



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

JÉSSICA PEREIRA DA COSTA

**ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ATIVIDADE
ANTICÂNCER DA LIDOCAÍNA LIVRE E
COMPLEXADA COM 2-HIDROXIPROPIL- β -
CICLODEXTRINA.**

PIRACICABA

2017

JÉSSICA PEREIRA DA COSTA

**ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ATIVIDADE
ANTICÂNCER DA LIDOCAÍNA LIVRE E
COMPLEXADA COM 2-HIDROXIPROPIL- β -
CICLODEXTRINA.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
cirurgião-dentista.

Orientador: Dr. Luiz Eduardo Nunes Ferreira

PIRACICABA, SP

2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

C823e Costa, Jéssica Pereira da, 1993-
Estudo *in vitro* e *in vivo* da atividade anticâncer da lidocaína livre e complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. / Jéssica Pereira da Costa. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Luiz Eduardo Nunes Ferreira.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Lidocaína. 2. Hidroxiopropil-beta-ciclodextrina. 3. Sobrevivência celular. 4. Carcinoma 256 de Walker. I. Ferreira, Luiz Eduardo Nunes, 1986-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:

Lidocaine

Hidroxypropyl-beta-cyclodextrin

Cell survival

Carcinoma 256, Walker

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 27-04-2017

Dedico para aqueles que sempre acreditaram em mim e me apoiaram, em especial aos meus pais, que não medem esforços para que minhas realizações sejam alcançadas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por mais este feito, por abençoar os meus caminhos, por me ajudar a superar todos os desafios e estando comigo em todos os momentos.

À minha mãe, Eliani Claudia Machado da Costa, e ao meu pai, João Pereira da Costa, por sempre estarem me apoiando em todas as decisões, incentivo e por todo amor.

Ao meu irmão, Jésley Pereira da Costa, por todos os momentos juntos, apoio e confiança.

Ao, Rafael Barbosa Silva Fogarolli, por todo carinho e companheirismo.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do Diretor Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques e ao Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar, coordenador do curso de graduação.

Ao Dr. Luiz Eduardo Nunes Ferreira, meu orientado do Trabalho de Conclusão de Curso, por todo o aprendizado e por sua dedicação.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: ácido araquidônico

ANOVA: Análise de Variância

CD: ciclodextrinas

CO₂: dióxido de carbono

COX-2: ciclooxigenase 2

CSF: (“cerebrospinal fluid”) fluido cerebrospinal

DMEM: Dulbecco’s modified Eagle’s medium

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensaio imunossorvente ligado a enzima)

EthD-1: Ethidium homodimer-1

FBS: Fetal bovine serum (soro fetal bovino)

h: horas

HaCaT: Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes (linhagem de queratinócitos adultos humanos imortalizados)

HE: Hematoxilina-Eosina

HeLA: células de Henrietta Lacks

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico

HP-β-CD: 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina

INF-γ: interferon-gamma

LPS: lipopolissacarídeo

mL: mililitro

NaCl: cloreto de sódio

NFκB: nuclear fator kappa B

°C: grau centígrado

PBS: phosphate-buffered saline (solução salina tamponada com fosfato)

PGE₂: prostaglandina E2

pH: potencial hidrogeniônico

PLA₂: fosfolipase A2

RNA: ácido ribonúcléico

SPF: specific-pathogen free

TCA: ácido tricloroacético

TNF-α: fator de necrose tumoral α

U937: células de histiocytic linfoma

RESUMO

A lidocaína é um anestésico local que tem demonstrado efeitos antiproliferativos, citotóxicos, apoptóticos e anti-inflamatórios, tornando um fármaco promissor no estudo da atividade antitumoral, porém sua ação de curta duração limita a sua utilização. A complexação de anestésicos locais em ciclodextrinas tem demonstrado melhorias na solubilidade aquosa e outras propriedades biofarmacêuticas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos citotóxicos e antiproliferativos da lidocaína livre e complexada em 2-Hidroxiopropil- β -ciclodextrina nas células epiteliais de adenocarcinoma cervical (HeLa) e queratinócitos humanos (HaCaT). Este estudo avaliou os efeitos antitumorais da lidocaína livre e complexada em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD). *In vitro*, células HeLa e HaCaT foram expostas as formulações de lidocaína e HP- β -CD lidocaína. Foram avaliados a viabilidade celular (MTT e LIVE/DEAD) e também da atividade antiproliferativa. *In vivo*, células de Walker 256 foram inoculadas na região plantar da pata direita de ratos *Wistar*. Os animais foram tratados com lidocaína livre 5%, HP- β -CD lidocaína 5% e doxorrubicina. Foram avaliados o edema e a produção de TNF- α e as análises histológicas também foram realizado. A lidocaína e HP- β -CD lidocaína reduziram de maneira dose dependente a viabilidade e a proliferação celular. A viabilidade das células HaCaT e HeLa foi de 43,8% e 79,5% respectivamente, após exposição a lidocaína e de 46,8% e 77,3% para HP- β -CD lidocaína na concentração de 1.115 μ g/mL. Os animais tratados por 3 dias com lidocaína e HP- β -CD lidocaína apresentaram um aumento no volume da pata de 2,58 e 2,22 vezes respectivamente, sendo significativamente menor em comparação ao grupo controle (sem tratamento). Não houve diferença na liberação de TNF- α . Desta forma conclui que a lidocaína afetou a viabilidade celular, proliferação celular e também +- o crescimento do tumor *in vivo*. A complexação em HP- β -CD não afetou as propriedades do anestésico local.

Palavras-chave: lidocaína, hidroxipropil- β -ciclodextrina, sobrevivência celular, carcinoma 256 de Walker.

ABSTRACT

Lidocaine is a local anesthetic that has demonstrated antiproliferative, cytotoxic, apoptotic and anti-inflammatory effects, making it a promising drug in the study of antitumor activity, but its short duration action limits its use. Complexation of local anesthetics in cyclodextrins has demonstrated improvements in aqueous solubility and other biopharmaceutical properties. The objective of this study was to evaluate the cytotoxic and antiproliferative effects of free lidocaine and complex lidocaine on 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin in cervical adenocarcinoma (HeLa) epithelial cells and human keratinocytes (HaCaT). This study evaluated the antitumor effects of free and complexed lidocaine on 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD). *In vitro*, HeLa and HaCaT cells were exposed to formulations of lidocaine and HP- β -CD lidocaine. Cell viability (MTT and LIVE / DEAD) and also antiproliferative activity were evaluated. *In vivo*, Walker 256 cells were inoculated into the right paw plantar region of Wistar rats. The animals were treated with 5% free lidocaine, HP- β -CD lidocaine 5% and doxorubicin. Edema and TNF- α production were evaluated and histological analyzes were also performed. Lidocaine and HP- β -CD lidocaine dose-dependently reduced viability and cell proliferation. The viability of HaCaT and HeLa cells was 43.8% and 79.5%, respectively, after exposure to lidocaine and 46.8% and 77.3% for HP- β -CD lidocaine at a concentration of 1,115 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The animals treated for 3 days with lidocaine and HP- β -CD lidocaine showed an increase in paw volume of 2.58 and 2.22 times respectively, being significantly lower in comparison to the control group (without treatment). There was no difference in the release of TNF- α . In this way, it is concluded that lidocaine affected cell viability, cell proliferation and also + - tumor growth *in vivo*. Complexation on HP- β -CD did not affect the properties of the local anesthetic.

Keywords: lidocaine, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, cell survival, carcinoma 256 Walker.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 14 |
| 3 PROPOSIÇÃO | 19 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 4.1 REAGENTES | 20 |
| 4.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE LIDOCAÍNA | 20 |
| 4.3 PREPARAÇÕES DO COMPLEXO LIDOCAÍNA EM 2-HIDROXIPROPIL- β CICLODEXTRINA | 21 |
| 4.4 CULTURA CELULAR | 21 |
| 4.5 TESTES <i>IN VITRO</i> | 22 |
| 4.5.1 Análise de citotoxicidade por redução do MTT | 22 |
| 4.5.2 Análise da citotoxicidade por microscopia de fluorescência | 22 |
| 4.5.3 Efeito sobre a proliferação celular pelo teste da sulforrodamina B (SRB) | 23 |
| 4.6 MODELO ANIMAL | 23 |
| 4.6.1 Animais | 23 |
| 4.6.2 Inoculação das células do carcinoma de Walker 256 | 24 |
| 4.6.3 Delineamento experimental | 24 |
| 4.6.4 Avaliação do edema | 25 |
| 4.6.5 Análise histológica | 25 |
| 4.6.6 Efeitos sobre a resposta inflamatória | 26 |

| | |
|---|----|
| 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 26 |
| 5 RESULTADOS | 27 |
| 5.1 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> | 27 |
| 5.1.1 Efeitos da lidocaína e HP- β -CD lidocaína na viabilidade celular | 27 |
| 5.1.2 Efeitos da lidocaína e HP- β -CD lidocaína na proliferação CELULAR | 31 |
| 5.2 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> | 33 |
| 5.2.1 Efeitos da lidocaína e HP- β -CD lidocaína sobre o edema da pata | 33 |
| 5.2.2 Análise histológica | 34 |
| 5.2.3 Efeitos da lidocaína e HP- β -CD lidocaína sobre a liberação de TNF- α | 35 |
| 6 DISCUSSÃO | 37 |
| 7 CONCLUSÃO | 41 |
| REFERÊNCIAS | 42 |
| ANEXOS | 48 |
| ANEXO 1: COMITÊ DE ÉTICA | 48 |
| ANEXO 2: TERMO DE RESPONSABILIDADE | 50 |

1 INTRODUÇÃO

A lidocaína é um anestésico local que vem sendo amplamente aplicado na prática médica e odontológica, sendo utilizado habitualmente em diversos tipos de procedimentos (Sisk, 1992), pois tem como propósito o controle da dor, inclusive está sendo utilizado para aliviar a dor induzida por alguns tipos de câncer, como oral e retal (Stegman & Stoukides, 1996; Ngom *et al.*, 2001).

Sabe-se que os anestésicos locais são basicamente os fármacos utilizado para diminuir ou até mesmo eliminar a dor, através do bloqueio reversível da transmissão excitatória dos axônios (Sctrichart & Ritchie, 1987).

A literatura também aborda uma ampla variedade de efeitos dos anestésicos locais sobre diferentes vias de sinalização celular (Hollmann & Durieux *et al.*, 2000), assim como ação antiproliferativa e citotóxica sobre diferentes tipos celulares em cultura ou *in vivo* (Perez-Castro *et al.*, 2009; Grishko *et al.*, 2010; Jacobs *et al.*, 2011).

Estes fármacos, podem causar disfunções mitocondriais através do colapso do potencial da membrana mitocondrial, dissociação do consumo de oxigênio e interferência na fosforilação da adenosina difosfato. Sendo assim, os efeitos levam a liberação do citocromo C que, no citosol, se liga a protease do fator de ativação de apoptose-1, provocando a cascata de caspases, as quais culminam com a morte celular por apoptose (Friederich *et al.*, 2002; Kamyra *et al.*, 2005; D'amelio *et al.*, 2010).

Desta forma, além do efeito anestésico e analgésico, a atividade antiproliferativa da lidocaína torna um fármaco promissor para o estudo de atividade antitumoral tanto para os modelos *in vitro*, quanto para os modelos *in vivo*. Porém, o uso destes medicamentos é limitado devido a sua ação de curta duração, visto que há uma rápida dispersão do local onde foi injetado (Grant, 2002).

Modelos para a liberação sustentada de anestésicos locais através da utilização de carreadores como lipossomos, ciclodextrinas e nanopartículas, tem tornado possível a manipulação de propriedades farmacológicas e biofarmacêuticas dos anestésicos locais (Shikanov *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2009; de Paula *et al.*, 2010).

Um dos carreadores utilizados são as moléculas de ciclodextrinas. As ciclodextrinas são oligossacarídeos produzidos pela hidrólise enzimática de amido, formando complexos ligados a seis (α -CD), sete (β -CD) ou oito (γ -CD) unidades de α -1,4 D-glicose (Duchêne & Wouessisjewe, 1990). As ciclodextrinas são capazes de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas, cujo objetivo é melhorar a hidrosolubilidade dos compostos mais hidrofóbicos (Venturini et al. 2008; Loftson & Duchene, 2007).

