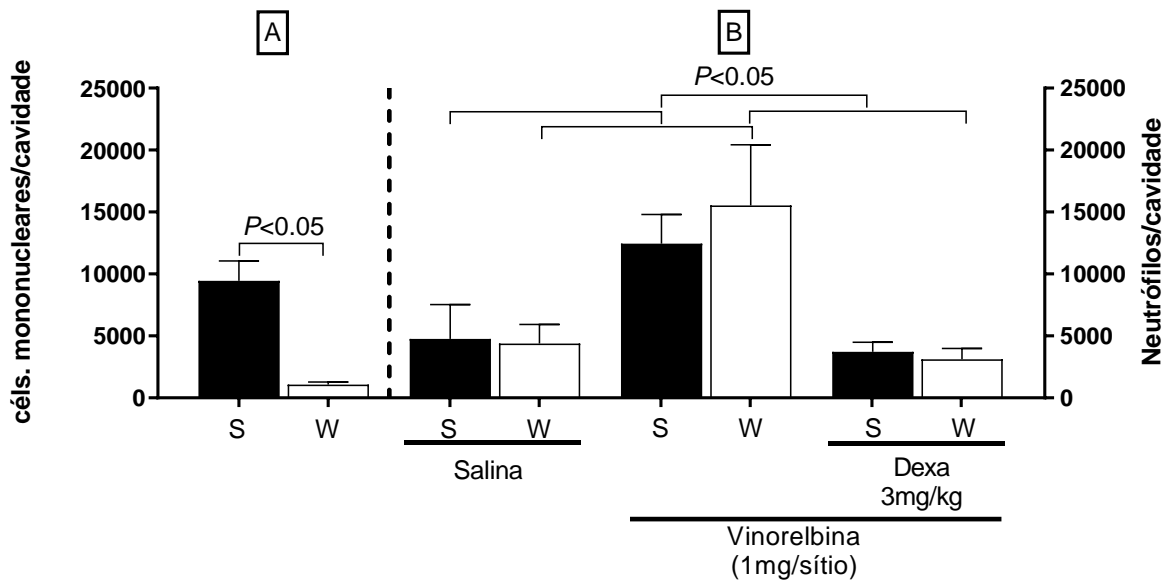
Imagens representativas da expressão de TNF $\alpha$  por imunofluorescência na escala de 100  $\mu$ m nos grupos salina e vinorelbina isolada ou combinada com dexametasona (a) e porcentagem da área de fluorescência (b). Os gráficos representam a média  $\pm$  SEM dos resultados. A significância estatística foi estabelecida em  $P < 0,05$ .

### 5.7 EFEITO DA DEPLEÇÃO DE CÉLULAS RESIDENTES PERITONEAIS SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDA POR VINOURELBINA

A Figura 12A mostra que a lavagem peritoneal foi eficiente em promover a depleção de células mononucleares residentes quando comparado ao grupo sham, que não teve a cavidade lavada ( $P < 0,05$ ). Adicionalmente, a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela administração intraperitoneal de vinorelbina 1mg/mL foi significativamente aumentada em relação aos controles com administração intraperitoneal de somente SF 0,9%. No grupo de animais que tiveram o peritônio lavado previamente, a administração de vinorelbina induziu um aumento significativo na migração de neutrófilos quando comparado ao grupo controle lavado e administrado apenas SF 0,9% (**Figura 12B**).

Nota-se também que no grupo onde foi administrada vinorelbina, houve um aumento significativo na migração de neutrófilos no grupo lavado em relação ao grupo não lavado e que também recebeu vinorelbina (**Figura 12B**). A administração prévia de dexametasona 3mg/Kg subcutânea 1 hora e 30 minutos antes de administrar o estímulo inflamatório com vinorelbina intraperitoneal, reduziu significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal tanto no grupo lavado, como no não lavado (**Figura 12B**). As diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) foram notadas também entre o grupo não lavado e administrado Vinorelbina e o grupo não lavado administrado dexametasona 1 hora e 30 minutos antes da administração de vinorelbina, onde neste a migração de neutrófilos foi significativamente reduzido ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo apenas com Vinorelbina. Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre o grupo lavado e administrado Vinorelbina e o grupo lavado e administrado dexametasona e vinorelbina, onde neste houve uma redução significativa na migração de neutrófilos em comparação ao grupo com administração de vinorelbina sem a dexametasona prévia.

Figura 12 - A vinorelbina induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de forma independente de células residentes.



Fonte: autoria própria.

(A) A lavagem peritoneal depleta as células residentes. (B) Verifica-se o aumento da migração de neutrófilos no grupo vinorelbina. Esse aumento é percebido quando comparado ao grupo salina. Adicionalmente, a dexametasona (dexa) previne a acumulação de neutrófilos no peritônio. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. A significância estatística foi estabelecida em  $P < 0,05$ . S = sham; W = cavidade lavada/depletada de células mononucleares.