Alguns estudos da literatura sugerem que a complexação dos anestésicos locais com CD prolongam a duração e intensificam os efeitos farmacológicos dos anestésicos locais, demonstrando melhorias no índice terapêutico e eficácia farmacológica (Dollo *et al.*, 2000; Freville *et al.*, 1996; Estebe *et al.*, 2002; de Araújo *et al.*, 2006).

Este estudo apresenta uma nova abordagem em relação a utilização dos anestésicos locais, explorando uma nova formulação de lidocaína associada a 2-hydroxipropil- β -ciclodextrina, buscando o aprimoramento dos efeitos terapêuticos da lidocaína.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Lidocaína mecanismos de ação

Os anestésicos locais correspondem a uma classe de fármacos que impedem a condução dos impulsos elétricos nociceptivos reversivelmente, gerando uma perda da sensibilidade à dor, sendo empregados em vários tipos de procedimentos, apresentando ampla utilização na clínica odontológica (Sambrook & Goss, 2011). Em 1944 a lidocaína foi introduzida como os anestésicos locais do tipo amida, sendo que hoje a lidocaína corresponde aos principais anestésicos locais (Nau & Wang, 2004).

Os anestésicos locais diferem em relação a potência, latência, duração do bloqueio sensorial e toxicidade. O perfil farmacológico de cada molécula anestésica é determinado pelas propriedades físico-químicas, tais como lipossolubilidade, pKa e grau de ligação as proteínas. A literatura tem como consenso que o efeito clínico dos anestésicos locais, assim como alguns efeitos colaterais, é devido a interação com locais específicos nos canais de sódio voltagem dependentes. No entanto, os anestésicos locais também se ligam a outras proteínas transmembrana e intracelular, como os canais de potássio, canais receptores de nicotina e acetilcolina e proteína G (de Paula & Schreier, 1995; Nau & Wang, 2004).

Lidocaína e citotoxicidade

A necrose induzida pelos anestésicos locais tem sido demonstrada *in vitro*, especialmente produzida pela bupivacaina (Dragoo *et al.*, 2008), e *in vivo* (Gomoll *et al.*, 2006) em condrócitos. As células de histiocytic linfoma (U937) em cultura, tiveram sua viabilidade fortemente reduzida após o contato com lidocaína em concentrações acima de 15 mM. Não foi verificado aumento da fragmentação do DNA, porém ocorreu um rápido rompimento das membranas celulares, indicando que a lidocaína em altas concentrações exerce efeitos tóxicos diretos, induzindo a necrose nas células U937 (Kamiya *et al.*, 2005).

A citotoxicidade da lidocaína é bem conhecida e tem sido verificada em diversos tipos celulares *in vitro* (Oliveira *et al.*, 2013). Em neuroblastoma (SH-SY5Y)

a exposição por 3h à lidocaína, em concentrações variando de 3 à 30 mM, causou um aumento da toxicidade dose dependente, com morte celular quase total na concentração de 30 mM (Friederich et al., 2002). Este anestésico também induziu a morte celular dos neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos, após 4 min de exposição na concentração de 14 mM (Gold et al., 1998). Outros tipos celulares como condrócitos articulares e pré-adipócitos também tiveram sua viabilidade celular afetada pela lidocaína (Keck et al., 2010; Jacobs et al., 2011).

Anestésicos locais e resposta inflamatória

Anestésicos locais têm sido reportados como atenuadores da resposta inflamatória, onde estudos *in vitro* demonstraram a ação inibitória da lidocaína sobre a liberação de ânions superóxidos pelos neutrófilos humanos (Peck et al., 2004). O processo inflamatório se caracteriza pelo recrutamento de leucócitos para os tecidos lesionados, além da ativação das células imune e inflamatórias.

As citocinas são importantes mediadores das respostas inflamatórias, estando envolvidas em virtualmente todos os aspectos da imunidade e inflamação (Licinio, 1997). Estes correspondendo a pequenas proteínas pleotrópicas heterogêneas, como as linfocinas, monocinas, interleucinas e interferon, que agem sobre as superfícies celulares regulando e modificando a ativação celular, comunicação entra as células, crescimento celular, maturação e resposta imune (Sheeran & Hall, 1997).

A ligação dessas proteínas a receptores transmembrana resulta em alterações na síntese do RNA e expressão proteica (Kraychete *et al.*, 2006), afetando a dinâmica da matriz extracelular, aumentando a expressão de fibronectina e a permeabilidade do endotélio a infiltração e aderência de neutrófilos, leucócitos e macrófagos resultando na inflamação do tecido (Choudhary *et al.*, 2008). A citocina produzida em resposta a um estímulo determina inicialmente o desenvolvimento da resposta imune e subseqüentemente a natureza da resposta: citotóxica, humoral, mediada por células ou alérgica (Borish & Steinke, 2003).

Os mecanismos pelos quais os anestésicos locais exercem efeitos sobre a resposta inflamatória continuam pouco esclarecidos. Efeitos simultâneos inibitórios da lidocaína sobre várias citocinas e quimiocinas sugerem um efeito sobre uma via celular central comum (Henkel *et al.*, 1993, Brown *et al.*, 1995).

Feng et al. (2008) verificaram *in vivo* a redução de lesões pulmonares induzidas por LPS pela lidocaína através da inibição da ativação do NFκB. A ativação do NFκB é necessária para a expressão de IL-2, INF-γ e TNF-α e outros mediadores inflamatórios (Arends & Wyllie, 1991). A lidocaína também pode reduzir a liberação de citocinas em parte pela inibição da expressão de RNAm, através da inibição da fosforilação do IκB, uma atividade que resulta na redução da degradação do IκB e interferindo na sua translocação nuclear e ligação com NFκB (Lang *et al.*, 2010).

A literatura tem reportado efeito dos anestésicos locais sobre a modulação de PGE₂. Prostaglandinas são potentes lipídios bioativos de vida curta pertencente à família dos eicosanoides (Funk, 2001). As PGE₂ são produzidas por todos os tipos celulares como epitélio, fibroblastos e células inflamatórias. O processo de síntese das PGE₂ envolve a família das fosfolipase A₂ que mobilizam o ácido araquidônico das membranas celulares, onde a ciclooxigenases então convertem o AA em PGH₂ e sobre ação da PGE₂ sintetase é gerado o mediador PGE₂ (Park *et al.*, 2006). Nas condições fisiológicas a taxa de síntese de PGE₂ é controlado pela expressão local e atividade da COX-2 (Kalinski *et al.*, 2012).

Estudos demonstraram que a aplicação intratecal de lidocaína induz a um aumento transitório nos níveis PGE₂ no fluido cerebrospinal resultando também em hiperalgesia mecânica (Umbrain *et al.*, 2008). Por sua vez, Huang et al. (2008) demonstraram *in vitro* os efeitos da bupivacaína na redução da expressão de COX-2 e na produção de PGE₂ em macrófagos estimulados com endotoxina.

O aumento do cálcio intracelular induzido pela lidocaína pode ativar várias enzimas intracelulares, incluindo a fosfolipase A₂ (PLA₂). A ativação do PLA₂ induz a um aumento do ácido araquidônico no citosol, o qual entra na cascata de ciclooxigenases conduzindo a síntese de uma variedade de prostaglandinas que são liberadas no espaço extracelular. O aumento do cálcio intracelular também pode induzir a transcrição de RNAm de COX-2, conseqüentemente resultando em um aumento da liberação de PGE₂ (Umbrain et al., 2008).

Anestésicos locais e câncer

A ropivacaína e lidocaína exibiram efeitos antiproliferativos *in vitro* sobre linhagens de células humanas de adenocarcinoma de cólon (HT-29 e Caco-2) de

maneira dose dependente (Martinsson, 1998). A lidocaína também foi capaz de promover uma redução no crescimento de células de linfoma histiocítico além de reduzir a atividade celular *in vitro* (Kamiya et al., 2005). Em células humanas de câncer de língua (CAL 27) a lidocaína na concentração 400 μM causou um efeito antiproliferativo e na concentração 4000 μM exerceu efeito citotóxico (Sakaguchi et al. 2006). Além disso, Chang et. al. (2014) demonstraram o potencial de indução da apoptose da lidocaína e bupivacaína em cultura de células de câncer de mama (MCF-7) e epiteliais mamarias (MCF-10A). No entanto, a literatura indexada internacional carece de estudos *in vivo* do potencial antitumoral dos anestésicos locais.

Como descrito, os anestésicos locais já vêm sendo utilizado para o tratamento de câncer e a literatura apresenta que entre os tumores incidente em mulheres, o câncer de colo do útero é um dos que se destacam, sendo a terceira neoplasia mais incidente nas mulheres, com 16.340 novos casos (Instituto Nacional do Câncer, 2016) e este câncer representa uma neoplasia maligna. O câncer do colo do útero origina-se tanto do epitélio escamoso da ectocérvice como do epitélio escamoso colunar do canal cervical, o carcinoma epidermóide representa 90% dos casos, e o adenocarcinoma, 10% (INCA, 2016) O DNA sofre danos diariamente, estima-se que cada célula sofra 10.000 lesões por dia e muitas vezes este dano não é reparado eficientemente, desta forma o acumulo de mutações podem favorecer o desenvolvimento de doenças, como o câncer (Lindahl, 1993; Sancar et al.,2004).

Todo o câncer ocorre por uma alteração do DNA da célula, no caso da célula HeLa, estas células sofreu uma mutação que produz uma enzima chamada telomerase, sendo que esta enzima controla a renovação dos cromossomos, no momento em que as células se dividem. As células normais se desgastam a cada divisão celular, mas ao contrário disto, as células de Henrietta Lacks (HeLa) não sofrem danos ao se multiplicarem, sendo assim conhecida como célula imortal (Guedes, 2013).

Já os queratinócitos são as células epiteliais humanas (HaCaT), sendo essas responsáveis pela resposta inflamatórias na pele. A literatura sugere as células HaCaT por conta da relação com a alta capacidade de diferenciação altamente preservada *in vitro* (Schoop, 1999).

Anestésicos locais e sistemas de liberação de fármacos

Os anestésicos locais possuem como propriedades desejadas um longo período de ação aliado a uma baixa toxicidade e com uma solubilidade adequada em água e lipídios (Kuzma *et al.*, 1997). A busca por essas moléculas ideais continuam sendo a aplicação de sistemas de liberação controlado uma alternativa na tentativa de aprimorar as propriedades biofarmacêuticas e farmacológicas (Cereda *et al.*, 2006).

Novas formulações anestésicas vêm sendo desenvolvidas associando os anestésicos locais a carreadores tais como lipossomos, ciclodextrinas, nanopartículas e outros. Estes carreadores atuam como reservatórios no local de injeção, promovendo a lenta liberação do anestésico no tecido circundante. Pesquisas recentes têm demonstrados benefícios na utilização de sistemas de liberação controlado de drogas para aprimoramento de efeitos terapêuticos e farmacológicos dos anestésicos locais (Tófoli *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2008).

Benefícios terapêuticos de drogas tradicionalmente administradas são frequentemente limitadas pelas propriedades físico-químicas, toxicológicas ou pelas barreiras fisiológicas. O desenvolvimento de complexos de inclusão em ciclodextrinas tornou possível manipular algumas dessas propriedades (Loftson & Duchene, 2007). Apesar da existência das ciclodextrinas e suas aplicações na indústria farmacêutica já estarem bem documentadas a décadas, só recentemente passou-se a explorar suas propriedades na liberação controlada de fármacos. Atualmente muitos fármacos associados a ciclodextrinas já foram aprovados e estão disponíveis no mercado (Davis & Brewster, 2004).

Apesar da literatura apresentar uma gama de estudos envolvendo a complexação de anestésicos locais em sistemas de liberação controlado, os efeitos destas novas formulações sobre as diferentes vias de sinalização celular ainda permanecem um campo a ser explorado.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos e antiproliferativos da lidocaína livre e complexada em 2-Hydroxipropil- β -ciclodextrina nas células epiteliais de adenocarcinoma cervical (HeLa) e queratinócitos humanos (HaCaT). Além disso, este estudo avaliou *in vivo* os efeitos das formulações de lidocaína sobre o desenvolvimento tumoral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este Trabalho de Conclusão de Curso, fez parte do projeto “Estudo dos efeitos antitumorais da lidocaína e articaína associados a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina em modelos *in vitro* e *in vivo*”, auxílio FAPESP 2015/20942-6, coordenado pela Prof. Dra. Maria Cristina Volpato, em que o orientador deste projeto, Dr. Luiz Eduardo Nunes Ferreira, é colaborador. Desta forma, eu realizei meu Trabalho de Conclusão de Curso junto com o projeto que o Dr. Ferreira estava executando, utilizando a mesma linha de estudo e os mesmos animais.

4.1 REAGENTES

O cloridrato de lidocaína, o meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), os antibióticos gentamicina e penicilina-estreptomicina, o aminoácido glutamina, sulforrodamina B e o tampão HEPES foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A 2-Hidroxiopropil- β -ciclodextrina e o fármaco doxorubicina foram obtidos da Roquettes Serv. Tech. Lab (Lestrem, France) e Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) respectivamente. Soro fetal bovino (FBS), o antibiótico anfotericina B, a tripsina 0,25% com EDTA 0,5 mM, o azul de tripan, o sal do MTT e o reagente Live/Dead foram adquiridos da Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). O anestésico cloridrato de cetamina e a xilasina (Ropum®) foram comprados da Vetinil Ind. Com. de produtos Veterinários Ltda. (Louveira, SP, Brasil) e Bayer AG (Leverkusen, Alemanha).

Os kits para dosagem da citocina TNF- α (Quantikine® ELISA) foram adquiridos da R&D Systems Inc (Minneapolis, MN, USA).

4.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE LIDOCAÍNA

Para os testes *in vitro* o cloridrato de lidocaína (Sigma) foi diluído em meio de cultura DMEM, suplementado com FBS, em concentrações que partiram de 11,5 $\mu\text{g/mL}$ (40 mM) até 1.150 $\mu\text{g/mL}$ (4.000 mM). Nos testes *in vivo* o cloridrato de lidocaína foi diluído na concentração de 5% em uma solução estéril de tampão HEPES 20 mM com NaCl 150 mM e pH ajustado para 7,4.

4.3 PREPARAÇÕES DO COMPLEXO LIDOCAÍNA EM 2-HIDROXIPROPIL- β - CICLODEXTRINA

O complexo de inclusão foi preparado seguindo os protocolos propostos por Dollo et al. (1998) e Loftsson & Masson (2001). O complexo de inclusão sólido foi obtido misturando-se em água deionizada a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina e o cloridrato de lidocaína na razão molar de 1:1. A solução foi mantida sobre agitação por 24 horas à temperatura ambiente. Após atingir o equilíbrio, a solução foi liofilizada e armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso posterior.

O complexo foi preparado em quantidades suficientes para obter a concentração adequada de lidocaína nos diversos experimentos. Para os testes *in vitro* o complexo HP- β -CD lidocaína foi diluído em meio DMEM, suplementado com FBS, e esterilizado por filtração em membranas com poro de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (TPP). No experimento *in vivo* o complexo foi resuspenso em tampão HEPES 20 mM (150 mM de NaCl, pH 7,4).

4.4 CULTURA CELULAR

Queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) foram doados pelo Dr. Rodrigo Augusto da Silva do laboratório de transdução de sinal do Instituto de Biologia da UNICAMP. As células epiteliais de câncer de útero (HeLa) foram adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ 0100).

As células HaCaT e HeLa foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), gentamicina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e anfotericina B (0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As células foram crescidas em placas de petri para cultura de tecidos (100 x 20 mm) e foram mantidas em uma estufa com 5% de CO_2 a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. O tratamento com tripsina 0,25% e EDTA 0,5 mM foi utilizado para transferir as células para as placas de cultura de células de 96 poços ou para amplificar a cultura. Os experimentos foram conduzidos utilizando uma confluência de aproximadamente 80%.

4.5 TESTES *IN VITRO*

4.5.1 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE POR REDUÇÃO DO MTT

Células HeLa e HaCaT foram transferidas para a placas de cultura de células 96 poços na concentração de 5×10^4 /mL, em meio DMEM contendo 5% de FBS. As células foram expostas aos tratamentos de lidocaína livre e complexada em HP- β -CD nas concentrações de 11.5 μ g/mL, 63.5 μ g/mL, 115 μ g/mL, 630 μ g/mL e 1.150 μ g/mL que corresponde a 40 μ M, 220 μ M, 400 μ M, 2.200 μ M e 4.000 μ M respectivamente por 24h (Sakaguichi *et al.*, 2006). Terminados os períodos de incubação a citotoxicidade foi verificada através da redução do MTT. Os poços foram lavados com PBS (pH 7,4) e adicionados 100 μ L de DMEM contendo 0,5 mg/mL de MTT. As células foram incubadas, em seguida, o meio foi removido e 100 μ L de álcool absoluto foi adicionado aos poços para dissolver os cristais de formazan. Os poços foram homogeneizados e a absorbância foi medida em um leitor de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação ao controle. Foi utilizada como controle positivo a doxorubicina em concentrações crescentes partindo de 0,025 a 250 μ g/mL (Pascoal *et al.*, 2014).

4.5.2 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Os resultados do MTT foram confirmados por microscopia de fluorescência. As células foram cultivadas como descritas anteriormente. As placas foram incubadas por 24 h e em seguida foram aplicados os tratamentos. Terminados os períodos de incubação a citotoxicidade foi verificada através da marcação pelos reagentes LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity for mammalian cells (Invitrogen Life Technologies). Os reagentes EthD-1 e calceína-AM foram combinadas formando uma solução com concentração final de 2 μ M de calceína-AM e 4 μ M de EthD-1, 200 μ L dessa solução foi adicionado aos poços. As células foram incubadas por 30 a 45 minutos na temperatura ambiente no escuro. As imagens foram feitas no microscópio invertido Zeiss Axiovert 40 CFL acoplado a câmera AxioCam MEC (Carl Zeiss, Alemanha). A calceína foi visualizada utilizando filtro na faixa de comprimento

de onda 450-490 nm (Ex)/ 515-565 (Em). Já as células marcadas em vermelho foram visualizadas na faixa de comprimento de onda de 528-546 nm (Ex)/ 590-617nm (Em).

4.5.3 EFEITO SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO TESTE DA SULFORODAMINA B (SRB)

Células HaCaT e HeLa foram transferidas para a placas de cultura de células 96 poços na concentração de 5×10^4 /mL. Após 24h de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, foram adicionados os tratamentos de lidocaína livre e HP-β-CD lidocaína nas concentrações descritas anteriormente. Também foi utilizado como controle positivo a doxorubicina em concentrações crescentes de 0,025 µg/mL, 0,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 25 µg/mL e 250 µg/mL (Pascoal et al., 2014).

Em seguida, células do grupo tempo 0 (T0), sem crescimento que serve de base para mensurar a proliferação dos outros grupos, foram fixadas com 10% de ácido tricloroacético. As placas foram incubadas por 48 h a 37 °C, sendo na sequência fixadas com 10% TCA e coradas com 100 µL de SRB a 0,4% em 1% de ácido acético. O SRB ligado as células foi solubilizado com 10 mM de triz base. A absorbância foi mensurada em um leitor de microplaca no comprimento de onda de 515 nm.

Utilizando as absorbâncias mensuradas do T0, grupo controle (C) e do crescimento das células expostas aos tratamentos (Tx) a porcentagem de crescimento celular foi calculada para cada tratamento através da fórmula: $[1 - (Tx - T0)/(C - T0)] \times 100\%$ (Wang et al., 2013). No caso de $T > C$, a formulação estimula o crescimento e portanto o IC50 não existe, se $T \geq T0$ e $T < C$ a formulação é citostática, no caso de $T < T0$ a formulação é citotóxica.

4.6 MODELO ANIMAL

4.6.1 ANIMAIS

Este projeto tem sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas, protocolo número 3572-1. Todos os experimentos foram realizados entre 9:00h a 16:00h, e seguiram os padrões

estabelecidos pelo Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NRC, 2011). Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus* - albinus, Wistar), adultos jovens (60 dias), machos, pesando entre 200 a 250 g, que foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB), qualidade sanitária SPF (specific-pathogen free) e mantidos em câmaras com temperatura controlada ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) em ciclos claro-escuro de 12 horas, umidade (40-60%), com água e ração ad libitum. Após a chegada dos animais à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, os animais permaneceram uma semana para adaptação nas dependências do biotério de experimentação da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

4.6.2 INOCULAÇÃO DAS CÉLULAS DO CARCINOMA DE WALKER 256

A indução do carcinoma com as células de Walker 256 foi realizada seguindo o modelo de Brigatte et al. (2007). Células do tumor de Walker 256 foram obtidas do líquido ascítico da cavidade peritoneal, 7 dias após a injeção intraperitoneal de 1×10^7 células. As células coletadas foram contadas em câmara de Neubauer com 1% da solução de Trypan Blue. As células viáveis foram diluídas em tampão PBS (pH 7,4), acrescido de benzilpenicilina (120.000 unidades em 10 mL de suspensão celular, Benzetacil, Eurofarma, Brasil).

Para a inoculação da suspensão celular foram utilizadas seringas plásticas de 1 mL acopladas a agulhas de 26-G. Os animais foram previamente anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (90 mg/Kg) e xilasina (10 mg/Kg) e em seguida 200 μL da suspensão celular com densidade celular de 5×10^6 células/mL foram injetadas na região plantar da pata traseira direita. Na pata contralateral foi injetada solução salina, para controle do edema induzido pelo procedimento de inoculação das células tumorais.

4.6.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a comparação dos efeitos das diferentes formulações de lidocaína livre e complexada HP- β -CD sobre o crescimento e desenvolvimento do tumor de Walker 256 *in vivo*, foram realizadas avaliação do edema e análises histológicas da pata dos animais. Também foram quantificadas da liberação da citocina TNF- α .

Os animais foram divididos e quatro grupos de seis animais: grupo I – controle sem tratamento; grupo II - lidocaína 5%; grupo III - HP- β -CD lidocaína 5%; grupo IV – doxorubicina 3 mg/Kg/dia e grupo.

No terceiro dia após a inoculação das células de Walker 256, os animais receberam os tratamentos com 200 μ L da solução de lidocaína 5% ou lidocaína 5% em HP- β -CD no local da lesão. A doxorubicina foi administrada pela via intraperitoneal. Os animais foram tratados até o sexto dia após a inoculação das células cancerígenas. A última medida foi realizada no sétimo dia e em seguida os animais foram sacrificados e amostras do tecido interplantar foram coletados e congelados -80 °C. A pata foi fixada para realizar para procedimentos histológicos.

4.6.4 AVALIAÇÃO DO EDEMA

Para avaliação do edema foram feitas medições no momento antes da inoculação das células cancerígenas (tempo 0) e diariamente até completar o sexto dia de crescimento tumoral. O volume das patas até a região da articulação tibiotarsal foi mensurado através de um pletismômetro (Ugo Basile). Na pata contralateral foi administrado solução salina para avaliação da indução do edema causado pela técnica. A porcentagem de aumento no edema da pata foi determinada para cada pata através da diferença entre os valores em relação à medida inicial.

4.6.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A pata traseira direita foi removida e os tecidos foram seccionados e imersos completamente em paraformaldeído a 4% sob refrigeração de 8 °C por um período de 24 horas. Os tecidos ósseos foram descalcificados em uma solução de EDTA 10% em tampão fosfato 0,1 M. A solução de EDTA foi trocada diariamente, sendo que as patas foram mantidas nesta solução por 20 dias.

Em seguida, os tecidos foram desidratados em soluções crescentes de álcool (70, 80 e 90% e álcool absoluto), diafanizado em xilol e incluído em parafina histológica. Os blocos histológicos foram seccionados a 7 μ m de espessura em micrótomo e foi realizada a coloração por Hematoxilina-Eosina (HE). Após a

confeção das lâminas foram realizadas imagens em fotomicroscópio ótico (Leica DMLP/ MPS 60) no aumento de 5 x e 40 x.