## 6 DISCUSSÃO

Os alcaloides da vinca são drogas promissoras no combate ao câncer devido ao seu mecanismo de ação que consiste em uma ligação aos microtúbulos formando um complexo tubulina-alcaloide que inibe a migração das células tumorais diminuindo seu potencial metastático, o que resulta na morte programada e consequente apoptose destas células (DHYANI, Praveen et al., 2022). No entanto, existem limitações terapêuticas que tornam o tratamento mais difícil. Além de limitações farmacocinéticas, existem também uma série de efeitos colaterais que podem prejudicar alguns pacientes. Dentre estes efeitos, tem-se a lesão por extravasamento que pode causar uma grave inflamação quando a vinorelbina extravasa para os tecidos. Dada a dificuldade de manejo clínico, este trabalho contribuiu com a elaboração de um modelo experimental visando o melhor conhecimento da patogênese e o estudo de drogas com potencial terapêutico.

A lesão por extravasamento é uma complicação que apesar de pouco incidente, gera preocupação haja vista que sua utilização tem crescido bastante nos últimos tempos, e, não apenas isto, a lesão por extravasamento quando acontece gera bastante aflição para o paciente e para a equipe de saúde. Estudar como a lesão se desenvolve parece ser oportuno, pois não existe um consenso de como tratar adequadamente a lesão instaurada e a literatura dispõe de poucos estudos que permita isso.

Desta forma, na comunidade científica, alguns modelos experimentais animais têm sido empregados com o objetivo de testar o potencial vesicante de alguns antineoplásicos bem como estudar drogas que possam atenuar seus efeitos adversos. Em 2022, Keritam e colaboradores estudaram os efeitos do extravasamento de irinotecano nanolipossomal e trabectedina em camundongos e verificaram que apenas a trabectedina possui potencial vesicante. A injeção subcutânea de trabectedina causa a formação de eritema em camundongos no segundo dia, que progride para ulcerações na pele no quinto dia experimental. Além disto, observaram que o tracolimus e DMSO tópicos reduzem os efeitos vesicantes da trabectedina (KERITAM et al., 2022).

Outro estudo, compararam-se as lesões por extravasamento causadas por vinorelbina e docetaxel, confirmando que a vinorelbina possui maior potencial vesicante, podendo causar maior dano tecidual em comparação com o docetaxel. Este, na concentração de 6 mg/ml, provoca necrose, porém em menor grau de extensão e profundidade do que a vinorelbina (0,8 mg/sítio) (ZHU et al., 2014). O padrão de lesão associado ao docetaxel envolveu a degeneração epidérmica e dérmica, necrose e dissolução gordurosa e restos nucleares difusos no tecido

subcutâneo, além de restos nucleares e células inflamatórias identificadas na camada muscular e lesão no folículo piloso (ZHU et al., 2014).

De todos os modelos animais de lesão por extravasamento disponíveis, o induzido por doxorubicina é o mais largamente estabelecido. O primeiro a ser descrito foi em 1992 por Schwartzmann e colaboradores, situação na qual aplicou-se a 0,625 mg de doxorubicina por sítio. Documentou-se uma hiperemia dentro de um período de 48h, seguido de necrose e ulceração entre 96 e 120h pós injeção do quimioterápico (SCHWARTSMANN et al., 1992). A partir desse modelo, muitos compostos ou estratégias com potencial protetor foram testados, como por exemplo, N-acetilcisteína (SCHWARTSMANN et al., 1992), hialuronidase (DISA et al., 1998), oxigênio hiperbárico (MONSTREY et al., 1997), dapsona (SOMMER et al., 2002), melatonina (KESIK et al., 2010), ozônio (KESIK et al., 2016) e injeção de tecido adiposo (BICER et al., 2022). Contudo, todos descreveram a lesão de forma puramente qualitativa, sem que um escore específico de lesão por extravasamento fosse constituído.

Uma abordagem alternativa, porém, em nossa opinião, inadequada, de implementação de escores foi aplicada em parte desses estudos. O enfoque teve como base a descrição dos achados inflamatórios conforme relatados por Verhofstad e colaboradores em um estudo de cicatrização de anastomose colônica em ratos diabéticos, pontuando os graus de necrose, edema infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (VERHOFSTAD et al., 2001; BICER et al., 2022). Devido à organização histológica diferente entre o tecido colônico e a pele, ressaltamos a necessidade de se desenvolverem um histoescor mais apropriados. O presente estudo deu um primeiro passo neste sentido.

De forma análoga aos modelos descritos anteriormente, Yu e colaboradores (2011) propuseram um modelo de lesão por extravasamento induzida por vinorelbina, a qual foi injetada na concentração de 0.4 mg/sítio, representando uma concentração bem inferior à do presente estudo. Além dessa concentração menor, o modelo se destacou pela avaliação do padrão de lesão por até 18 dias. Contudo, houve apenas uma descrição qualitativa dos achados histopatológicos, com destaque à necrose e ulceração da pele (YU et al., 2011), ausentes em nosso modelo por se tratar de uma lesão aguda. Por outro lado, no presente estudo, conseguimos reproduzir em animais uma lesão bem próxima das encontradas no âmbito clínico, o que foi útil para confirmar o potencial vesicante da vinorelbina e estudar como se dá o curso da lesão.

Na prática clínica a vinorelbina quando extravasa em acesso venoso periférico causa intensa irritação manifestados pelos pacientes como dor e queimação no local de infusão, seguido por edema (RADAEL et al., 2016). Esses achados corroboram com o que observamos quando os animais que, em raras situações, não estavam totalmente anestesiados, os quais

manifestavam dor no momento em que a vinorelbina era administrada intradermicamente. Observamos, também, o aparecimento de rubor e edema que se intensificavam com o passar das horas. Nos pacientes, as feridas cutâneas podem aparecer em até três dias depois da infusão e se não tratadas podem causar necrose tecidual e danos funcionais (RADAEL et al., 2016). No presente estudo, o aparecimento do edema também foi confirmado na análise histológica das lesões e pelo extravasamento do Azul de Evans.