4.6.6 EFEITOS SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA

As amostras do tecido interplantar coletados foram homogeneizadas e preservadas em tampão RIPA contendo cocktail com inibidores de proteases (Cell Signaling). Para a quantificação da liberação da citocina TNF- α foi utilizado o imunoenensaio de ELISA. A quantificação da liberação de citocinas foi feita de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, nas placas de 96 poços foram adicionados os padrões e amostras, assim como a solução diluente. Os poços foram homogeneizados e as placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Depois os poços foram lavados por cinco vezes, processo repetido antes de cada etapa. Em seguida foi adicionado 100 μ L por poço do anticorpo de detecção. As placas forma novamente incubadas por 2 horas e adicionou-se a solução substrato.

Após 30 minutos de incubação no escuro foi adicionado à solução de stop. A densidade óptica foi determinada dentro de 30 minutos utilizando um leitor de microplaca no comprimento de onda de 450 nm com correção de 540 nm. A concentração de TNF- α foi estabelecida através de uma correlação entre os dados das absorbâncias e a curva de calibração determinada pelo fabricante.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados quanto à sua normalidade de distribuição (teste de Shapiro-Wilks) e equivalência das variâncias (teste de Levene). Posteriormente os dados foram submetidos ao teste de Análise de Variância (ANOVA) utilizando o teste pos-hoc adequado. Todas as análises serão realizadas pelo pacote estatístico Bioestat[®] 5.0 e o nível de significância adotado será de 5% ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

5.1.1 EFEITOS DA LIDOCAÍNA E HP- β -CD LIDOCAÍNA NA VIABILIDADE CELULAR

Os resultados do efeito das formulações de lidocaína sobre a viabilidade das células HaCaT são apresentados na figura 1. A lidocaína e a HP- β -CD lidocaína apresentaram um perfil semelhante sobre a perda de viabilidade celular. Ambos reduziram significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade celular a partir da concentração 630 $\mu\text{g/mL}$. A média da viabilidade celular da lidocaína e HP- β -CD lidocaína foi de 70,3% e 60,3% respectivamente. Na concentração de 1.115 $\mu\text{g/mL}$ a média da viabilidade celular foi de 43,8% e 46,8% para lidocaína e HP- β -CD lidocaína respectivamente. Não houve diferença estatística entre os tratamentos de lidocaína e HP- β -CD lidocaína ($p < 0,05$, teste de ANOVA, Tukey).

Todavia, as concentrações mais elevadas de lidocaína e HP- β -CD lidocaína apresentaram uma viabilidade celular significativamente menor ($p < 0,01$) em relação ao tratamento 0.25 $\mu\text{g/mL}$ de doxorubicina. A doxorubicina nesta concentração apresentou uma média de 35.83% na viabilidade de celular. O IC_{50} para o tratamento com doxorubicina estabeleceu-se entre as concentrações de 0.025 $\mu\text{g/mL}$ e 0.25 $\mu\text{g/mL}$. Todos as concentrações de doxorubicina testadas reduziram significativamente a viabilidade celular em relação ao controle ($p < 0,05$).

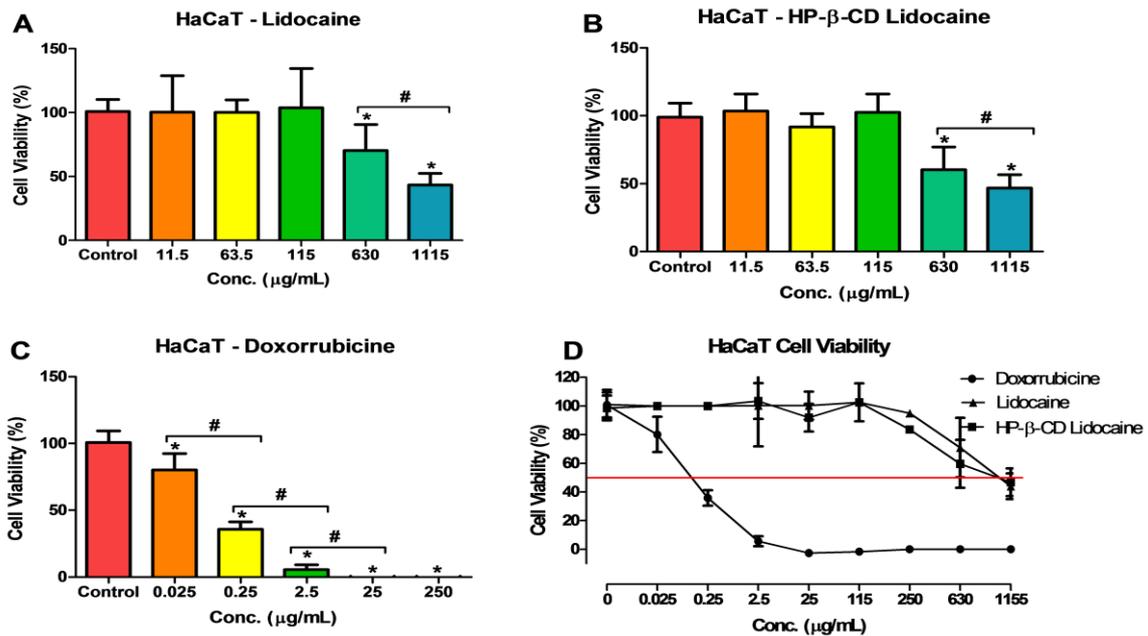


Figura 1.- Resultados da viabilidade celular das células HaCaT expostas por 24 h as formulações de lidocaína (A), HP-β-CD lidocaína (B) e doxorubicina (C). Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações estão marcadas com * ($p < 0.01$) pelo teste de ANOVA Tukey. O # demonstra diferenças significativas entre as concentrações, $p < 0.01$ teste de ANOVA Tukey.

A figura 2 apresenta os resultados da viabilidade celular sobre as células HeLa após o tratamento com as formulações de lidocaína e doxorubicina. Novamente a lidocaína e a HP-β-CD lidocaína apresentaram um perfil semelhante sobre a perda de viabilidade celular. Ambos reduziram significativamente a viabilidade celular a partir da concentração de 115 μg/mL. No entanto, a viabilidade celular foi menos afetada em comparação com as células HaCaT. Na maior concentração de lidocaína e HP-β-CD lidocaína a média da viabilidade celular foi de 79,8% e 77,3% respectivamente. Este resultado demonstra uma maior suscetibilidade das células HaCaT em relação as células HeLa após o tratamento com as formulações de lidocaína. Não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$, teste de ANOVA Tukey).

Na concentração de 1.115 μg/mL, as formulações de lidocaína e HP-β-CD lidocaína apresentaram uma viabilidade celular significativamente superior ($p < 0.01$) em relação ao tratamento 0.25 μg/mL de doxorubicina. A doxorubicina nesta concentração apresentou uma média de 60.6% na viabilidade de celular. O IC_{50} para o tratamento com doxorubicina estabeleceu-se entre 0.25 μg/mL e 2.5 μg/mL.

Todos os tratamentos com doxorrubicina reduziram significativamente a viabilidade celular em relação ao controle ($p < 0,05$).

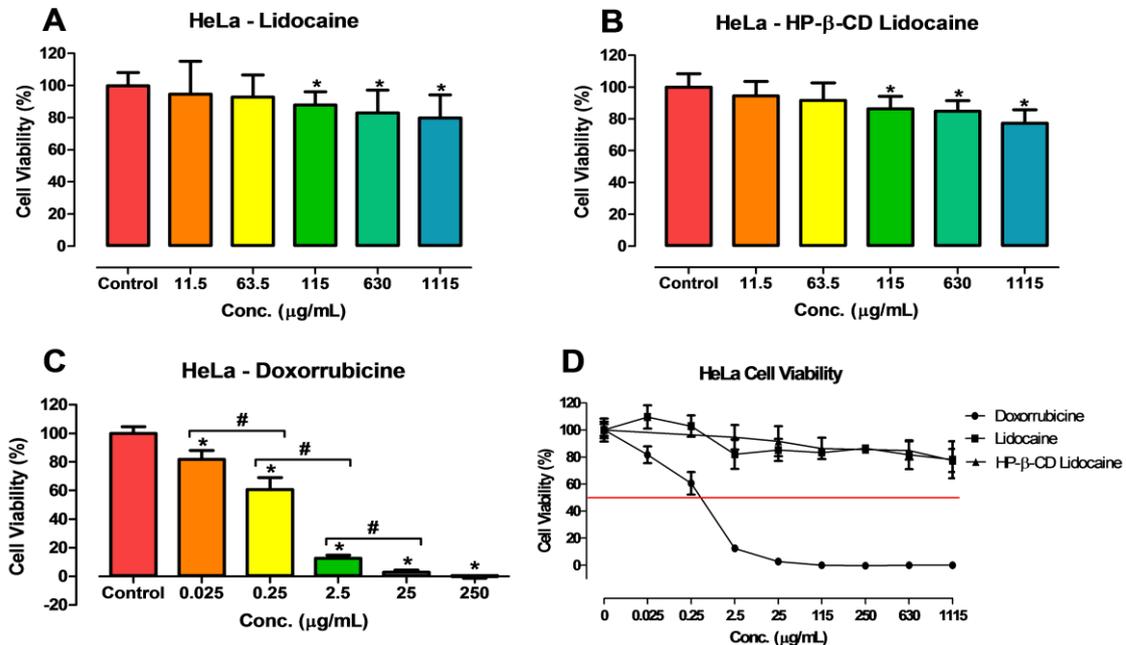


Figura 2.- Resultados da viabilidade celular das células HaCaT expostas por 24 h as formulações de lidocaína (A), HP-β-CD lidocaína (B) e doxorrubicina (C). Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações estão marcadas com * ($p < 0.01$) pelo teste de ANOVA Tukey. O # demonstra diferenças significativas entre as concentrações, $p < 0.01$ teste de ANOVA Tukey.

Os resultados da viabilidade celular obtidos pelo ensaio de redução do MTT foram confirmados através da microscopia de fluorescência pelo método de LIVE/DEAD. As figuras 4 e 5 apresentam as imagens das células HaCaT e HeLa respectivamente após 24 h de exposição aos tratamentos com lidocaína e HP-β-CD lidocaína na concentração de 1.115 µg/mL. Também foi utilizado a doxorrubicina 0,25 µg/mL. As concentrações dos tratamentos foram escolhidas por serem os valores mais próximos ao IC₅₀ de acordo com os resultados do ensaio do MTT.

As imagens obtidas por microscopia de fluorescência apresentaram um padrão similar aos resultados obtidos no ensaio de redução do MTT. Desta forma, as duas técnicas se mostraram complementares, onde a combinação destes dois métodos foi capaz de fornecer dados confiáveis em relação aos efeitos das formulações de lidocaína e doxorrubicina sobre a viabilidade das células HaCaT e HeLa.

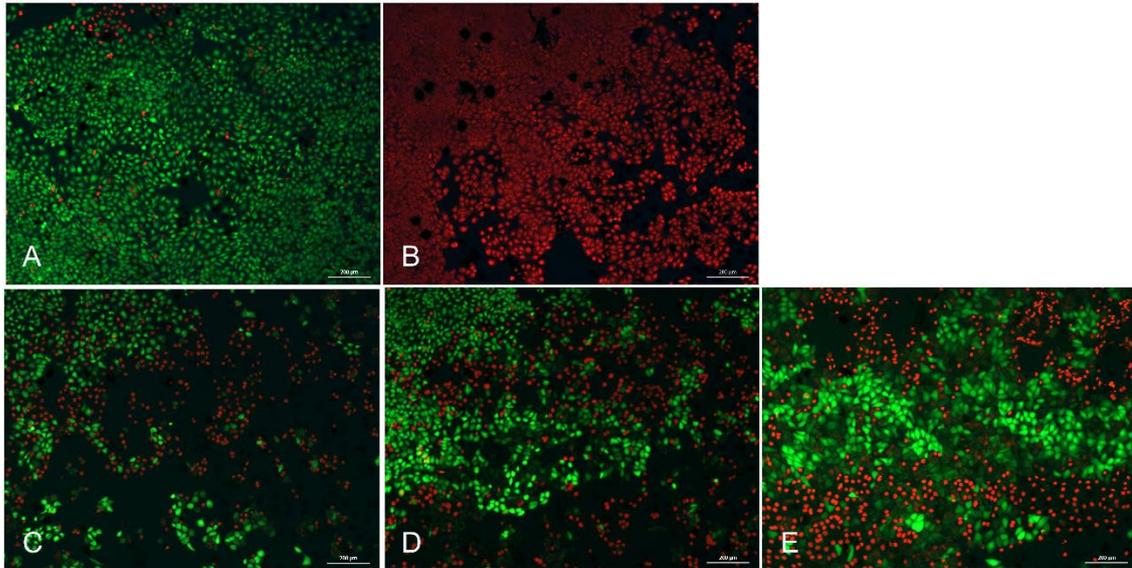


Figura 4.- Microscopia de fluorescência das células HaCaT viáveis e mortas após 24 h de exposição aos tratamentos: A – Controle; B – Controle negativo; C – Lidocaína 1.115 $\mu\text{g}/\text{mL}$; D - HP- β -CD lidocaína 1.115 $\mu\text{g}/\text{mL}$; E – Doxorrubicina 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Utilizou-se a objetiva de 5x, a calceína foi visualizada utilizando filtro na faixa de comprimento de onda 450-490 nm (Ex)/ 515-565 (Em). Já as células marcadas em vermelho (EtdH-1) foram visualizadas na faixa de comprimento de onda de 528-546 nm (Ex)/ 590-617nm (Em). O resultado corresponde a sobreposição das imagens.

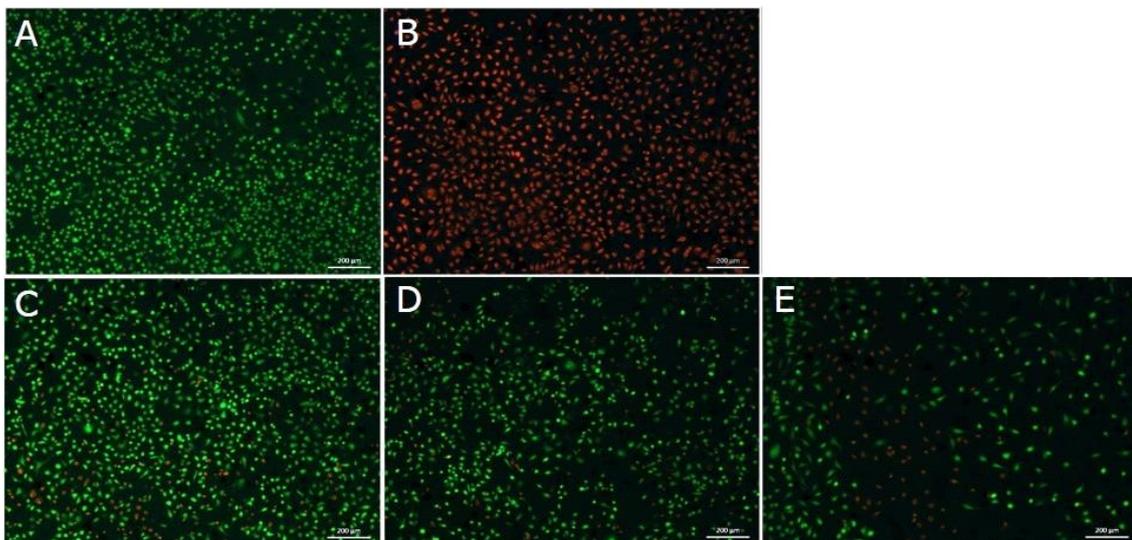


Figura 5.- Microscopia de fluorescência das células HeLa viáveis e mortas após 24 h de exposição aos tratamentos: A – Controle; B – Controle negativo; C – Lidocaína 1.115 $\mu\text{g}/\text{mL}$; D - HP- β -CD lidocaína 1.115 $\mu\text{g}/\text{mL}$; E – Doxorrubicina 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Utilizou-se a objetiva de 5x, a calceína foi visualizada utilizando filtro na faixa de comprimento de onda 450-490 nm (Ex)/ 515-565 (Em). Já as células marcadas em vermelho (EtdH-1) foram visualizadas na faixa de comprimento de onda de 528-546 nm (Ex)/ 590-617nm (Em). O resultado corresponde a sobreposição das imagens.

5.1.2 EFEITOS DA LIDOCAÍNA E HP- β -CD LIDOCAÍNA NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A lidocaína e HP- β -CD lidocaína foram capazes de afetar a proliferação celular. Os resultados da atividade antiproliferativa nas células HaCaT e HeLa após exposição aos tratamentos com lidocaína, HP- β -CD lidocaína são apresentados na figura 6.

Apesar dos tratamentos apresentarem um perfil semelhante em ambas as células, foi observado uma maior sensibilidade das células HaCaT após os tratamentos com doxorrubicina e lidocaína. Nas células HaCaT o efeito citotóxico da doxorrubicina foi observado a partir da concentração 0,25 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que nas células HeLa o efeito citotóxico se iniciou na concentração 2,5 $\mu\text{g/mL}$.

O tratamento com lidocaína 1.115 $\mu\text{g/mL}$ apresentou efeito citotóxico nas células HaCaT, porém nas células HeLa manteve-se citostático, apesar do crescimento celular ter uma média de apenas 12,6%. Além disso, os efeitos da lidocaína sobre a proliferação celular nas células HaCaT começaram a apresentar diferenças estatísticas ($p < 0,01$) em comparação ao controle na concentração 115 $\mu\text{g/mL}$, sendo a média do crescimento celular igual a 85%. Nas células HeLa houve redução significativa ($p < 0,01$) em relação ao controle no crescimento celular apenas nas concentrações 630 $\mu\text{g/mL}$ e 1.115 $\mu\text{g/mL}$. A média do crescimento celular foi de 60,5% e 13,5% respectivamente após exposição a HP- β -CD lidocaína e de 51,9% e 6,4% quando as células foram tratadas com lidocaína.

A lidocaína livre apresentou uma atividade antiproliferativa mais acentuada que a HP- β -CD lidocaína, reduzindo significativamente ($p < 0,01$) o crescimento celular nas concentrações 115 $\mu\text{g/mL}$, 630 $\mu\text{g/mL}$ e 1.115 $\mu\text{g/mL}$ em comparação com a HP- β -CD lidocaína nas mesmas concentrações sobre as células HaCaT. A média do crescimento celular foi de 85%, 9% e -10,4% respectivamente, após o tratamento com lidocaína. Enquanto a médias do crescimento celular das células tratadas com HP- β -CD lidocaína foi de 103,8%, 59,7% e 12,6%. Nas células HeLa não houve diferença na proliferação celular entre os tratamentos com lidocaína e HP- β -CD lidocaína.

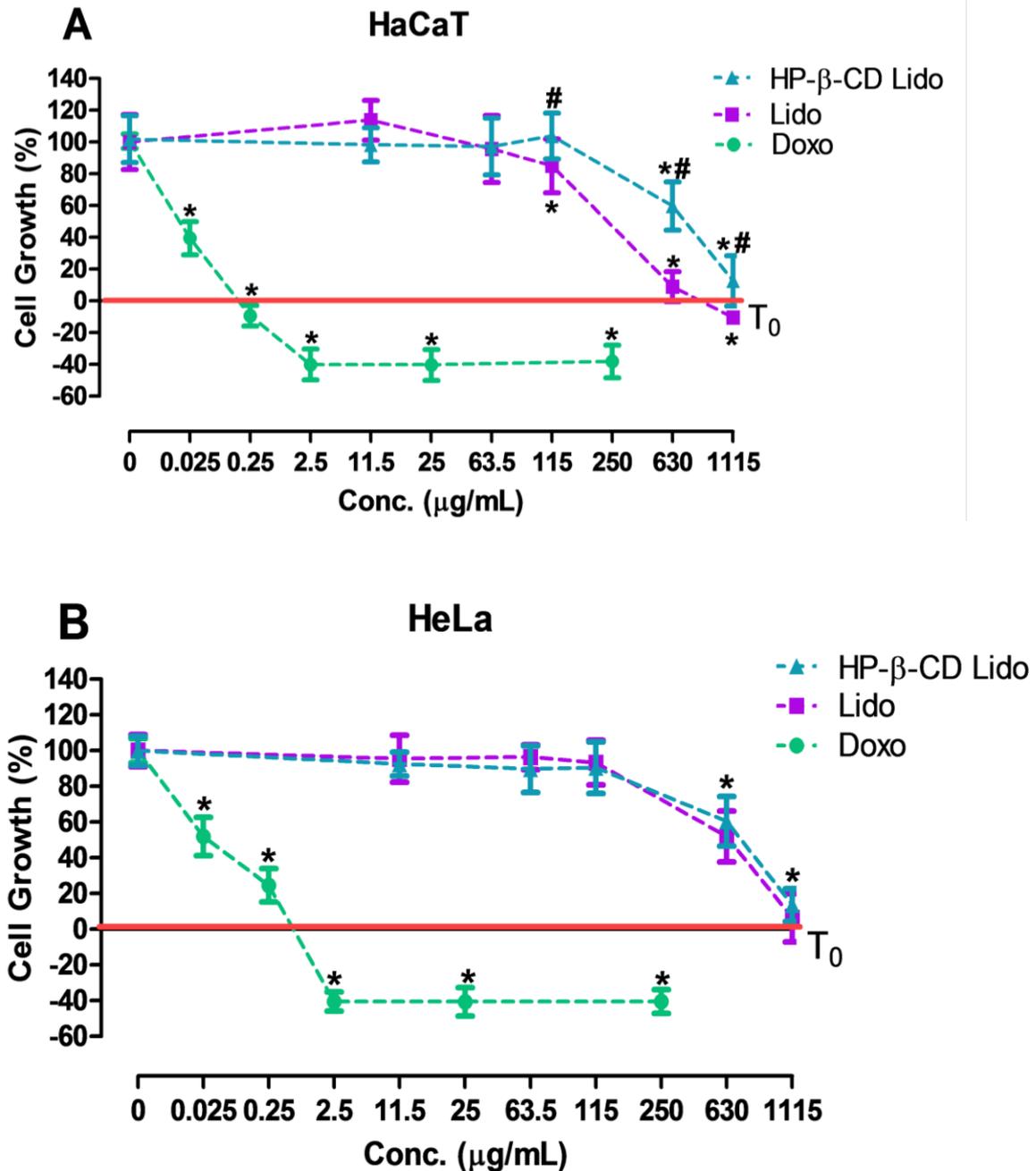


Figura 6.- Efeito antiproliferativo dos tratamentos de lidocaína (lido), HP-β-CD lidocaína (HP-β-CD lido) e doxorrubicina (doxo) sobre as células HaCaT (A) e HeLa (B). O gráfico apresenta as médias com o desvio padrão, as diferenças estatísticas entre os tratamentos em relação ao controle ($p < 0,05$) estão identificadas pelo *; # identifica diferença estatística ($p < 0,01$) entre os tratamentos de Lido e HP-β-CD lido nas mesmas concentrações. Teste de ANOVA, Tukey. T_0 – marca início do crescimento celular.

5.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

5.2.1 EFEITOS DA LIDOCAÍNA E HP- β -CD LIDOCAÍNA SOBRE O EDEMA DA PATA.

O edema foi mensurado através da alteração no volume da pata (figura 7). O tratamento com doxorrubicina não apresentou diferença estatística em relação a pata contralateral ao longo do tempo, demonstrando a eficiência deste medicamento no controle do crescimento tumoral e da inflamação no local da lesão.

Com o crescimento do tumor o volume da pata foi aumentando gradativamente nos grupos controle, lidocaína e HP- β -CD lidocaína. A partir do quarto dia da inoculação das células de Walker 256, o volume da pata no grupo controle foi em média 1,72 ($\pm 0,3$) vezes maior que o inicial. Nos tratamentos com lidocaína e HP- β -CD lidocaína o aumento do volume da pata, em relação ao inicial, foi em média 1,81 ($\pm 0,26$) e 1,64 ($\pm 0,06$) vezes respectivamente. Estes grupos apresentaram diferença estatística em relação aos grupos doxorrubicina e contralateral ($p < 0,01$).