Um ponto chave na presente descrição de modelo experimental envolveu o discernimento entre os achados de alterações em fibras musculares e o componente inflamatório. Uma limitação do nosso estudo foi a abordagem até 16h da exposição à vinorelbina. Decerto, o histoescoré proposto abre espaço para aprimoramentos, visto que potenciais novas alterações podem ser identificadas em um tempo maior de exposição do animal ao quimioterápico. Contudo, toda intervenção terapêutica emergencial ocorre dentro das primeiras 12h do evento de extravasamento. Assim, a presente descrição garante a testagem de protocolos preventivos de danos agudos associados a esta condição clínica.

Outro ponto em favor da abordagem ora apresentada e o potencial de translação dos achados experimentais para o contexto clínico foi a concentração de vinorelbina testada. A diluição clínica da vinorelbina para administração por infusão em pacientes oncológicos é de 10 mg/20 ou 50 ml de solução fisiológica 0,9%, o que representa 0,2 a 0,5 mg/ml (IBRAHIM et al., 2001; CARABANTE-OCÓN et al., 2005). No presente estudo, estratificou-se a solução de vinorelbina aplicada por via intradérmica em concentrações que variaram de 0,03 a 1 mg/100 µl/sítio. Desta forma, houve plena racionalidade e aproximação entre o planejamento experimental e a situação de vida real clínica em que o extravasamento pode ocorrer.

Com a vinorelbina injetada na pele do dorso dos animais nas diferentes concentrações avaliadas, evidenciamos que os efeitos deletérios são concentração-dependente, ou seja, quanto maior a concentração de vinorelbina, maior a inflamação. A concentração de 1mg/sítio de vinorelbina foi a que, dentre as outras doses, causou uma maior completude de achados patológicos, como a inflamação confirmada através da dosagem da mieloperoxidase (MPO), uma hemeperoxidase presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, sendo, portanto um indicador de inflamação onde sua exacerbação está relacionada no desenvolvimento de algumas doenças inflamatórias bem como situações de estresse oxidativo. Além de fornecer ação antimicrobiana, a mieloperoxidase mesmo na ausência de infecção, provoca danos no DNA das células por aumentar a inflamação e conseqüente injúria aos tecidos (FERREIRA et al, 2017; LUCCHESI et al, 2005; NDREPEPA, Gjin 2019).

O edema tecidual, medido pelo extravasamento do azul de Evans, foi estatisticamente

significativo 16 horas depois da administração de vinorelbina 1 mg/sítio, o que corrobora com os resultados encontrados na dosagem de MPO. Com estes resultados, estabelecemos a concentração de 1mg/sítio e o tempo de 16 horas como os parâmetros que causaram maior inflamação. De fato, os achados microscópicos também evidenciaram formação de edema tanto nos grupos administrados apenas com vinorelbina quanto nos grupos tratados com dexametasona previamente. Resultados semelhantes foram encontrados quando a permeabilidade vascular ao azul de evans aumentou 12 horas após a cistite induzida por ifosfamida (MACEDO, 2010). Estes achados tornam em evidência que os antineoplásicos possuem ação edematogênica em vários de manifestações adversas.

Em situações clínicas, as lesões causadas por extravasamento de quimioterápicos podem ter seus agravos diminuídos quando percebidas a tempo e iniciados o protocolo de tratamento que consiste primeiramente na interrupção da infusão e aspiração da droga infundida, compressas mornas na região afetada, aplicação de anti-inflamatório tópico e oral (KREIDIEH; MOUKADEM; EL SAGHIR, 2016). Embora não exista um consenso acerca da utilização de antídotos quando se ocorre extravasamento de quimioterápicos antineoplásicos, alguns corticoides têm sido utilizados empiricamente (MELO et al., 2020).

Segundo alguns estudos, corticosteroides tópicos podem ser usados para reduzir a inflamação em torno do extravasamento local (MELO et al., 2020). Entretanto, os mecanismos de lesão por extravasamento de quimioterápicos podem diferir a depender da droga, sugerindo-se, inclusive, que algumas lesões podem cursar sem um processo inflamatório subjacente (FIDALGO et al., 2012). Além disso, há relatos de que o uso de corticosteroides pode agravar o dano tecidual quando do extravasamento de alcaloides da vinca (SUGIMOTO et al., 2012).

Os glicocorticoides são potentes inibidores de enzimas e citocinas pro-inflamatórias e seu mecanismo de ação tem sido estudado em efeitos adversos causados por antineoplásicos. De forma evidente, o presente modelo experimental foi caracterizado, pela acumulação de neutrófilos no sítio de lesão, acompanhado pela expressão aumentada de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), uma enzima muito importante na geração de altas concentrações do radical livre óxido nítrico (NO) (CINELLI et al., 2020). Assim, optamos por testar a dexametasona como possível inibidora da inflamação induzida por Vinorelbina.

No presente estudo, o efeito anti-inflamatório da dexametasona foi confirmado nos achados histopatológicos das lesões, onde o infiltrado inflamatório e a hemorragia foram atenuados no grupo tratado com dexametasona previamente em comparação ao grupo com vinorelbina isolada. Desta forma, em nossa proposta de classificação de dano tecidual, os danos no grupo tratado com dexametasona foram classificados como moderados enquanto que a



vinorelbina isolada causou um dano intenso. Resultados semelhantes também foram encontrados em ensaio experimental em outras toxicidades da quimioterapia oncológica, onde a associação de dexametasona a mesna, o tratamento convencional utilizado para minimizar a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, levou a uma potencialização do efeito uroprotetor do mesna, confirmando a capacidade desse esteroide na inibição de mediadores pró-inflamatórios (VIEIRA et al., 2003).

Notoriamente, a migração leucocitária para o sítio de inflamação é diminuída com a administração de glicocorticoides. Tal fato se dá pela diminuição da síntese de citocinas importantes para a ativação neutrofílica como, por exemplo, o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), que ao ser liberado por macrófagos ativados induz a produção de iNOS. Danos como edema, ulceração, neovascularização, hemorragia e necrose têm sido associados não apenas a metabólitos derivados dos antineoplásicos em várias toxicidades, mas também à liberação de mediadores pró-inflamatórios como NO, Interleucina-1 (IL-1), TNF- $\alpha$  e Ciclooxigenase-2 (COX-2) (RIBEIRO et al., 2002; RIBEIRO et al., 2016). Alguns estudos já publicados anteriormente evidenciam o papel destas citocinas em processos inflamatórios. O TNF produzido por macrófagos ativados foi encontrado em níveis elevados no plasma de pacientes sépticos e está associado a uma alta mortalidade em situações de sepse (CASEY; BALK; BONE, 1993; DEBETS et al., 1989). RIBEIRO et al. (2002) também demonstraram que o TNF- $\alpha$  é uma citocina importante envolvida na cistite hemorrágica causada por ifosfamida e sugeriu que a expressão de iNOS era dependente da produção de IL-1 e TNF- $\alpha$ . De fato, a expressão de iNOS tem sido encontrada em doenças autoimunes como artrite, e outros processos inflamatórios como sepse, infecções do trato urinário humano e rejeição de órgãos transplantados, tal expressão é importante para a produção e liberação de NO para promover resposta inflamatória (IALENTI et al., 1992; CUNHA et al., 1994; WHEELER; SMITH; WEISS, 1999; VORA et al., 1997; RIBEIRO et al., 2002; RIBEIRO et al., 2016).

Neste contexto, decidimos continuar investigando como esses mediadores estariam participando da inflamação cutânea causada por vinorelbina. Nossos resultados mostraram que a expressão por imunofluorescência de iNOS nas biópsias das lesões estava aumentada 16 horas após a injeção de vinorelbina. Em contraste, o TNF- $\alpha$  não teve sua expressão observada no mesmo grupo. A ausência do TNF- $\alpha$  não exclui sua participação na patogênese da lesão por extravasamento induzida pela vinorelbina. Como o TNF- $\alpha$  tem sido relatado como um indutor da expressão de iNOS (RIBEIRO et al., 2002; LIMA-JÚNIOR et al., 2012), é plausível que o mesmo tenha sido expresso em etapas iniciais da lesão e que às 16 horas após o estímulo

inflamatório o TNF $\alpha$  possivelmente teria sido degradado, não sendo possível observar sua expressão. Essa hipótese, contudo, não foi testada no presente estudo.

Sabe-se que a inflamação é um evento importante na ativação e recrutamento de macrófagos. Após ativados, estes macrófagos secretam diversas citocinas que têm uma variedade de efeitos locais e distantes. Microrganismos ao infectarem um hospedeiro causam inflamação que por sua vez ativam macrófagos e secretam citocinas como Interleucina -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-12 (IL-12), Interleucina-8 (IL-8) e TNF- $\alpha$ . A inflamação causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* ou bacilo de Koch, por exemplo, é conhecidamente recrutadora de macrófagos como foi demonstrado por Ferreira; Souza e Ribeiro (1980). Posteriormente, Cunha (1989), induziu a ativação de macrófagos com endotoxina de *Escherichia coli* (LPS) para estudar a migração de neutrófilos. Na presente pesquisa, estudamos como ocorre a migração de neutrófilos após o estímulo inflamatório causado por vinorelbina. Sabe-se que os neutrófilos migram para o sítio inflamatório através da ação de fatores quimiotáticos liberados secundariamente à ativação de células residentes na cavidade peritoneal, como IL-1 e IL-8 (RIBEIRO *et al.*, 1991). Contudo, agentes bacterianos, como o N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) e mediadores químicos da inflamação (fatores do complemento, C5a) também podem induzir a migração de forma direta, independentemente de células residentes (RIBEIRO *et al.*, 1991; RIBEIRO *et al.*, 1997). Assim, a vinorelbina poderia estar regulando a migração por um desses mecanismos. Para tanto, injetamos a vinorelbina diretamente no peritônio de ratos e depois coletamos o exsudato peritoneal para a leitura e contagem das células. A avaliação da participação de células residentes foi testada pela depleção dessas células peritoneais com a técnica da lavagem peritoneal com soro fisiológico (RIBEIRO *et al.*, 1991). Essa técnica permite com acurácia avaliar se a redução de células residentes interfere com a capacidade de um agente inflamatório em induzir a migração neutrofílica (SOUZA *et al.*, 1988).