No entanto, no sexto dia os animais tratados com lidocaína e HP- β -CD lidocaína apresentaram o volume de pata significativamente menor ($p < 0,01$) em comparação com o grupo controle. Ao final do experimento, os tratamentos com lidocaína e HP- β -CD lidocaína registraram um aumento médio no volume da pata de 2,58 ($\pm 1,1$) e 2,22 ($\pm 0,25$) vezes respectivamente, em relação ao valor inicial. Todavia, a média do grupo controle foi um aumento de 3,53 ($\pm 1,38$) vezes em relação ao valor inicial.

Desta forma, estes tratamentos com lidocaína e HP- β -CD lidocaína podem influenciar no edema causado pelo crescimento do tumor de Walker 256, apesar de ainda haver um aumento significativo quando comparado aos grupos doxorrubicina e contralateral.

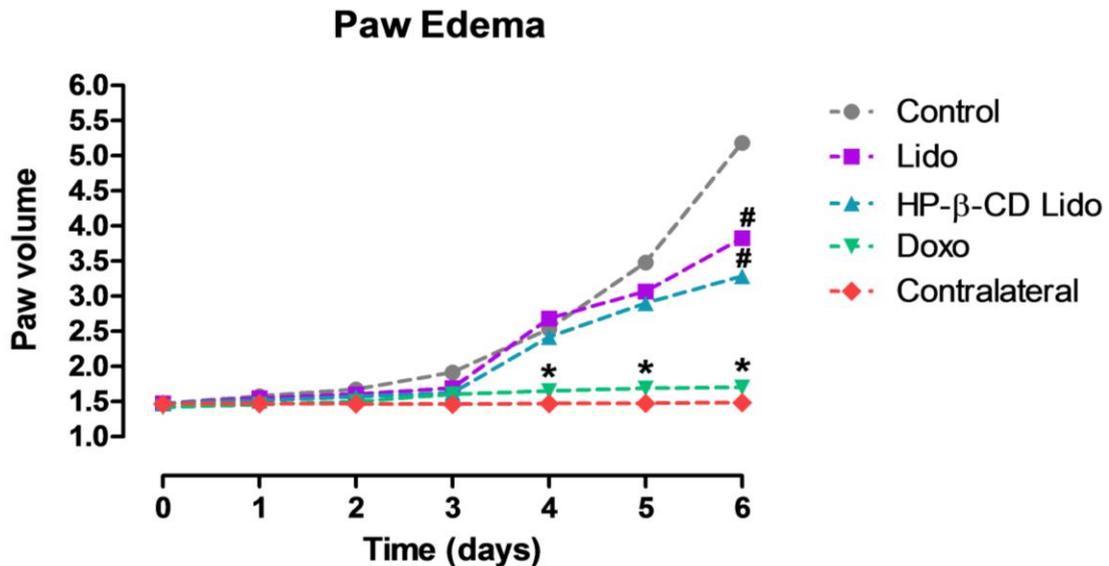


Figura 7. - Média do volume da pata dos animais tratados com lidocaína (lido), HP-β-CD lidocaína (HP-β-CD lido), doxorubicina (doxo), sem tratamento (control) e da pata contralateral. * Diferença estatística entre contralateral e doxorubicina e os demais grupos, $p < 0.01$; # Diferença estatística entre os tratamentos de lidocaína e HP-β-CD lidocaína e o grupo controle, $p < 0,01$. Teste de Two Away ANOVA e Bonferroni foi utilizado como pós-teste.

5.2.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Na figura 8 são apresentados os resultados das laminais histológicas realizadas na pata dos animais após a inoculação das células de Walker 256 e aplicação dos tratamentos previamente descritos. Nos grupos controle, lidocaína e HP-β-CD lidocaína (figuras 5B, 5D e 5E respectivamente) é possível observar a formação de abscessos. Também foi verificado a proliferação celular através dos espaços intracelulares, invadindo os tecidos conjuntivos e também musculares próximas a região do periósseo. O tratamento com doxorubicina apresentou uma melhora muito significativa, onde não se verificou a presença de células tumorais (figura 5F), apresentando um tecido com características muito semelhantes à do grupo sham (figura 5C).

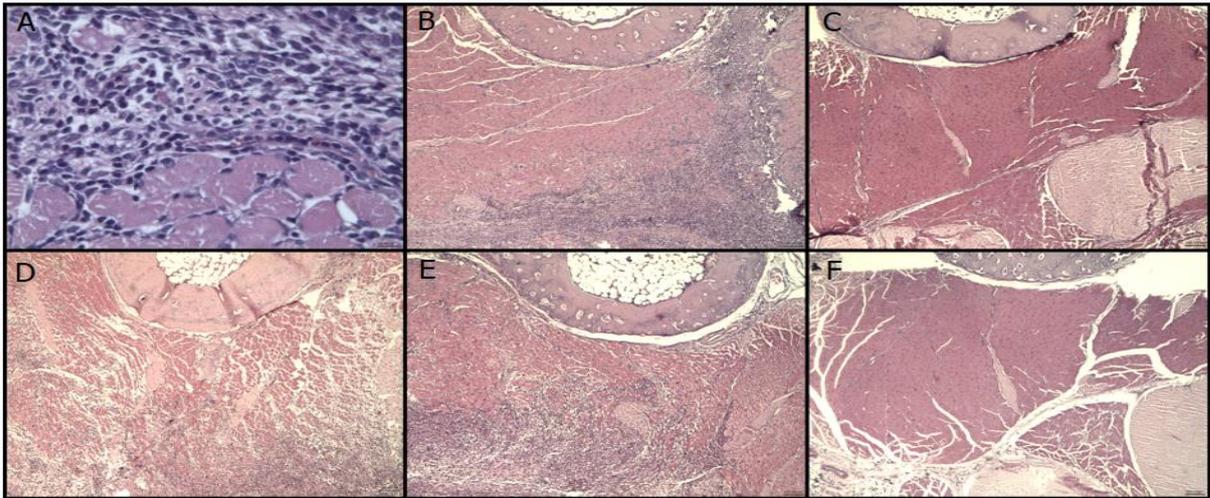


Figura 8.- Laminas histológicas da pata dos ratos. Na figura A é demonstrado em maiores detalhes as células do tumor de Walker 256 (aumento 40x). As figuras B, C, D, E e F correspondem a imagens representativas do grupo controle, sham, lidocaína, HP-β-CD lidocaína e doxorubicina respectivamente (aumento 5x). Coloração H-E.

5.2.3 EFEITOS DA LIDOCAÍNA E HP- β -CD LIDOCAÍNA SOBRE A LIBERAÇÃO DE TNF- α

Os resultados quantificação de TNF-α, são apresentados na figura 9. No grupo controle o crescimento tumoral induziu a um aumento significativo na produção e liberação de TNF-α no tecido interplantar, sendo que a mediana para o grupo controle foi de 8,53 pg/mL enquanto que no grupo sham a mediana de 1,12 pg/mL. Estes resultados foram significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A concentração TNF-α no tecido interplantar dos animais tratados com lidocaína e HP-β-CD lidocaína foi de 6,02 pg/mL e 6,14 pg/mL (mediana). Não houve diferença estatística em comparação ao grupo controle. No entanto, aumentaram significativamente ($p < 0,05$) os níveis de TNF-α em relação ao grupo sham. O tratamento com doxorubicina apresentou níveis de TNF-α com mediana de 1,63 pg/mL, desta foram não apresentou diferença estatística em relação ao grupo sham. Também foi significativamente menor ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle.

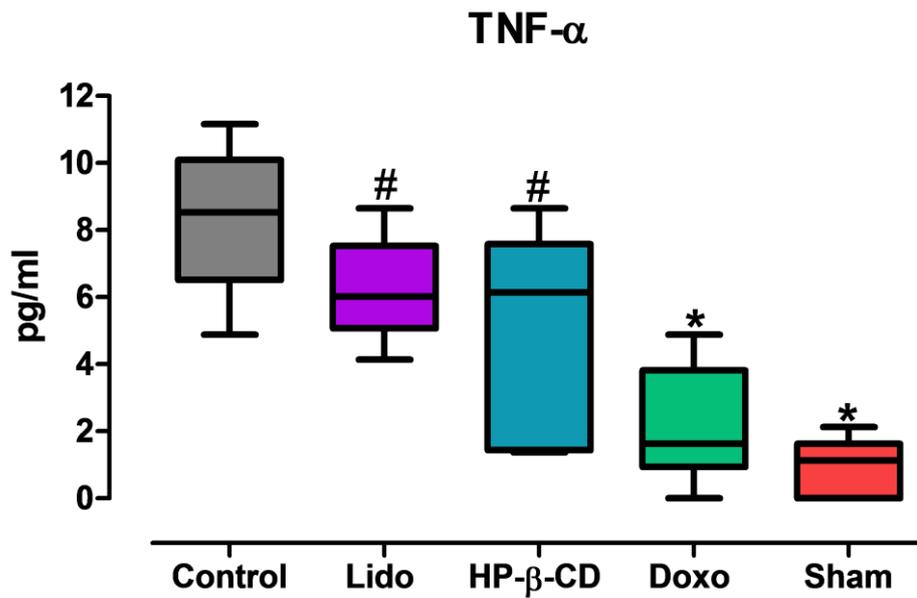


Figura 9.- Quantificação de TNF- α no tecido interplantar após o tratamento com lidocaína (Lido), HP- β -CD lidocaína (HP- β -CD), doxorrubicina (doxo), sem tratamento (control) e no grupo sham. Os valores representam a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferença estatística em relação ao grupo controle está identificado por * com $p < 0,01$. # Diferença estatística em comparação ao grupo Sham, $p < 0,05$, teste de de Kruskal-Wallis Student-Newman-Keuls.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo verificar os efeitos *in vitro* da lidocaína e HP- β -CD lidocaína sobre a viabilidade celular e proliferação celular nas células HaCaT e HeLa. Além disso, foi verificado *in vivo* o efeito dessas formulações sobre o crescimento tumoral e resposta inflamatória.

A citotoxicidade da lidocaína tem sido verificada em diversos modelos *in vitro* e *in vivo*, utilizando diferentes tipos celulares (Keck et al., 2010; Jacobs et al., 2011). Em células tumorais, os anestésicos locais apresentam efeitos citotóxicos dose e tempo dependentes (Karpie et al., 2007, Mallet et al., 2015; Kang et al., 2016). No entanto, os diferentes modelos experimentais aplicados, as diferenças na concentração e tempo de exposição utilizados, dificultam uma comparação mais precisa entre os efeitos citotóxicos dos anestésicos locais e a suscetibilidade dos diferentes tipos celulares testados.

A lidocaína tem demonstrado efeitos citotóxicos em concentrações variando de 2.000 μ M à 4.000 μ M, também em concentrações superiores, em células cancerígenas e não cancerígenas (Boselli et al., 2003; Johnson et al., 2004; Sakaguchi et al., 2006).

Em modelo *in vitro* similar ao aplicado neste estudo, a lidocaína nas concentrações de 1mM, 4 mM e 10 mM reduziu significativamente a viabilidade celular em células de neuroblastoma SH-SY5Y. Neste mesmo estudo, as concentrações de 4mM e 10 mM aumentaram significativamente a morte celular das células HeLa (Okamoto et al., 2016).

Estes resultados corroboram com os dados apresentados no presente estudo, onde os tratamentos com lidocaína e HP- β -CD lidocaína nas concentrações de 630 μ g/mL e 1.115 μ g/mL, equivalente a 2,2 mM e 4 mM, foram os que mais afetaram a viabilidade celular de maneira dose dependente. Todavia a viabilidade das células HeLa também foi significativamente reduzida no tratamento com 115 μ g/mL (0,4 mM), sendo um resultado diferente do observado por Okamoto et al., (2016). Esta divergência nos resultados pode estar relacionada a diferenças metodológicas, repetições aplicadas e também a sensibilidade dos testes.

Outros estudos similares demonstraram redução da viabilidade das células de câncer de mama (MDA-MB-231), câncer de próstata (PC-3), de ovário

(ES-2) e do carcinoma escamoso de células de língua (CAL27) após exposição a lidocaína em concentrações de 2 mM à 5 mM (Sakaguchi et al., 2006; Jiang et al., 2016).