De forma consistente, observamos que a lavagem peritoneal resultou em uma redução drástica no número de células residentes do peritônio dos animais. Com a lavagem do peritônio com solução de SF 0,9% estéril, nós esgotamos a população de células mononucleares na cavidade peritoneal dos ratos. Notavelmente, observamos que a capacidade da vinorelbina de induzir o acúmulo de neutrófilos foi ampliada na cavidade lavada, sugerindo que o próprio quimioterápico seria fator de atração para os neutrófilos pelo efeito estressor direto, em um mecanismo que não depende de células residentes.

Um possível mecanismo pelo qual a vinorelbina induziu a migração dos neutrófilos após a depleção das células peritoneais pode envolver o próprio efeito lesivo tecidual da vinorelbina,

levando à liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que, por sua vez, podem ativar a migração dos neutrófilos. Evidentemente, os DAMPs se ligam aos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRR) como os receptores Toll-like (TLRs) estimulando a liberação de quimiocinas que atraem os neutrófilos (BERTHELOT *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2021). Não testamos essa perspectiva em nosso estudo. Contudo, para confirmar se a vinorelbina agiria por este mecanismo, uma abordagem experimental válida envolveria o uso de animais nocaute para receptores Toll-like-4 (TLR 4), por exemplo, e estudar se este fato alteraria o curso da inflamação induzida pela vinorelbina.

Por outro lado, indubitavelmente, o mecanismo de ativação da migração de neutrófilos envolve mediadores químicos inflamatórios, visto que a dexametasona neutralizou a capacidade da vinorelbina de induzir a migração dessas células na cavidade peritoneal depletada de células residentes. Ao injetarmos dexametasona 1 hora e 30 minutos antes da injeção intraperitoneal de Vinorelbina, tivemos uma redução estatisticamente significativa do número de neutrófilos comparados ao grupo vinorelbina isolada.

Incontestavelmente, a dexametasona é um fármaco que atenua a inflamação tanto em danos estimulados por padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP) como quando causado por LPS, como em inflamações estimuladas por DAMP, no caso da vinorelbina e outros antineoplásicos citados. Portanto, os presentes resultados sugerem que a dexametasona pode ser clinicamente útil para atenuar ou tratar lesões por extravasamento de vinorelbina.

## 7 CONCLUSÕES

- A lesão por extravasamento de vinorelbina pode ser reproduzida e estudada em modelos animais.
- A lesão por extravasamento de vinorelbina causa danos às fibras musculares e inflamação marcada por presença de infiltrado neutrofílico, edema e hemorragia.
- A expressão de iNOS, mas não de TNF $\alpha$ , é aumentada na lesão tecidual causada por vinorelbina.
- A vinorelbina induz a migração leucocitária por um mecanismo independente de células residentes.
- A dexametasona administrada previamente à injeção intradérmica de vinorelbina atenua o dano tecidual de intenso para moderado e inibe a migração de neutrófilos como parte do mecanismo protetor.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, VL De *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-29, 2005.
- ALVARENGA, Érika C. *et al.* Potenciais alvos terapêuticos contra o câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 43-48, 2014.
- ANDRADE, Marceila de; SILVA, Sueli Ruil da. Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem. **Revista Brasileira de enfermagem**, v. 60, n. 3, 2007.
- BERTHELOT, F. *et al.* The effect of HMGB1, a damage-associated molecular pattern molecule, on polymorphonuclear neutrophil migration depends on its concentration. **Journal of innate immunity**, v. 4, n. 1, p. 41–58, 2012.
- BICER, A. *et al.* Possibility of taking an offensive stance in extravasation injury: Effects of fat injection in vesicant (doxorubicin) induced skin necrosis model in rats. **Journal of investigative surgery: the official journal of the Academy of Surgical Research**, v. 35, n. 4, p. 801–808, 2022.
- BONASSA, E. M. A.; SANTANA, T. R. Conceitos gerais em quimioterapia antineoplásica. **Bonassa EMA, Santana TR. Enfermagem em terapêutica oncológica. São Paulo (SP): Atheneu**, p. 3-19, 2005.
- BRASIL. ANVISA. **Navelbine**: Tartarato de Vinorelbina. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/bulario-eletronico1>>. Acesso em: 16 abr. 2019.
- BUDMAN, Daniel R. Vinorelbine (Navelbiner): A Third-Generation Vinca Alkaloid. **Cancer investigation**, v. 15, n. 5, p. 475-490, 1997.
- BRADLEY, Peter P.; CHRISTENSEN, Robert D.; ROTHSTEIN, Gerald. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. 1982.
- CASEY, Larry C.; BALK, Robert A.; BONE, Roger C. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. **Annals of internal medicine**, v. 119, n. 8, p. 771-778, 1993.
- CAPASSO, Anna. Vinorelbine in cancer therapy. **Current drug targets**, v. 13, n. 8, p. 1065-1071, 2012.
- CARABANTE-OCÓN, F. *et al.* Continuous-infusion vinorelbine for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: a phase I/II study. **Clinical lung cancer**, v. 7, n. 2, p. 121–126, 2005.
- CICCHETTI, Silvia; JEMEC, Barbara; GAULT, David T. Two case reports of vinorelbine extravasation: management and review of the literature. **Tumori Journal**, v. 86, n. 4, p. 289-292, 2000.

CINELLI, M. A. *et al.* Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition: CINELLI *et al.* **Medicinal research reviews**, v. 40, n. 1, p. 158–189, 2020.

CUNHA, Fernando de Queiroz. **Controle da migração de neutrófilos por fatores liberados de macrófagos estimulados com endotoxina de *Escherichia coli***. 1989. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1989. Acesso em: 09 mar. 2023.

CUNHA, Fernando de Queiroz *et al.* Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxaemia: role of TNF- $\alpha$  and IL-1- $\beta$ . **Immunology**, v. 81, n. 2, p. 211, 1994.

DA COSTA, Mário Alberto Dantas Loures; CHAGAS, Sabrina Rossi Perez. Quimioterapia neoadjuvante no câncer de mama operável: revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 59, n. 2, p. 261-269, 2013.

D'ALTERIO, Crescenzo *et al.* Paradoxical effects of chemotherapy on tumor relapse and metastasis promotion. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2020. p. 351-361.

DEBETS, JOOP MH *et al.* Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients. **Critical care medicine**, v. 17, n. 6, p. 489-494, 1989.

DE CARVALHO, João Ernesto. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. 2006.

DHYANI, Praveen *et al.* Anticancer potential of alkaloids: a key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine. **Cancer Cell International**, v. 22, n. 1, p. 1-20, 2022.

DISA, J. J. *et al.* Prevention of adriamycin-induced full-thickness skin loss using hyaluronidase infiltration. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 101, n. 2, p. 370–374, 1998.

DORNELAS-FILHO, Amílcar Figueiredo *et al.* Neutrophils contribute to the pathogenesis of hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide. **International Immunopharmacology**, v. 62, p. 96-108, 2018.

DUFLOS, Alain; KRUCZYNSKI, Anna; BARRET, Jean-Marc. Novel aspects of natural and modified vinca alkaloids. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 2, n. 1, p. 55-70, 2002.

ECCLES, Suzanne A.; WELCH, Danny R. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. **The Lancet**, v. 369, n. 9574, p. 1742-1757, 2007.

EL-SAGHIR, N. *et al.* Dexrazoxane for anthracycline extravasation and GM-CSF for skin ulceration and wound healing. **The lancet oncology**, v. 5, n. 5, p. 320–321, 2004.  
ERDMANN, Friederike *et al.* Childhood cancer: survival, treatment modalities, late effects and improvements over time. **Cancer epidemiology**, v. 71, p. 101733, 2021.

FERLAY, Jaques *et al.* Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. **European journal of cancer**, v. 49, n. 6, p. 1374-1403, 2013.

FERLAY, Jacques *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015.

FERREIRA, Eduarda *et al.* MIELOPERIXADASE (MPO) COMO MARCADOR DE ENDOMETRITE SUBCLÍNICA, 2017.

FIDALGO, JA Pérez *et al.* Management of chemotherapy extravasation: ESMO–EONS clinical practice guidelines. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 16, n. 5, p. 528-534, 2012.

FLORIAN, Stefan; MITCHISON, Timothy J. Anti-microtubule drugs. **The Mitotic Spindle: Methods and Protocols**, p. 403-421, 2016.

FONSECA, Selma Montosa; ALMEIDA, Elizabeth PM de; MASSUNAGA, Valéria Mika. Protocolo de intervenções de enfermagem frente às reações adversas aos quimioterápicos antineoplásicos. **Fonseca SM, Machado RCL, Paiva DRS, Almeida EPM, Massunaga VM, Junior WR, et al. Manual de quimioterapia antineoplásica. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso**, p. 28-54, 2000.

FERREIRA, S. H.; DE SOUZA, Gloria EP; RIBEIRO DOS SANTOS, R. In vivo inhibition of PMN migration by antimacrophage serum. In: **Inflammation: Mechanisms and Treatment: Proceedings of the Fourth International Meeting on Future Trends in Inflammation Organized by the European Biological Research Association and held in London, 18th–22nd February 1980**. Springer Netherlands, 1980. p. 789-793.

FORTES Z.B.; FARSKY S.P.; OLIVEIRA M.A. *et al.* Direct vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interaction in diabetes mellitus. **Diabetes**, v.40(10), p. 1267-73, 1991.

FREITAS, Karina Alexandra Batista da Silva; POPIM, Regina Célia. **Manual de Extravasamento de Antineoplásicos**. Botucatu - Sp: Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Botucatu Botucatu, 2015. 36 p.

GAULT DT, Challands J. Extravasation of drugs. In: KaufmanL, Ginsburg R, Eds. **Anesthesia review – 13**. Edinburgh: ChurchillLivingstone, 1997: 223-241.

GRANGER D.N.; BENOIT J.N.; SUZUKI M; GRISHAM M.B. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia–reperfusion. **Am. J. Physiol.** v.257, p. 683– 688, 1989.

GREGORY, R. K.; SMITH, I. E. Vinorelbine—a clinical review. **British journal of cancer**, v. 82, n. 12, p. 1907-1913, 2000.

GUIMARÃES, Marco Cesar Cunegundes; SILVA, Ian Victor; RANGEL, Letícia Batista Azevedo. Anticorpos na terapia contra o câncer. **PerspectivasOnLine 2007-2011**, v. 2, n. 6, 2008.

HEITMANN, C.; DURMUS, C.; INGIANNI, G. Surgical management after doxorubicin and epirubicin extravasation. **Journal of Hand Surgery**, v. 23, n. 5, p. 666-668, 1998.

HERSCOVICI, Dolfi *et al.* Vacuum-assisted wound closure (VAC therapy) for the management of patients with high-energy soft tissue injuries. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 17, n. 10, p. 683-688, 2003.

IBRAHIM, N. K. *et al.* Phase I-II vinorelbine (Navelbine) by continuous infusion in patients with metastatic breast cancer: cumulative toxicities limit dose escalation. **Cancer investigation**, v. 19, n. 5, p. 459-466, 2001.

ISLAM, Badrul *et al.* Vinca alkaloids, thalidomide and eribulin-induced peripheral neurotoxicity: From pathogenesis to treatment. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 24, p. S63-S73, 2019.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9ª edição. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan, 2012.

MACEDO, F. Y. B. de. Efeito protetor da interleucina-4 (IL-4) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundungos. 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MANGENEY, P. *et al.* 5'-Nor anhydrovinblastine: Prototype of a new class of vinblastine derivatives. **Tetrahedron**, v. 35, n. 18, p. 2175-2179, 1979.

MANN, John. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 2, p. 143, 2002.

MARTA, Gustavo Nader *et al.* Câncer de mama estágio inicial e radioterapia: atualização. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 4, p. 468-474, 2011.

MELO, J. M. A. *et al.* Prevention and conduct against the Extravasation of antineoplastic chemotherapy: a scoping review. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 73, n. 4, p. e20190008, 2020.

MONSTREY, S. J. *et al.* Hyperbaric oxygen therapy and free radical production: An experimental study in doxorubicin (adriamycin) extravasation injuries. **Annals of plastic surgery**, v. 38, n. 2, p. 163-168, 1997.

MORAIS, M. M. *et al.* Pharmacological and histopathological study of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis-comparison of the effects of dexamethasone and Mesna. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 1211-1215, 1999.

MURAD, André Márcio; KATZ, Artur. Oncologia: bases clínicas do tratamento. In: **Oncologia: bases clínicas do tratamento**. 1996.

NDREPEPA, Gjin. Myeloperoxidase—A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. **Clinica chimica acta**, v. 493, p. 36-51, 2019.



IALENTI, Armando *et al.* Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **European journal of pharmacology**, v. 211, n. 2, p. 177-182, 1992.

INCA, N. I. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional do Cancer. **Portuguese**. URL: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br), 2019.

KASSNER, Elizabeth. Evaluation and treatment of chemotherapy extravasation injuries. **Journal of Pediatric Oncology Nursing**, v. 17, n. 3, p. 135-148, 2000.

KERITAM, O. *et al.* Determination of extravasation effects of nal-Iri and trabectedin and evaluation of treatment options for trabectedin extravasation in a preclinical animal model. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, p. 875695, 2022.

KESIK, V. *et al.* Melatonin ameliorates doxorubicin-induced skin necrosis in rats. **Annals of plastic surgery**, v. 65, n. 2, p. 250–253, 2010.

KESIK, V. *et al.* Ozone Ameliorates Doxorubicine-Induced Skin Necrosis - results from an animal model. *The international journal of lower extremity wounds*, v. 15, n. 3, p. 248–254, 2016.

KREIDIEH, Firas Y.; MOUKADEM, Hiba A.; EL SAGHIR, Nagi S. Overview, prevention and management of chemotherapy extravasation. **World journal of clinical oncology**, v. 7, n. 1, p. 87, 2016.

KULKARNI, Suhasini *et al.* A revised model of platelet aggregation. **The Journal of clinical investigation**, v. 105, n. 6, p. 783-791, 2000.

KUMAR, Sanjeev *et al.* Dexamethasone ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 11, p. 2412-2425, 2009.

LANGER, S. W.; SEHESTED, M.; JENSEN, P. B. Anthracycline extravasation: a comprehensive review of experimental and clinical treatments. **Tumori**, v. 95, n. 3, p. 273–282, 2009.

LANGER, Seppo W. Extravasation of chemotherapy. **Current oncology reports**, v. 12, p. 242-246, 2010.

LEAL, Jorge Henrique Santos; CUBERO, Daniel; GIGLIO, Auro Del. Hormonioterapia paliativa em câncer de mama: aspectos práticos e revisão da literatura. **Rev Bras Clin Med**, v. 8, n. 4, p. 338-343, 2010.

LIMA-JÚNIOR, R. C. P. *et al.* Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 69, n. 4, p. 931–942, 2012.

LEI, Lei *et al.* A significant response to a combination of trastuzumab and vinorelbine in Her2-negative metastatic breast cancer with Her2 V777L mutation. **OncoTargets and therapy**, v. 12, p. 2931, 2019.

LUCCHESI, Angelica Maria *et al.* Marcadores inflamatórios na doença coronariana estável: proteína c reativa de alta sensibilidade e mieloperoxidase. **Salão de iniciação Científica (17.: 2005: Porto Alegre, RS). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2005.**, 2005.

PAOLO BOSSI, MAURIZIO LUCCHESI, ANDREA ANTONUZZO. Gastrointestinal toxicities from targeted therapies: measurement, duration and impact. *Curr Opin Support Palliat Care* 2015, 9:163–167

RADAEL, Walterson *et al.* Avaliação do risco de extravasamento de quimioterápico antineoplásico administrado via cateter de inserção periférica: relato de caso. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 7, n. 1, p. 124-129, 2016.

RIBEIRO, R. A. *et al.* IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**, v. 73, n. 4, p. 472–477, 1991.

RIBEIRO, R. A. *et al.* Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 78, n. 5, p. 881–893, 2016.

RIBEIRO, R. A. *et al.* Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB<sub>4</sub>, fMLP and C5a des arg. **International archives of allergy and immunology**, v. 112, n. 1, p. 27–35, 1997.

RIBEIRO, R. A. *et al.* Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. **The Journal of urology**, v. 167, n. 5, p. 2229-2234, 2002.

Spence, R. A. J.; Jonhston, P. G. Em *Oncology*; Jonhston, P. G., ed; Oxford University Press: Oxford, 2001, p. 1-14, 121-132; Chabner, B. A.; Longo, D. L. Em *Cancer chemotherapy and biotherapy*; 2a. ed., Lippincott-Raven: Filadélfia, 1996.

SCHIRRMACHER, Volker. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. **International journal of oncology**, v. 54, n. 2, p. 407-419, 2019.

SCHULMEISTER, Lisa. Extravasation management. In: **Seminars in oncology nursing**. WB Saunders, 2007. p. 184-190.

SCHWARTSMANN, G. *et al.* N-acetylcysteine protects skin lesion induced by local extravasation of doxorubicin in a rat model. **The American journal of pediatric hematology/oncology**, v. 14, n. 3, p. 280–281, 1992.

SOMMER, N. Z. *et al.* Dapsone for the treatment of doxorubicin extravasation injury in the rat. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 109, n. 6, p. 2000–2005, 2002.

SOUZA, G. E. P. *et al.* Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents and Actions**, v. 24, p. 377-380, 1988.

SUGIMOTO M. *et al.* Efficacy of local steroid injection on rat skin lesions induced by extravasation of vesicant anticancer drugs. **Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy**, v. 39, n. 4, p. 577–582, 2012.

SUNG, Hyuna *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

SUSSER, Wendy S.; WHITAKER-WORTH, Diane L.; GRANT-KELS, Jane M. Mucocutaneous reactions to chemotherapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 40, n. 3, p. 367-398, 1999.

TSAVARIS, N. B. *et al.* Conservative approach to the treatment of chemotherapy-induced extravasation. **The Journal of dermatologic surgery and oncology**, v. 16, n. 6, p. 519–522, 1990.

VERHOFSTAD, M. H. *et al.* Microscopic analysis of anastomotic healing in the intestine of normal and diabetic rats. **Diseases of the colon and rectum**, v. 44, n. 3, p. 423–431, 2001.

VIEIRA, M. M. *et al.* Use of dexamethasone with mesna for the prevention of ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association**, v. 10, n. 11, p. 595–602, 2003.

VORA, A. *et al.* Cytokine-mediated nitric oxide release—a common cytotoxic pathway in host-versus-graft and graft-versus-host reactions?. **Bone marrow transplantation**, v. 20, n. 5, p. 385-389, 1997.

WANG, Yanyan *et al.* Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Gene Expression and Apoptosis in Ischemia–Reperfusion Injury: A Rat Model of Early-Stage Pressure Ulcer. **Nursing research**, v. 65, n. 1, p. 35-46, 2016.

WEINGART, Saul N. *et al.* Chemotherapy medication errors. **The Lancet Oncology**, v. 19, n. 4, p. e191-e199, 2018.

WENGSTRÖM, Y.; MARGULIES, A.; EUROPEAN ONCOLOGY NURSING SOCIETY TASK FORCE. European Oncology Nursing Society extravasation guidelines. **European journal of oncology nursing: the official journal of European Oncology Nursing Society**, v. 12, n. 4, p. 357–361, 2008.

WHEELER, Marcia A.; SMITH, Shannon D.; WEISS, Robert M. Induction of nitric oxide synthase with urinary tract infections. **Advances in Bladder Research**, p. 359-369, 1999. *Biol*, 462: 359, 1999

WU, Junjie; WAXMAN, David J. Immunogenic chemotherapy: dose and schedule dependence and combination with immunotherapy. **Cancer letters**, v. 419, p. 210-221, 2018.

YU C *et al.* Treatment of skin injury due to vinorelbine extravasation using bFGF and rhGM-CSF: an experimental study in a murine model. **Biol Res Nurs**, v. 13, n. 1, p. 32-7, 2011.

ZHANG, J. *et al.* HMGB1-TLR4-IL-23-IL-17A axis accelerates renal ischemia-reperfusion injury via the recruitment and migration of neutrophils. **International immunopharmacology**, v. 94, n. 107433, p. 107433, 2021.

ZHANG, Ying; YANG, Shao-Hui; GUO, Xiu-Li. New insights into Vinca alkaloids resistance mechanism and circumvention in lung cancer. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 96, p. 659-666, 2017.

ZHU, Jing-Jing *et al.* Rat injury model of docetaxel extravasation. **Biomedical reports**, v. 2, n. 5, p. 649-652, 2014.