Os resultados também mostraram uma maior suscetibilidade das células HaCaT em comparação as células HeLa após exposição as formulações de lidocaína. Além disso, a complexação de lidocaína em HP- β -CD não afetou o efeito do anestésico sobre a viabilidade das células.

O estudo também investigou o efeito das formulações de lidocaína e HP- β -CD lidocaína sobre a proliferação celular. A lidocaína começou a exercer efeitos antiproliferativos sobre as células HaCaT e HeLa em concentrações de 115 μ g/mL e 630 μ g/mL respectivamente.

Estes resultados estão de acordo com outros estudos que tem demonstrado o efeito dos anestésicos locais sobre a inibição da proliferação celular em diversos tipos celulares, incluindo células cancerígenas (Scherb et al., 2009; Lucchinetti et al., 2012).

A lidocaína apresentou efeitos antiproliferativos de maneira dose dependente em células tronco mesenquimais, câncer de mama (BT-20 e MCF-7), adenocarcinoma de colón (HT-29 e Caco-2) e em células HepG2 de carcinoma hepatocelular (Martinsson, 1999; Lucchinetti et al., 2012; Lirk et al., 2014; Lirk et al., 2014; Xing et al., 2017).

A exposição por 72 horas a lidocaína na concentração de 400 μ M reduziu a proliferação celular das células de carcinoma escamoso de língua (CAL27) estimuladas com soro fetal bovino e fator de crescimento epitelial (Sakaguchi et al., 2006).

A atividade antiproliferativa pode estar relacionada ao efeito dos anestésicos locais sobre o ciclo celular. Diversos estudo tem demonstrado o efeito dos anestésicos locais em manter a célula estacionada na fase G0/G1. Em células tronco mesenquimais, 100 μ M de ropivacaína induziu a um aumento da expressão de inibidores do ciclo celular como o p16INK4 e p27KIP1 (Lucchinetti et al., 2012). Em células de câncer de pulmão, das linhagens A549 e H520, a exposição a lidocaína aumentou significativamente a porcentagem de células na fase G0/G1 (Wang et al., 2016).

A complexação em HP- β -CD não afetou os efeitos antiproliferativos da lidocaína nas células HeLa. Todavia o complexo apresentou um perfil diferente em

relação a lidocaína nas células HaCaT. A HP- β -CD lidocaína só exerceu efeitos antiproliferativos em concentrações superiores a 115 $\mu\text{g/mL}$ e apresentou uma atividade antiproliferativa significativamente menor que a lidocaína livre. Esses resultados demonstram repostas distintas das células HeLa e HaCaT após exposição as formulações de lidocaína.

Após os testes *in vitro*, verificou-se os efeitos das formulações de lidocaína em um modelo *in vivo* utilizando a inoculação de células de tumor de Walker 256 na região interplantar. Os tratamentos com 5% lidocaína e 5% HP- β -CD lidocaína reduziram significativamente o edema em comparação ao grupo controle (sem tratamento). Porém, não foram tão eficientes quanto a doxorrubicina que apresentou resultados semelhantes ao grupo sham na análise histológica.

Estes resultados estão de acordo com os observados por Xing e colaboradores (2017), que utilizando um modelo subcutâneo em camundongos (BALB/c-nu/nu) verificou que a lidocaína (30 mg/Kg) duas vezes por semana reduziu a progressão do tumor em comparação ao grupo PBS.

Era esperado um efeito mais acentuado no grupo tratado com HP- β -CD lidocaína. Os sistemas de liberação de fármacos atuam como reservatório causando uma liberação mais lenta e conseqüentemente prolongando a permanência do fármaco no local (de Paula et al., 2010). Todavia, apesar do grupo tratado com HP- β -CD lidocaína apresentar um edema menor em relação ao grupo lidocaína, não houve diferença estatística entre os tratamentos.

A lidocaína pode influenciar o edema induzido pelo tumor de forma direta ou indireta. O anestésico local pode exercer efeitos diretos ao reduzir a viabilidade e a proliferação celular. Indiretamente o fármaco pode atenuar a resposta inflamatória no local.

Os anestésicos locais vêm demonstrando efeitos anti-inflamatórios, através da redução da ativação de macrófagos e da adesão e migração de neutrófilos (Tasi *et al.*, 2012; Dernek *et al.*, 2016). Além disso, podem reduzir a liberação de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios (Caracas *et al.*, 2009). A administração de lidocaína e bupivacaína pode reduzir a permeabilidade vascular e conseqüentemente reduzir o edema (Rimback *et al.*, 1988).

Observando essa propriedade dos anestésicos locais, foi quantificado a citocina TNF- α no tecido interplantar. O TNF- α é um potente mediador pró-inflamatório que está diretamente envolvido na cascata inflamatória, sendo

rapidamente produzido em grandes quantidades em resposta ao estímulo inflamatório (Verri *et al.*, 2006). Os tratamentos com as formulações de lidocaína não modificaram a produção de TNF- α induzida pelo crescimento tumoral.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, a lidocaína reduziu a viabilidade celular e a proliferação das células HaCaT e HeLa em modelos *in vitro*. A complexação de HP- β -CD apresentou resultados próximos ao da lidocaína livre. Estes resultados apresentaram correspondência com os ensaios *in vivo*, onde ambas as formulações reduziram o edema induzido pelo crescimento tumoral. As formulações de lidocaína parecem exercer um efeito direto sobre o tumor de Walker 256. Não houve alteração na produção de TNF- α , o que pode indicar uma ausência de efeito das formulações de lidocaína sobre a resposta inflamatória no local.

REFERÊNCIAS

1. Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol.* 1991;32:223-54.
2. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(2 Suppl):S460-75.
3. Boselli E, Duflo F, Debon R, Allaouchiche B, Chassard D, Thomas L, Portoukalian J. The induction of apoptosis by local anesthetics: a comparison between lidocaine and ropivacaine. *Anesth Analg.* 2003;96(3):755-6.
4. Brigatte P, Sampaio SC, Gutierrez VP, Guerra JL, Sinhorini IL, Curi R, Cury Y. Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain. *J Pain.* 2007 May;8(5):412-21.
5. Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science.* 1995;10:267(5203):1485-8.
6. Caracas HC, Maciel JV, Martins PM, de Souza MM, Maia LC. The use of lidocaine as an anti-inflammatory substance: a systematic review. *J Dent.* 2009; 37(2):93-7.
7. Cereda CM, Brunetto GB, de Araújo DR, de Paula E. Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. *Can J Anaesth.* 2006;53(11):1092-7.
8. Chang L, Zhang Z, Yang J, McLaughlin SH, Barford D. Molecular architecture and mechanism of the anaphase-promoting complex. *Nature.* 2014 Sep 18; 513(7518):388-93.
9. Choudhary M, Ahlawat RS. Interleukin-6 and C-Reactive Protein in pathogenesis of diabetic nephropathy: new evidence linking inflammation, glycemic control, and microalbuminuria. *Iran J Kidney Dis.* 2008;2(2):72-9.
10. D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ.* 2010;17(7):1104-14.
11. Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(12):1023-35.
12. de Araújo DR, Braga AFA, Moraes CM, Fraceto LF, de Paula E. Mistura com Excesso Enantiomérico de 50% (S75-R25) de Bupivacaína Complexada com Ciclodextrinas e Anestesia por Via Subaracnóidea em Ratos. *Rev Bras Anesthesiol.* 2006;56(5):495-506.
13. de Paula E, Cereda CM, Tofoli GR, Franz-Montan M, Fraceto LF, de Araújo DR. Drug delivery systems for local anesthetics. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2010; 4(1):23-34.

14. de Paula E, Shreier, S. Molecular and physico chemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. *Braz J Med Biol Res* 1995;29:877-94.
15. Dernek B, Aydin T, Koseoglu PK, Kesiktas FN, Yesilyurt T, Diracoglu D, Aksoy C. Comparison of the efficacy of lidocaine and betamethasone dipropionate in carpal tunnel syndrome injection. *J Back Musculoskelet Rehabil.* 2016 Dec 23.
16. Dollo G, Le Corre P, Freville JC, Chevanne F, Le Verge R. Biopharmaceutics of local anesthetic-cyclodextrin complexes following loco-regional administration. *Ann Pharm Fr.* 2000;58:425-32.
17. Dollo G, Thompson DO, Le Corre P, Chevanne, F, Le Verge R. Inclusion complexation of amide-typed local anesthetics with β -cyclodextrin and its derivatives. III. Biopharmaceutics of bupivacaine-SBE7- β -CD complex following percutaneous sciatic nerve administration in rabbits. *Int J Pharm* 1998;164:11-9.
18. Drago JL, Korotkova T, Wood B, The effect of local anesthetics administered via pain pump on chondrocyte viability. *Am J Sports Med.* 2008;36:1484-8.
19. Duchêne D, Wouessidjewe D. The current state of β -cyclodextrin in pharmaceuticals. *Acta Pharm Technol.* 1990;36:1-6.
20. Estebe JP, Ecoffey C, Dollo G, Le Corre P, Chevanne F, Le Verge R. Bupivacaine pharmacokinetics and motor blockade following epidural administration of the bupivacaine-sulfobutylether-7-beta-cyclodextrin complex in sheep. *Eur J Anaesthesiol.* 2002;19:308–10.
21. Feng G, Liu S, Wang GL, Liu GJ. Lidocaine attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through inhibiting NF-kappaB activation. *Pharmacology.* 2008;81(1):32-40.
22. Freville JC, Dollo G, Le Corre P, Chevanne F, Le Verge R. Controlled systemic absorption and increased anesthetic effect of bupivacaine following epidural administration of bupivacaine-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex. *Pharm. Res.* 1996;13:1576–80.
23. Friederich P, Schmitz TP. Lidocaine-induced cell death in a human model of neuronal apoptosis. *Eur J Anaesthesiol.* 2002;19(8):564-70.
24. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001;294:1871–5.
25. Gold MS, Reichling DB, Hampl KF, Drasner K, Levine JD. Lidocaine toxicity in primary afferent neurons from the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;285:413–21.
26. Gomoll AH, Kang RW, Williams JM, Bach BR, Cole BJ. Chondrolysis after continuous intra-articular bupivacaine infusion: an experimental model investigating chondrotoxicity in the rabbit shoulder. *Arthroscopy.* 2006;22(8):813-9.
27. Grant AS. The holy grail: long-acting local anesthetics and liposomes. *Best Pract Res Clin Anesthesiol.* 2002;16:345-52.

28. Grishko V, Xu M, Wilson G, Pearsall AW 4th. Apoptosis and mitochondrial dysfunction in human chondrocytes following exposure to lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine. *J Bone Joint Surg Am.* 2010;92(3):609-18.
29. Guedes C, A black woman, her cells, and some challenges for research ethics v.20, supl., nov. 2013;1413-6.
30. Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Krönke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA. Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature.* 1993;365(6442):182-5.
31. Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology* 2000;93(3):858-75.
32. Huang YH, Tsai PS, Huang CJ. Bupivacaine inhibits COX-2 expression, PGE2, and cytokine production in endotoxin-activated macrophages. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2008;52(4):530-5.
33. Instituto Nacional de Câncer no Brasil. Estimativa 2016. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.
34. Jacobs TF, Vansintjan PS, Roels N, Herregods SS, Verbruggen G, Herregods LL et al. The effect of Lidocaine on the viability of cultivated mature human cartilage cells: an *in vitro* study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19(7):1206-13.
35. Jiang Y, Gou H, Zhu J, Tian S, Yu L. Lidocaine inhibits the invasion and migration of TRPV6-expressing cancer cells by TRPV6 downregulation. *Oncol Lett.* 2016;12(2):1164-70.
36. Johnson ME, Uhl CB, Spittler KH, Wang H, Gores GJ. Mitochondrial injury and caspase activation by the local anesthetic lidocaine. *Anesthesiology.* 2004; 101(5):1184-94.
37. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol.* 2012;188(1):21-8.
38. Kamiya Y, Ohta K, Kaneko Y. Lidocaine-induced apoptosis and necrosis in U937 cells depending on its dosage. *Biomed Res.* 2005;26:231-9.
39. Kang DK, Zhao LY, Wang HL. Cytotoxic effects of local anesthesia through lidocaine/ropivacaine on human melanoma cell lines. *Braz J Anesthesiol.* 2016; 66(6):594-602.
40. Karpie JC, Chu CR. Lidocaine exhibits dose- and time-dependent cytotoxic effects on bovine articular chondrocytes *in vitro*. *Am J Sports Med.* 2007;35(10):1621-7.
41. Keck M, Zeyda M, Gollinger K, Burjak S, Kamolz LP, Frey M, Stulnig TM. Local anesthetics have a major impact on viability of preadipocytes and their differentiation into adipocytes. *Plast. Reconstr. Surg.* 2010;126(5):1500-5.
42. Kraychete DC, Calasans, MTA, Valente, CML. Pro-inflammatory cytokines and pain. *Rev Bras Reumatol.* 2006;46:199-206.

43. Kuzma PJ, Kline MD, Calkins MD, Staats PS. Progress in the development of ultralong-acting local anesthetics. *Reg Anesth*. 1997;22:543–51.
44. Lang A, Ben Horin S, Picard O, Fudim E, Amariglio N, Chowers Y. Lidocaine inhibits epithelial chemokine secretion via inhibition of nuclear factor kappa β activation. *Immunobiology*. 2010;215(4):304-13.
45. Licinio J. Central nervous system cytokines and their relevance for neurotoxicity. *J Neural Transm*. 1997;49:169-75.
46. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993 Apr;362(6422):709-15. doi:10.1038/362709a0
47. Lirk P, Berger R, Hollmann MW, Fiegl H. Lidocaine time and dose-dependently demethylates deoxyribonucleic acid in breast cancer cell lines *in vitro*. *Br J Anaesth*. 2012;109:200–7.
48. Lirk P, Hollmann MW, Fleischer M, Weber NC, Fiegl H. Lidocaine and ropivacaine, but not bupivacaine, demethylate deoxyribonucleic acid in breast cancer cells *in vitro*. *Br J Anaesth*. 2014; 113(suppl 1):i32–8.
49. Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm*. 2007;329:1-11.
50. Loftsson T, Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int J Pharm*. 2001;225:15-30.
51. Lucchinetti E, Awad AE, Rahman M, Feng J, Lou PH, Zhang L, Ionescu L, Lemieux H, Thébaud B, Zaugg M. Antiproliferative effects of local anesthetics on mesenchymal stem cells: potential implications for tumor spreading and wound healing. *Anesthesiology*. 2012;116(4):841-56.
52. Malet A, Faure MO, Deletage N, Pereira B, Haas J, Lambert G. The comparative cytotoxic effects of different local anesthetics on a human neuroblastoma cell line. *Anesth Analg*. 2015;120(3):589-96.
53. Martinsson T. Ropivacaine inhibits serum-induced proliferation of colon adenocarcinoma cells *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;288(2):660-4.
54. Nau C, Wang GK. Interactions of local anesthetics with voltage-gated Na⁺ channels. *J Membr Biol*. 2004;201(1):1-8.
55. Ngom PI, Dubray C, Woda A, Dallel R. A human oral capsaicin pain model to assess topical anesthetic: analgesic drugs. *Neurosci Lett* 2001;316:149–52.
56. Okamoto A, Tanaka M, Sumi C, Oku K, Kusunoki M, Nishi K, Matsuo Y, Takenaga K, Shingu K, Hirota K. The antioxidant N-acetyl cysteine suppresses lidocaine-induced intracellular reactive oxygen species production and cell death in neuronal SH-SY5Y cells. *BMC Anesthesiol*. 2016;16(1):104.
57. Oliveira AC, Rodríguez IA, Garzón I, Martín-Piedra MA, Alfonso-Rodríguez CA, García JM et al. An early and late cytotoxicity evaluation of lidocaine on human oral mucosa fibroblasts. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013 Oct 16.

58. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin. Immunol.* 2006;119:229-40.
59. Pascoal AC, Ehrenfried CA, Lopez BG, de Araujo TM, Pascoal VD, Gilioli R, Anhê GF7, Ruiz AL, Carvalho JE, Stefanello ME, Salvador MJ. Antiproliferative Activity and Induction of Apoptosis in PC-3 Cells by the Chalcone Cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a Bioactivity-Guided Study. *Molecules.* 2014;19(2):1843-55.
60. Peck SL, Johnston RB, Horwitz LD. Reduced neutrophil superoxide anion release after prolonged infusion of lidocaine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1985;235: 418–22.
61. Perez-Castro R, Patel S, Garavito-Aguilar ZV, Rosenberg A, Recio-Pinto E, Zhan J et al. Cytotoxicity of local anesthetics in human neuronal cells. *Anesth Analg.* 2009;108(3):997-1007.
62. Rimbäck G, Cassuto J, Wallin G, Westlander G. Inhibition of peritonitis by amide local anesthetics. *Anesthesiology.* 1988;69(6):881-6.
63. Sakaguchi M, Kuroda Y, Hirose M. The antiproliferative effect of lidocaine on human tongue cancer cells with inhibition of the activity of epidermal growth factor receptor. *Anesth Analg.* 2006 Apr;102(4):1103-7.
64. Sambrook PJ, Goss AN. Severe adverse reactions to dental local anaesthetics: prolonged mandibular and lingual nerve anaesthesia. *Aust Dent J.* 2011;56(2): 154-9.
65. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:39-85. doi: 10.1146/annurev.biochem.73011303.073723
66. Scherb MB, Han SH, Courneya JP, Guyton GP, Schon LC. Effect of bupivacaine on cultured tenocytes. *Orthopedics.* 2009 32(1):26.
67. Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 1999 Mar;112(3):343-53.
- Sheeran P, Hall GM. Cytokines in anaesthesia. *Br J Anaesth.* 1997;78(2):201-19.
68. Shikanov A, Domb AJ, Weiniger CF. Long acting local anesthetic-polymer formulation to prolong the effect of analgesia. *Journal of Controlled Release*, vol. 117, no. 1, pp. 97–103,2007.
69. Sisk AL. Long-acting local anesthetics in dentistry. *Anesth Prog.* 1992;39(3):53-60.
70. Stegman MB, Stoukides CA. Resolution of tumor pain with EMLA cream. *Pharmacotherapy* 1996;16:694–7.
71. Strichartz G, Ritchie J. The action of local anesthetics on ion channels of excitable tissues. In: Strichartz G ed. *Local Anesthetics: Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 81. Springer-Verlag, Berlin, 1987;21-53.

72. Suzuki R, Arai YC, Hamayasu K, Fujita K, Hara K, Yamaguchi T, Sasaguri S. Complex of branched cyclodextrin and lidocaine prolonged the duration of peripheral nerve block. *J Anesth.* 2009;23(2):295-7.
73. Tasi WC, Petersen-Jones SM, Huang PY, Lin CT. The neuroprotective effects of lidocaine and methylprednisolone in a rat model of retinal ischemia-reperfusion injury. *J Vet Med Sci.* 2012;74(3):307-13.
74. Tofoli GR, Cereda CM, de Araujo DR, Brito RB Jr, Pedrazzoli J Jr, Meurer E, Barros FA et al. Pharmacokinetic and local toxicity studies of liposome-encapsulated and plain mepivacaine solutions in rats. *Drug Deliv* 2010;17(2): 68–76.
75. Umbrain V, Shi L, Lauwers MH, Smolders I, Michotte Y, Camu F. Intrathecal lidocaine elevates prostaglandin E2 levels in cerebrospinal fluid: a microdialysis study in freely moving rats. *Br J Anaesth.* 2008;101(5):716-22.
76. Venturini CG, Nicolini J, Machado C, Machado VG. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quim. Nova.* 2008; 31 (2): 360-368.
77. Verri WA Jr, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther.* 2006;112(1):116-38.
78. Wang HW, Wang LY, Jiang L, Tian SM, Zhong TD, Fang XM. Amide-linked local anesthetics induce apoptosis in human non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis.* 2016;8(10):2748-57.
79. Xing W, Chen DT, Pan JH, Chen YH, Yan Y, Li Q, Xue RF, Yuan YF, Zeng WA. Lidocaine Induces Apoptosis and Suppresses Tumor Growth in Human Hepatocellular Carcinoma Cells *In Vitro* and in a Xenograft Model *In Vivo*. *Anesthesiology.* 2017 Jan 25.

ANEXOS

ANEXO 1 - COMITÊ DE ÉTICA

Como já descrito, este Trabalho de Conclusão de Curso, fez parte de um projeto de auxílio pesquisa e de um projeto de Pós-doutorado intitulado “Estudo dos efeitos antitumorais da lidocaína livre e associadas a hidroxipropil- β -ciclodextrina em modelos *in vitro* e na indução do carcinoma de Walker 256 em ratos de Wistar” sob responsabilidade do orientador Dr. Luiz Eduardo Nunes Ferreira. Foram utilizados os mesmos animais para ambos os projetos, a partir da vinculação com uma das executaras do projeto de pesquisa.



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Estudo dos efeitos antitumorais da lidocaína livre e associadas a hidroxipropil- β -ciclodextrina em modelos in vitro e na indução do carcinoma de Walker 256 em ratos Wistar" (protocolo nº 3572-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Francsico Carlos Groppo / Luiz Eduardo Nunes Ferreira, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 11 de setembro de 2014.

Campinas, 11 de setembro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO 2 -TERMO DE RESPONSABILIDADE

TERMO DE RESPONSABILIDADE PARA PESQUISA COM USO DE ANIMAIS

1- Protocolo No. 3572-1

2- Título do projeto: Estudo dos efeitos antitumorais da lidocaina livre e associadas a hidroxipropil- β -ciclodextrina em modelos in vitro e na indução do carcinoma de Walker 256 em ratos Wistar.

2.1- Título do subprojeto: Efeito da lidocaina livre e complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre crescimento e resposta inflamatória induzida pelo tumor de Walker 256.

3. Período. Início: 01/08/2015

Término: 31/07/2016

4. Executores: Luiz Eduardo Nunes Ferreira

Nível acadêmico: Doutor

Nome do orientador: Francisco Carlos Groppo

Unidade/Departamento: Departamento de Ciências Fisiológicas/ Farmacologia Anestesiologia e Terapêutica – Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

4. Executores: Jéssica Pereira da Costa

Nível acadêmico: Graduação

Nome do orientador: Francisco Carlos Groppo

Unidade/Departamento: Departamento de Ciências Fisiológicas/ Farmacologia Anestesiologia e Terapêutica – Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Agência Financiadora: CNPq

Termo de Responsabilidade

Eu asseguro à CEUA/UNICAMP que:

10.1. Li os Princípios Éticos para Uso de Animais de Laboratório (disponível no endereço: <http://www.cobea.org.br/>), elaborado pela SBCAL - Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório - e concordo plenamente com suas exigências durante a vigência deste protocolo; assim como a legislação nacional vigente - Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008 (http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm).

10.2. Este estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe que participa deste projeto foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos nesse protocolo;

10.3. Comprometo-me a solicitar nova aprovação deste protocolo sempre que ocorra alteração significativa nos experimentos aqui descritos;

10.4. Tudo o que foi declarado nesse protocolo é a absoluta expressão da verdade. Estou ciente que o não cumprimento das condições aqui especificadas é de minha total responsabilidade (pesquisador principal) e que estarei sujeito às punições previstas na legislação em vigor.

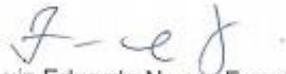
10.5. Estou de acordo com a divulgação na página do CONCEA do título do projeto, estágio em que se encontra o projeto na CEUA e o prazo de vigência do protocolo, conforme estabelecido na RESOLUÇÃO NORMATIVA N. 7, DE 13 DE SETEMBRO DE 2012, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (http://www.mct.gov.br/upd_blob/0229/229166.pdf).

10.6. Tudo que foi declarado neste protocolo está em acordo com a DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS e as DIRETRIZES PARA PRÁTICA DE EUTANÁSIA, PUBLICADAS PELO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA, DISPONÍVEIS EM: http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/311277/Publicacoes_do_CONCEA.html

Data: Piracicaba, 06 de maio de 2015

Nome do Orientador: Francisco Carlos Groppo

Assinatura:



Nome do Executor: Luiz Eduardo Nunes Ferreira

Assinatura:



Nome do Executor: Jéssica Pereira da Costa

Assinatura:

