



# REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Anestesiologia  
[www.sba.com.br](http://www.sba.com.br)



## ARTIGO CIENTÍFICO

# Efeitos citotóxicos de anestesia local com lidocaína/ropivacaína em linhagens celulares de melanoma humano



Ding-Kun Kang\*, Li-Yan Zhao e Hong-Li Wang

Luoyang Orthopedic – Traumatological Hospital, Department of Anesthesiology, Luoyang, China

Recebido em 22 de fevereiro de 2015; aceito em 15 de abril de 2015

Disponível na Internet em 14 de setembro de 2016

### PALAVRAS-CHAVE

Lidocaína;  
Ropivacaína;  
Citotoxicidade;  
Anestésicos locais do grupo amino-amida;  
Linhagens celulares de melanoma;  
Citometria de fluxo

### Resumo

**Justificativa:** Os anestésicos locais (ALs) são geralmente considerados como seguros, mas citotoxicidade foi relatada em vários anestésicos locais usados em seres humanos, a qual não é bem investigada. No presente estudo, a citotoxicidade de lidocaína e ropivacaína e da combinação de lidocaína e ropivacaína foi avaliada em linhagens celulares de melanoma humano. Melfalano, um agente alquilante de mostarda nitrogenada, foi usado como um agente de controle para a comparação da atividade citotóxica.

**Métodos:** Linhagens celulares de melanoma, A375 e Hs294T foram expostas por uma hora a concentrações diferentes dos agentes mencionados acima. A viabilidade celular após a exposição foi determinada por citometria de fluxo.

**Resultados:** Os ALs investigados mostraram citotoxicidade prejudicial nas linhagens celulares de melanoma estudadas dependente do tempo ( $p < 0,001$ ), da concentração ( $p < 0,001$ ) e do agente. Em ambas as linhagens de células A375 e Hs294T, níveis mínimos de viabilidade celular foram encontrados após 72 horas de exposição a esses agentes. Lidocaína a 2% provocou uma redução das células vitais para  $10\% \pm 2\%$  e  $14\% \pm 2\%$  em A375 e Hs294T, respectivamente, após 72 horas de exposição. Ropivacaína a 0,75% após 72 horas reduziu as células viáveis para  $15\% \pm 3\%$  e  $25\% \pm 3\%$ , em A375 e Hs294T, respectivamente. A viabilidade celular mínima após exposição de 72 horas para a combinação foi de  $10\% \pm 2\%$  e  $18\% \pm 2\%$  em A375 e Hs294T, respectivamente. A viabilidade celular mínima após exposição de 72 horas ao melfalano foi de  $8\% \pm 1\%$  e  $12 \pm 2$ , em A375 e Hs294T, respectivamente.

**Conclusão:** Os ALs têm atividade citotóxica em linhagens de celulares de melanoma humano de modo dependente do tempo, da concentração e do agente. A apoptose nas linhagens celulares foi mediada por meio da atividade das caspases-3 e caspases-8.

© 2016 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Autor para correspondência.

E-mail: [kangdingkun63@gmail.com](mailto:kangdingkun63@gmail.com) (D-K. Kang).

**KEYWORDS**

Lidocaine;  
Ropivacaine;  
Cytotoxicity;  
Aminoamide local  
anesthetics;  
Melanoma cell lines;  
Flow cytometry

**Cytotoxic effects of local anesthesia through lidocaine/ropivacaine on human melanoma cell lines****Abstract**

**Background:** Local anesthetics (LAs) are generally considered as safe, but cytotoxicity has been reported for several local anesthetics used in humans, which is not well investigated. In the present study, the cytotoxicity of lidocaine, ropivacaine and the combination of lidocaine and ropivacaine were evaluated on human melanoma cell lines. Melphalan, a nitrogen mustard alkylating agent, was used as a control agent for comparison of cytotoxic activity.

**Methods:** Melanoma cell lines, A375 and Hs294T, were exposed to 1 h to different concentrations of above agents. Cell-viability after exposure was determined by flow cytometry.

**Results:** Investigated LAs showed detrimental cytotoxicity on studied melanoma cell lines in time- ( $p < 0.001$ ), concentration- ( $p < 0.001$ ), and agent dependant. In both A375 and Hs294T cell lines, minimum cell viability rates were found after 72 h of exposure to these agents. Lidocaine 2% caused a reduction of vital cells to  $10\% \pm 2\%$  and  $14\% \pm 2\%$  in A375 and Hs294T, respectively after 72 h of exposure. Ropivacaine 0.75% after 72 h reduced viable cells to  $15\% \pm 3\%$  and  $25\% \pm 3\%$  in A375 and Hs294T, respectively. Minimum cell viability after 72 h exposure to the combination was  $10\% \pm 2\%$  and  $18\% \pm 2\%$  in A375 and Hs294T, respectively. Minimum cell viability after 72 h exposure to melphalan was  $8\% \pm 1\%$  and  $12\% \pm 2\%$ , in A375 and Hs294T, respectively. **Conclusion:** LAs have cytotoxic activity on human melanoma cell lines in a time-, concentration- and agent-dependant manner. Apoptosis in the cell lines was mediated through activity of caspases-3 and caspases-8.

© 2016 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Introdução**

Pouco se sabe sobre a quimioterapia e os anestésicos em geral. Em cenários perioperatórios e ambulatoriais, anestésicos locais são aplicados por via intra-articular.<sup>1</sup> Os anestésicos locais do tipo aminoamida exibem sua atividade principalmente ao bloquear a condução do impulso de axônios do nervo de modo reversível. Lidocaína e ropivacaína são anestésicos locais que pertencem à classe das aminoaminas. O primeiro exibe atividade antiarrítmica (classe-1b). Em geral, os anestésicos locais (ALs) previnem ou aliviam a dor por meio de ligação a receptores em sítios específicos dos canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ) nos nervos e bloqueiam a movimentação de íons através desses poros. As propriedades clínicas de um AL são determinadas tanto química quanto farmacologicamente.<sup>2</sup> Demonstrou-se que os ALs, incluindo lidocaína, aplicados topicamente forneceram um bom controle da dor em pacientes com câncer oral ou retal. Lidocaína e ropivacaína são administradas em concentrações de 1,5% ou 2% e 0,5% ou 0,75%, respectivamente, para anestesia cirúrgica, com cardiotoxicidade e toxicidade no SNC reduzidas.<sup>1,3,4</sup> Esses ALs são amplamente usados no controle da dor em pacientes com câncer de cabeça e pescoço para inibir metástase e recidiva de tumores e reduzir o estresse cirúrgico induzido pela atividade das células NK (*natural killer*). Contudo, estudos *in vitro* e em *in vivo* demonstraram citotoxicidade em várias células cultivadas.<sup>5,6</sup> Publicações anteriores relataram que a injeção de uma dose única de lidocaína a 1% pode ter atividade condrotóxica significativa. A citotoxicidade de lidocaína em células-tronco mesenquimais, em células orais e de tumores humanos e células endoteliais da córnea e fibroblastos do tendão do

manguito rotador foi relatada anteriormente.<sup>7-13</sup> Ropivacaína, um anestésico local aminoamida de ação prolongada, inibe o influxo de íons de sódio reversivelmente e, dessa forma, bloqueia a condução do impulso nas fibras nervosas. Relatou-se que ropivacaína demonstrou potencial reduzido de toxicidade cardíaca e no CNS e que é usada com mais frequência em anestesia local e no manejo das dores do parto e dor no pós-operatório. Além da atividade anestésica local, relatou-se também que ropivacaína inibiu a agregação plaquetária e a atividade antibacteriana em estudos *in vitro*. Também há relato da citotoxicidade de ropivacaína em linhagens de células mesenquimais a uma concentração de 0,5%. A neurotoxicidade dos anestésicos locais foi associada à apoptose.<sup>10,14-18</sup> Embora os anestésicos locais do tipo aminoamida sejam usados há muito tempo para várias complicações, não há informação adequada sobre a atividade citotóxica desses agentes, o que requer estudo detalhado. A atividade citotóxica dos ALs comumente usados em casos de melanoma ainda não foi amplamente estudada. A nossa hipótese foi que esses ALs aminoamidados regularmente usados têm efeitos citotóxicos em melanoma humano, a forma mais letal de câncer de pele, de forma específica para o agente, o tempo e a dose. Neste estudo, além de avaliar diferentes concentrações dos ALs mencionados acima, investigamos a combinação de ambos os compostos para avaliar o potencial citotóxico. O objetivo primário do estudo foi investigar se esses LAs comumente usados têm efeitos citotóxicos em linhagens de células de melanoma. Neste estudo, o efeito do pH dos ALs na morte celular de linhagens de células de melanoma também foi avaliado. O teste de atividade das caspases foi feito para confirmar se a morte celular foi causada por apoptose.

Melfalano, um agente mostarda alquilante nitrogenado, é um quimioterápico que atua por alquilação de guanina dos nucleotídeos de DNA. Relatou-se que melfalano é citotóxico em várias linhagens celulares, incluindo de melanoma, e, portanto, é usado como um agente padrão para avaliar o potencial citotóxico e como comparador.<sup>19,20</sup>

## Material e métodos

### Material

Lidocaína, ropivacaína e melfalano (137-58-6; 98717-15-8 e 148-82-3, respectivamente) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Alemanha. Todos esses medicamentos e reagentes não tinham conservantes e foram dissolvidos em solução salina tamponada (pH 7,0). Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi adquirido da Sigma (Sigma Chem. Ind., St. Louis, MO, EUA).

### Cultura celular

Células de melanoma maligno humano, linhagem A375, foram adquiridas do Instituto de Biologia Celular, Instituto Xangai de Ciências Biológicas, Academia China de Ciências, China. A linhagem celular foi cultivada em meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A linhagem celular foi suplementada com 4 mM de glutamina, o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina que impede a degradação e acúmulo de amônia em culturas tanto aderentes quanto de suspensão, e soro fetal bovino a 5% (Life Technologies). Células de melanoma humano, linhagem Hs294T, (Instituto de Biologia Celular, China) foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Lonza, Basel, Suíça) suplementado com 2 mM glutamina (Life Technologies) e soro fetal bovino a 5% (Life Technologies). A linhagem celular de fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF; Lonza) foi cultivada em meio de cultura MEM $\alpha$  (Lonza), suplementado com 2 mM de glutamina (Life Technologies) e soro fetal bovino a 10% (Life Technologies). As células foram cultivadas até a confluência e transferidas para placas de cultivo de 48 poços, 48 horas antes do tratamento experimental.

Todos os meios continham estreptomicina (0,1 mg.mL<sup>-1</sup>), penicilina (100 U.mL<sup>-1</sup>) e anfotericina B (0,25 g.mL<sup>-1</sup>) (Lonza). As células foram cultivadas a 37 °C em atmosfera úmida saturada com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade relativa.

### Análise de apoptose celular por citometria de fluxo

Lidocaína e ropivacaína formam o grupo de ALs aminoamidadas, mas diferem quanto à potência analgésica, início de ação e duração da anestesia. Durante uma hora, as células de melanoma foram expostas a 1 mL de soluções dos anestésicos locais com as seguintes concentrações: 0,03125%, 0,0625%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, 1% e 2% de lidocaína; 0,03125%, 0,0625%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, e 0,75% de ropivacaína; melfalano (0,2%) e 0,03125%, 0,0625%, 0,125%, 0,25%, 0,5% e 0,75% de uma combinação de lidocaína-ropivacaína. A concentração dos compostos testados variou de 0,03125% a 2%. As células controles foram tratadas com

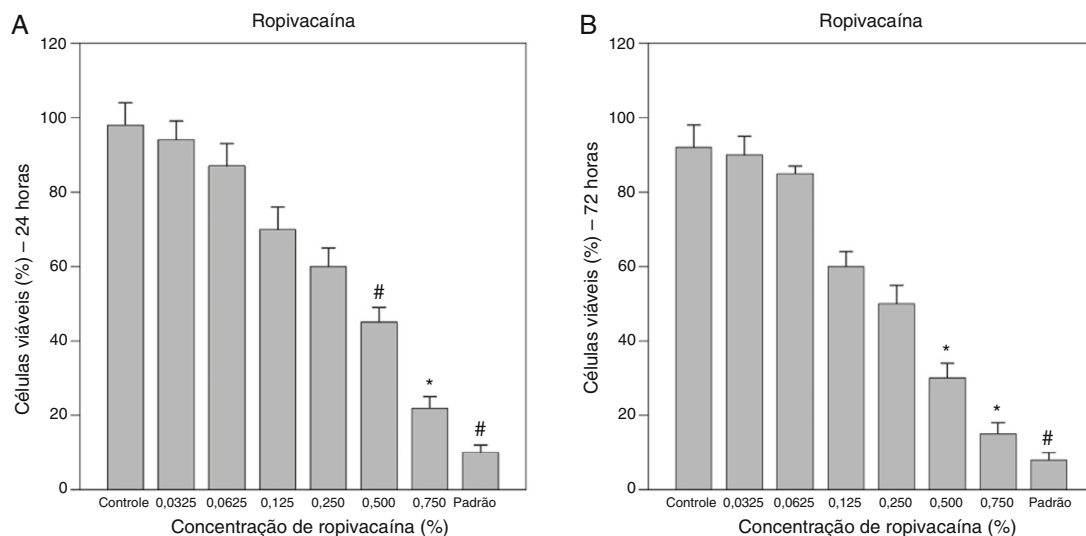
soro fisiológico normal durante uma hora. As soluções tratadas que continham células de melanoma não aderentes foram removidas e centrifugadas. Os sedimentos celulares formados foram lavados em solução salina tamponada e devolvidos aos respectivos poços com meio de cultura. Após 24 e 72 horas, a viabilidade celular foi determinada por citometria de fluxo. Para determinar a influência do pH sobre as linhagens de células de melanoma humano, as taxas de viabilidade foram analisadas 24 e 72 horas após uma hora de exposição à solução salina com pH de 7,4; 7; 6; 5 e 4. O seguinte procedimento geral foi usado para analisar a viabilidade das células de melanoma: as células A375 (1 × 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>) foram semeadas em placas de cultura, deixadas a aderir e colhidas após tratamento com ropivacaína e lidocaína e combinação de lidocaína-ropivacaína por 24 horas. As células controles incluíram células coradas e células não tratadas (isto é, não tratadas com veículo). Todo o processo foi feito em gelo. Em momentos individuais, o meio de cultura foi colhido, combinado com as células em suspensão e centrifugado durante 5 minutos a 1.200 rpm para assegurar a coleta de todo o material celular. Os sedimentos celulares foram suspensos em tampão de ligação (500  $\mu$ L 1 $\times$ ) a uma densidade de aproximadamente 1 × 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>. As amostras foram incubadas com coloração de Anexina v-FITC (1  $\mu$ L) e PI (5  $\mu$ L) por exatamente 5 min em temperatura ambiente no escuro e foram então transferidas para tubos FACS de 5 mL e em seguida a mensuração foi feita com um citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson, EUA). A fluorescência de PI e v-FITC foi detectada nos canais FL-1 (verde) e FL-2 (vermelho), respectivamente, após correção para a sobreposição espectral entre os dois canais. O programa CellQuest (Becton Dickinson, EUA) foi usado para a análise dos dados.<sup>1</sup>

### Ensaio das atividades das caspases-3/8

As atividades das caspases-3/8 foram analisadas em 12, 24 e 72 horas após a exposição aos anestésicos locais, com o uso de kits de ensaio colorimétrico (Keygen Co., China). As células (1 × 10<sup>6</sup> poço<sup>-1</sup>) foram semeadas em placas de seis poços e tratadas com diferentes concentrações de lidocaína, ropivacaína ou mistura de lidocaína e ropivacaína e melfalano por 12, 24 e 72 horas. A caspase-3 e a caspase-8 hidrolisam o substrato peptídico (Ac-DEVD-PNA e Ac-IETD-PNA, respectivamente), o que leva à liberação de p-nitroanilida (pNA). A concentração de pNA é calculada de acordo com a absorbância medida a um comprimento de onda de 405 nm e curva de calibração com base nas soluções-padrão de pNA. Todos os valores obtidos foram expressos em pNA.mg<sup>-1</sup> de proteína total. Além disso, todos os valores obtidos foram normalizados para a viabilidade das células controles.<sup>13</sup>

### Análise estatística

Cada experimento foi feito em triplicado e os dados representativos foram registrados. Anova simples foi usada para medir os valores médios das comparações estatísticas. A correlação das variáveis foi avaliada com análise de correlação bivariada. As diferenças com  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas e todos os valores- $p$



**Figura 1** Efeito de ropivacaína sobre a viabilidade das células A375 de melanoma. A curva dose-resposta da citotoxicidade de ropivacaína foi mensurada (A) 24 horas e (B) 72 horas após uma hora de exposição a citometria de fluxo. (A e B) Concentrações de ropivacaína a 0,50% e 0,75% causaram uma redução significativa da viabilidade celular em comparação com o controle (solução salina) e foram comparáveis com a do agente padrão (melfalano a 0,5%) após 24 e 72 horas. As barras representam os valores médios dos experimentos, com o erro padrão como barras de erro (\* $p < 0,05$ ; # $p < 0,01$ ).

foram determinados com testes bicaudais. A análise estatística foi feita com o programa SPSS 12.0.

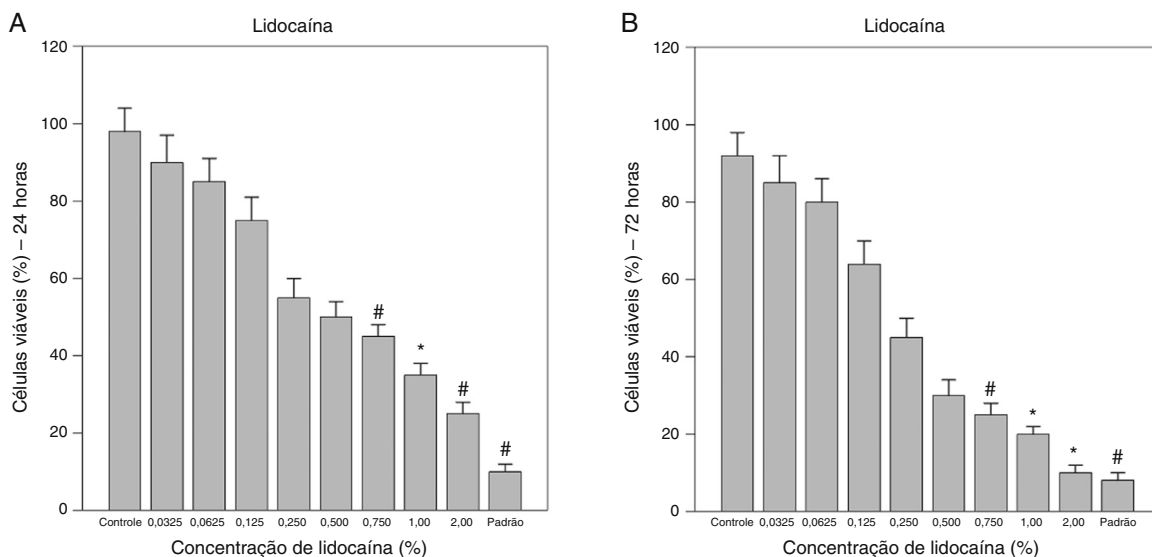
## Resultados

### Análise da viabilidade celular com o uso de citometria de fluxo

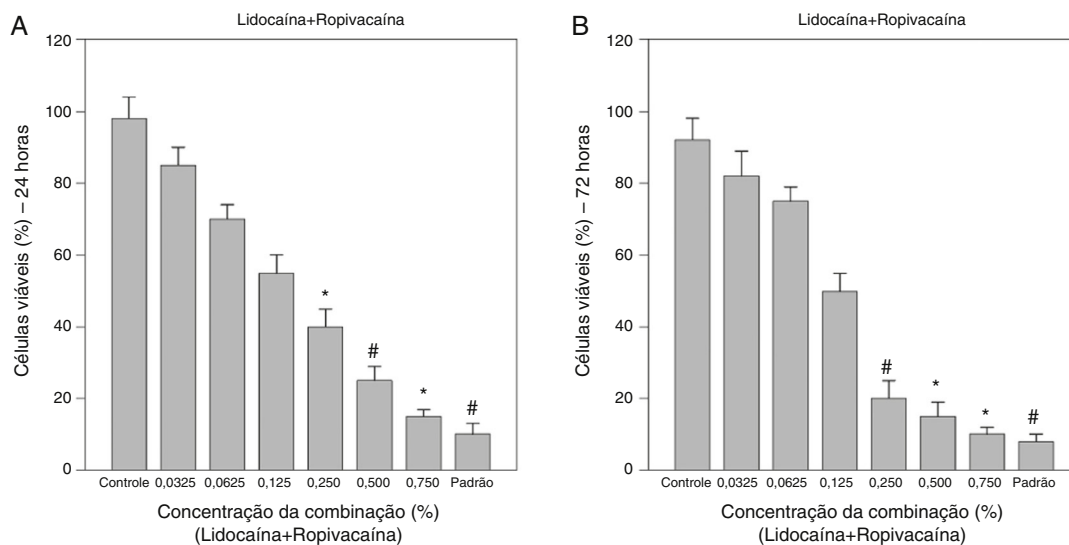
Neste estudo, lidocaína, ropivacaína e a combinação de lidocaína-ropivacaína apresentaram citotoxicidade

dependente da concentração, do tempo e do agente em células de melanoma humano (A375, Hs294T) e os resultados obtidos foram comparáveis aos do melfalano, um agente alquilante de mostarda nitrogenada, usado como agente-padrão para a comparação (figs. 1-6).

A exposição a concentrações elevadas de lidocaína e ropivacaína resultou em redução do número de células viáveis observáveis. O tratamento com uma combinação de lidocaína-ropivacaína a uma concentração de 0,25% e superior causou um declínio significativo de células viáveis em ambas as linhagens celulares A375 e Hs294T. A fração



**Figura 2** Efeito de lidocaína sobre a viabilidade das células A375 de melanoma. Concentrações de lidocaína a 0,75% e superiores causaram reduções significativas da viabilidade celular em comparação com o controle (solução salina) e a citotoxicidade foi comparável com a do agente padrão (melfalano a 0,5%) após 24 e 72 horas. As barras representam os valores médios dos experimentos, com o erro padrão como barras de erro (\* $p < 0,05$ ; # $p < 0,01$ ; controle, solução salina; padrão, melfalano a 0,5%).

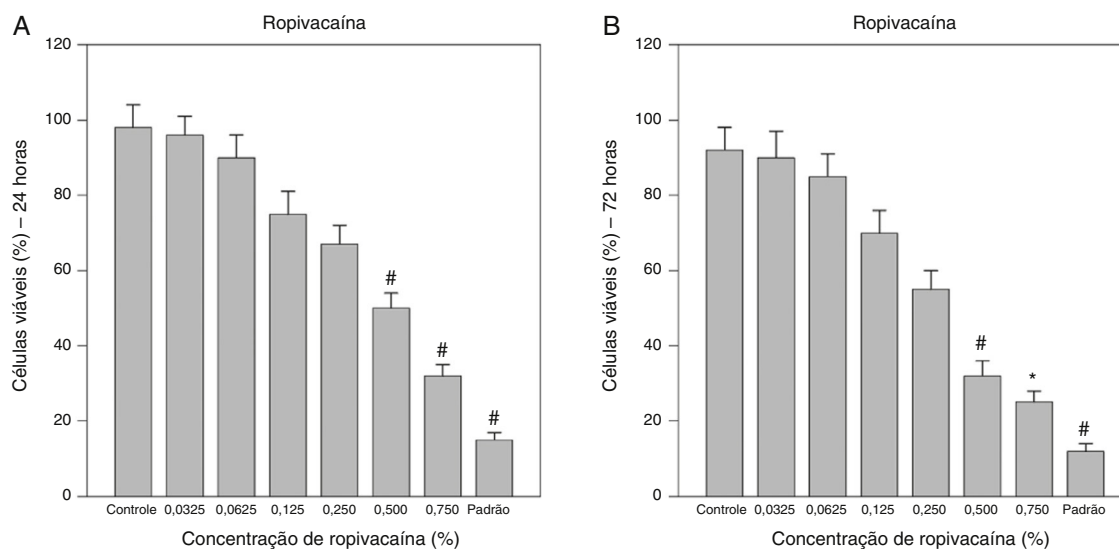


**Figura 3** Efeito da combinação de lidocaína-ropivacaína sobre a viabilidade das células A375 de melanoma. As taxas de viabilidade foram significativamente menores na combinação de concentrações de lidocaína e ropivacaína superiores a 0,25% e acima de 24 e 72 horas após o tratamento. As barras representam os valores médios dos experimentos, com o erro padrão como barras de erro (\* $p < 0,05$ ; # $p < 0,01$ ; controle, solução salina; padrão, melfalano a 0,5%).

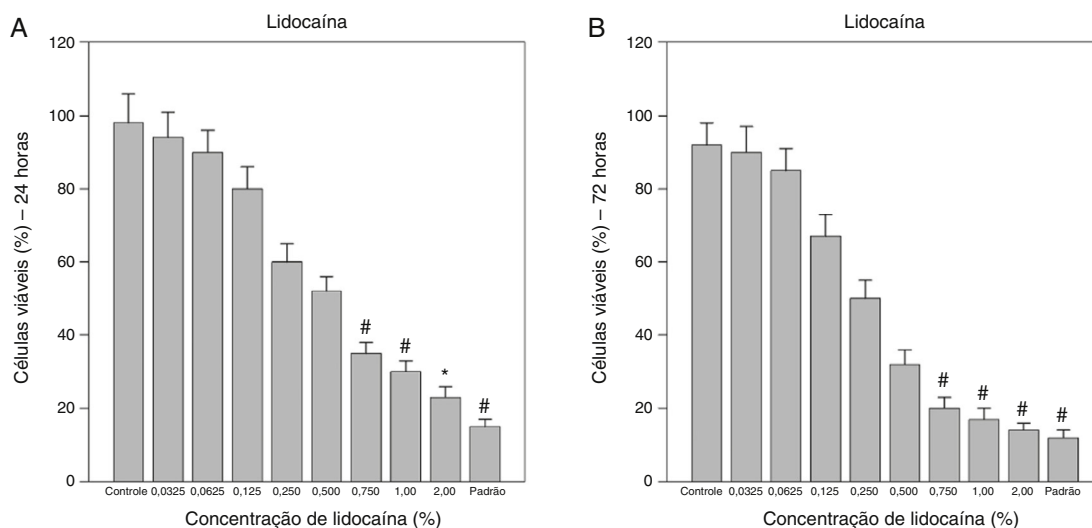
de células apoptóticas e necróticas aumentou. Viabilidade mínima das células foi observada a uma concentração de 0,75% e as taxas de viabilidade a essa concentração foram de  $15\% \pm 2\%$  ( $p < 0,005$ ) após 24 horas e de  $10\% \pm 2\%$  ( $p < 0,005$ ) após 72 horas, respectivamente (figs. 3A e 3B). Na linhagem de células A375, as concentrações de ropivacaína a 0,50% e superiores causaram diminuições significativas da viabilidade e aumentaram a apoptose e a necrose, em comparação com a solução salina (controle) em todos os momentos de avaliação do estudo (figs. 1A e 1B).

A citotoxicidade de ropivacaína aumentou de modo dependente da concentração. Ropivacaína a 0,75% causou uma redução da viabilidade celular para  $22\% \pm 3\%$  ( $p < 0,005$ ) após 24 horas e para  $15\% \pm 3\%$  ( $p < 0,005$ ) após 72 horas, respectivamente.

O tratamento com diferentes concentrações de lidocaína também causou declínio da viabilidade celular da linhagem A375 de forma dependente da dose (fig. 2A e 2B). Lidocaína a 0,75% e superior causou redução de células vitais da linhagem A375 e as viabilidades mínimas das células foram



**Figura 4** Efeitos de ropivacaína sobre a viabilidade das células Hs294T de melanoma. A curva de dose-resposta da citotoxicidade de ropivacaína foi mensurada 24 horas (A) e 72 horas (B) após exposição de uma hora, com citometria de fluxo. As concentrações de ropivacaína a 0,50% e 0,75% causaram reduções significativas da viabilidade celular em comparação com o controle (solução salina) e foram comparáveis com as do padrão (melfalano a 0,5%) após 24 e 96 horas. As análises da viabilidade não apresentaram diferenças relevantes para as concentrações mais baixas. As barras representam os valores médios dos experimentos, com o erro padrão como barras de erro (\* $p < 0,05$ ; # $p < 0,01$ ).



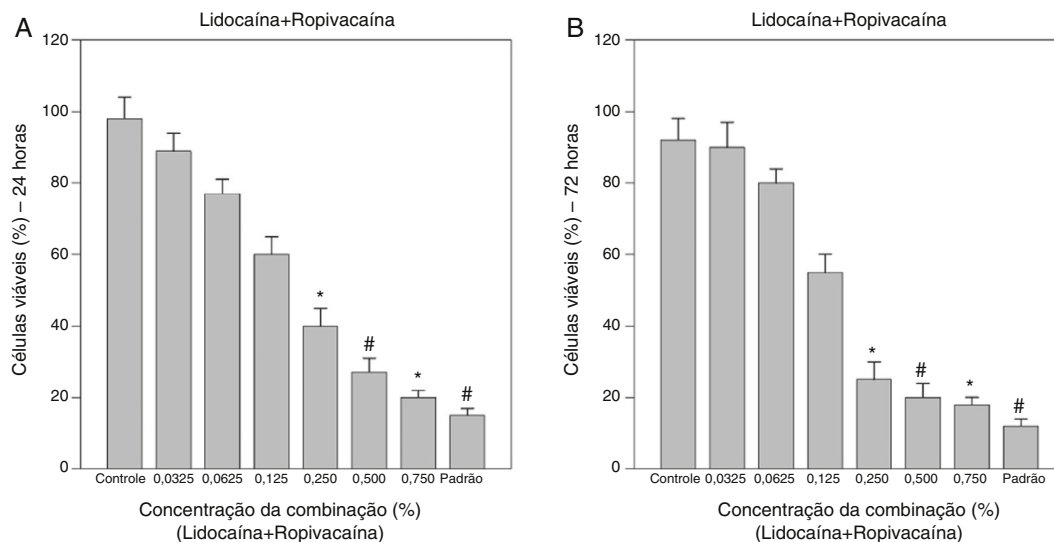
**Figura 5** Efeitos da lidocaína sobre a viabilidade de células Hs294T de melanoma. O tratamento com concentrações de lidocaína a 0,75% e superiores reduziu de modo significativo a viabilidade após 24 e 72 horas. As barras representam os valores médios dos experimentos, com o erro padrão como barras de erro ( $p < 0,05$ ;  $\#p < 0,01$ ; controle, solução salina; padrão, melfalano a 0,5%).

de  $25 \pm 2\%$  ( $p < 0,001$ ) e de  $10 \pm 2\%$  ( $p < 0,005$ ) após 24 e 72 horas, respectivamente. Melfalano foi usado como agente padrão e causou uma redução de células vitais para  $10 \pm 2\%$  ( $p < 0,001$ ) e  $8 \pm 1\%$  ( $p < 0,001$ ) após 24 e 72 horas, respectivamente.

Resultados semelhantes foram obtidos em linhagens celulares de melanoma Hs294T e confirmaram adicionalmente o efeito citotóxico desses agentes em linhagens celulares de melanoma (figs. 4-6). Neste estudo, a linhagem celular A375 foi mais sensível aos anestésicos locais em comparação com a linhagem celular Hs294T. Na linhagem celular Hs294T, a exposição com a combinação de lidocaína-ropivacaína a 0,25% ou superior causou citotoxicidade e as

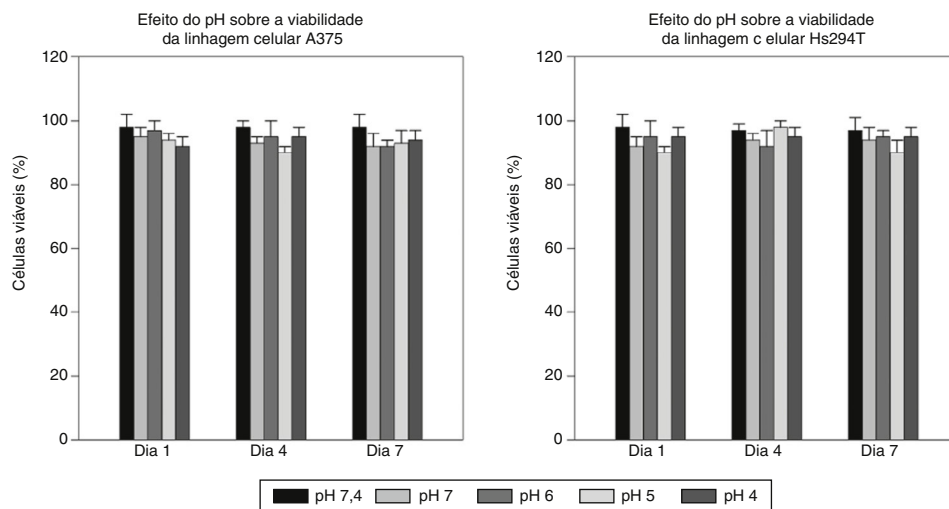
taxas de viabilidade mínima foram de  $20 \pm 2\%$  ( $p < 0,005$ ) e de  $18 \pm 2\%$  ( $p < 0,005$ ) após 72 horas, respectivamente (figs. 6A e 6B). O tratamento com concentrações crescentes de lidocaína também demonstrou declínio da viabilidade de linhagens celulares Hs294T, de forma dependente da dose. Lidocaína a 0,75% e superior causou uma redução de células vitais da linhagem A375 e as taxas de viabilidade mínima foram de  $23 \pm 5\%$  ( $p < 0,005$ ) e de  $14 \pm 2\%$  ( $p < 0,001$ ) após 24 e 72 horas, respectivamente (figs. 5A e 5B).

A exposição ao aumento da concentração de ropivacaína também causou queda da viabilidade celular da linhagem Hs294T. O tratamento com uma concentração a 0,5% ou superior causou redução de células vitais da linhagem e as



**Figura 6** Efeitos da combinação de lidocaína+ropivacaína sobre a viabilidade de células Hs294T de melanoma. As taxas de viabilidade foram reduzidas de modo significativo na combinação de concentrações de lidocaína e ropivacaína superiores a 0,25% e superiores 24 e 72 horas após o tratamento. As barras representam os valores médios dos experimentos, com o erro padrão como barras de erro ( $p < 0,05$ ;  $\#p < 0,01$ ; controle, solução salina; padrão, melfalano a 0,5%).





**Figura 7** Efeitos do pH sobre a viabilidade celular de melanoma. As linhagens de células (A375 e Hs294T) não foram afetadas de forma significativa após uma de exposição a soluções salinas com pH de 7,4; 7; 6; 5 e 4 após 1, 4 e 7 dias, com citometria de fluxo. As proporções de células viáveis são expressas em porcentagem do número total de células nos diferentes grupos de tratamento. As barras representam o erro padrão como barras de erro.

taxas de viabilidade mínima foram de  $32\% \pm 3\%$  ( $p < 0,001$ ) e de  $25\% \pm 3\%$  ( $p < 0,005$ ) após 24 e 72 horas, respectivamente (fig. 4 A e 4 B). Melfalano, agente citotóxico padrão, a uma concentração de 0,2% provocou uma redução de células vitais para  $15\% \pm 2\%$  ( $p < 0,001$ ) e para  $12\% \pm 2\%$  ( $p < 0,001$ ) após 24 e 72 horas, respectivamente.

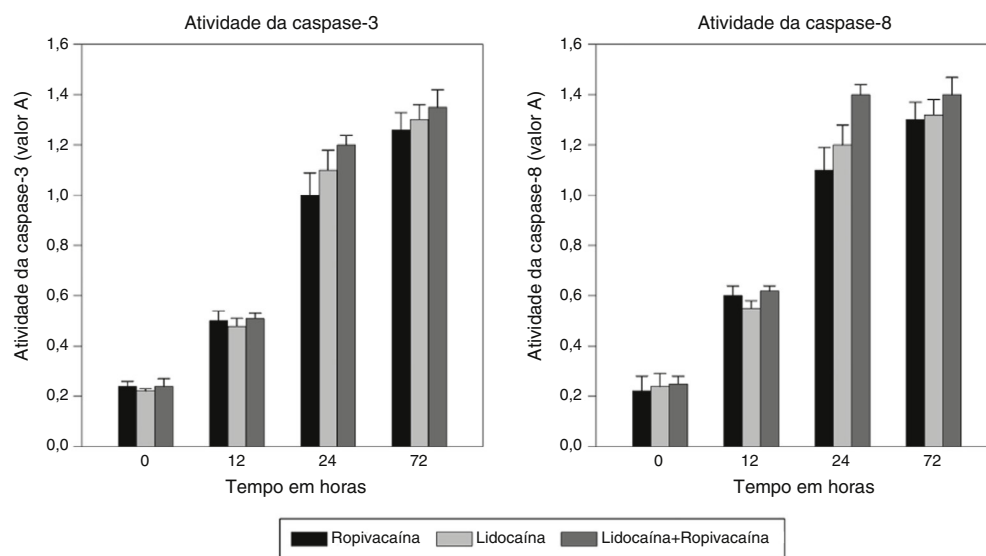
### Efeito do pH sobre a citotoxicidade

A acidez dos anestésicos locais pode ser uma das causas do efeito citotóxico. Para essa avaliação, as mesmas linhagens celulares foram tratadas com solução salina com pH que variou entre 4 e 7,4. A viabilidade das linhagens celulares de melanoma (A375 e Hs294T) não foi afetada de forma significativa após uma hora de exposição a soluções salinas

com pH de 4; 5; 6; 7 e 7,4 após um, quatro e sete dias com o uso de citometria de fluxo. As proporções de viabilidade das células são mostradas como porcentagem do número total de células em diferentes grupos de tratamento (figs. 7 A e 7 B).

### Análise da atividade das caspases-3/8

A apoptose é mediada por uma cascata de caspases ou proteases específicas de aspartato de cisteína. Lidocaína, ropivacaína e a combinação de lidocaína-ropivacaína aumentaram de forma significativa a expressão das caspases 3 e 8 ativadas de modo dependente do tempo na linhagem celular A375 (figs. 8 A e 8 B). Níveis de pico foram obtidos em todos os anestésicos locais imediatamente após



**Figura 8** Efeitos de ropivacaína a 0,75%, lidocaína a 1% e da combinação de ropivacaína+lidocaína a 0,75% sobre as atividades da caspase-3 e caspase-8.

12 horas. Em seus picos, todos os agentes apresentaram níveis significativos maiores de geração de caspase em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,004$ ).

## Discussão

Os resultados do estudo sustentam a hipótese de que os anestésicos locais aminoamida avaliados têm efeito citotóxico sobre as linhagens celulares de melanoma humano. Os anestésicos locais têm sido usados em anestesia dérmica, raquianestesia, anestesia tópica e para aliviar a dor em pacientes com câncer. Lidocaína e ropivacaína são usadas clinicamente em concentração de 1,5% ou 2% e 0,5% ou 0,75%, respectivamente, para anestesia cirúrgica.<sup>1,3</sup> Relatou-se também que ropivacaína é menos cardiotoxicidade e menos tóxica ao nervoso central do que lidocaína e outros anestésicos locais comumente usados. De acordo com um estudo farmacodinâmico de anestésicos locais, ropivacaína tem um tempo de ação mais prolongado e potência mais elevada, em comparação com lidocaína. Além disso, ropivacaína tem uma taxa maior de recuperação de parada cardíaca que do lidocaína.<sup>21</sup> Contudo, relatou-se que lidocaína e ropivacaína têm atividade citotóxica.<sup>22</sup> Estudos também relataram efeitos citotóxicos desses anestésicos locais de forma dependente da dose e do tempo sobre diferentes tipos de câncer.<sup>23-25</sup> Porém, são poucos os estudos que avaliaram o efeito de lidocaína e ropivacaína, anestésicos locais comumente usados, em linhagens celulares de melanoma humano e isso nos impulsionou a conduzir o presente estudo. Além disso, a avaliação da combinação de dois anestésicos locais também foi feita para investigar a ação citotóxica sinérgica sobre as linhagens celulares de melanoma humano. A combinação da mesma classe de anestésicos locais, isto é, aminoamida, foi desprovida de quaisquer problemas compatíveis e verificou-se ter atividade sinérgica e o efeito citotóxico da combinação foi comparável ao de melfalano. No entanto, no presente estudo, ropivacaína demonstrou atividade citotóxica quando comparada com soro fisiológico normal em qualquer concentração, mas foi menos citotóxica quando comparada com lidocaína, a combinação e melfalano.

Vários estudos mostraram efeitos citotóxicos de diferentes concentrações de anestésicos locais após tempos de exposição e de avaliação diferentes.<sup>7-13</sup> Em comparação com um cenário experimental idêntico em linhagens celulares de câncer, as linhagens celulares de melanoma humano foram mais sensíveis aos anestésicos locais e causaram mais morte celular após tratamento com concentrações iguais de anestésicos locais para os mesmos tempos de exposição e de avaliação. Após a exposição aos anestésicos locais, a morte celular imediata pode ter sido causada por necrose, enquanto a viabilidade das células diminuiu de forma dependente do tempo ao longo de várias horas. Estudos publicados mostraram que a permeabilidade e citotoxicidade da membrana foram máximas quando a lipofilicidade, determinada pelo coeficiente de partição octanol-água ( $\log p$ ), ficou próximo de 3.<sup>26,27</sup> Esse achado foi adicionalmente sustentado por nosso trabalho no qual ropivacaína ( $\log p = 2,91$ ) e lidocaína ( $\log p = 2,56$ ) mostraram efeitos citotóxicos em linhagens celulares de melanoma (A375 e Hs294T). Esse resultado sugere que a citotoxicidade dos anestésicos locais

está muito relacionada com a permeabilidade de suas membranas.

A acidez dos anestésicos locais pode ser uma das causas dos efeitos citotóxicos e para avaliá-la as mesmas linhagens celulares foram tratadas com soluções salinas com pH que variou entre 4 e 7,4. A avaliação da viabilidade não apresentou diferença em toda a variação de pH estudada e a atividade citotóxica devido à acidez dos anestésicos locais pôde ser excluída neste estudo (figs. 7 A e 7 B).

A atividade das caspases foi avaliada para diferenciar se apoptose ou necrose foi responsável pela atividade citotóxica.<sup>13</sup> As caspases desempenham um papel importante na apoptose (morte celular programada), necrose e inflamação. São amplamente classificadas pelo papel que desempenham na apoptose (caspases 3, 6, 7, 8 e 9 em mamíferos) e na inflamação (caspases 1, 4, 5 e 12 em seres humanos). Além disso, as caspases envolvidas na apoptose são classificadas com base no mecanismo de ação: caspases iniciadoras (caspases 8 e 9) e caspases executoras (caspases 3, 6 e 7). Em célula apoptótica, a caspase-3 é ativada por vias extrínseca (ligando de morte) e intrínseca (mitocondrial).<sup>28,29</sup> Neste estudo, a atividade tanto da caspase-3 quanto da caspase-8 foi aumentada, o que sugere o papel dessas caspases na regulação da apoptose (figs. 8 A e 8 B).

Neste estudo, o método foi desenhado para diminuir e medir aproximadamente possíveis danos celulares iatrogênicos com um cenário experimental em culturas de monocamada. A exposição a anestésicos locais pode prejudicar a aderência celular aos discos de cultura. Portanto, as células não aderentes do estudo foram lavadas e devolvidas. O instrumento mais comumente usado para medir a viabilidade celular é a citometria de fluxo e, portanto, esse foi o instrumento usado para estimar a viabilidade com precisão.<sup>4,25,30</sup>

Os anestésicos locais aminoamida que usamos neste estudo são amplamente usados para tratar irritação, dor e prurido e são injetados como um anestésico odontológico ou usados como anestésicos locais em cirurgia de pequeno porte.<sup>31,32</sup> Os anestésicos locais avaliados, incluindo a combinação de lidocaína-ropivacaína, foram mais citotóxicos em concentrações mais elevadas do que em concentrações menos elevadas. O estudo investigativo sugere que lidocaína, ropivacaína e combinação de lidocaína-ropivacaína podem ser adicionalmente investigadas para suas propriedades anticancerígenas para o tratamento de pacientes com melanoma, visto que os agentes quimioterápicos atualmente disponíveis têm efeitos secundários devastadores. Descobrimos que a combinação de lidocaína-ropivacaína, em particular, é tão citotóxica como a de melfalano, um agente alquilante de mostarda nitrogenada (10% vs. 8%, respectivamente;  $p < 0,01$ ). Os anestésicos locais estudados podem ser adicionalmente investigados em combinação com outros agentes anticancerígenos ou outros tipos de anestésicos locais de atividade sinérgica sobre o melanoma e outros cânceres. Por outro lado, com base nos resultados deste estudo, recomendamos o uso em baixas concentrações dos anestésicos locais menos citotóxicos comercialmente disponíveis, como bupivacaína, para o tratamento de doenças da pele e relacionadas ou o uso de concentrações desses anestésicos locais descobertas como menos citotóxicas.



## Conclusão

A atividade citotóxica dos anestésicos locais aminoamida investigados em linhagens celulares (A375 e Hs294T) de melanoma depende da concentração, do agente e do tempo de exposição. Dos anestésicos locais estudados, ropivacaína foi menos citotóxica em comparação com lidocaína e combinação de lidocaína-ropivacaína. A apoptose nas linhagens celulares foi mediada através da atividade da caspase-3 e caspase-8. A viabilidade celular não foi afetada pela acidez dos anestésicos locais estudados. Este estudo teve algumas limitações. Apenas duas linhagens celulares foram investigadas e o estudo foi *in vitro*. Embora o estudo dê uma ideia da atividade citotóxica desses agentes em cenários *in vitro*, para confirmar essa atividade ensaios clínicos em população humana são necessários.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Referências

- Breu A, Eckl S, Zink W, et al. Cytotoxicity of local anesthetics on human mesenchymal stem cells *in vitro*. *Arthroscopy*. 2013;29:1676–84.
- Kobayashi K, Ohno S, Uchida S, et al. Cytotoxicity and type of cell death induced by local anesthetics in human oral normal and tumor cells. *Anticancer Res*. 2012;32:2925–33.
- Sung CM, Hah YS, Kim JS, et al. Cytotoxic effects of ropivacaine, bupivacaine, and lidocaine on rotator cuff tenofibroblasts. *Am J Sports Med*. 2014;42:2888–96.
- Grishko V, Xu M, Wilson G, et al. Apoptosis and mitochondrial dysfunction in human chondrocytes following exposure to lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine. *J Bone Joint Surg Am*. 2010;92:609–18.
- Dregalla RC, Lyons NF, Reischling PD, et al. Amide-type local anesthetics and human mesenchymal stem cells: clinical implications for stem cell therapy. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3:365–74.
- Fedder C, Beck-Schimmer B, Aguirre J, et al. *In vitro* exposure of human fibroblasts to local anesthetics impairs cell growth. *Clin Exp Immunol*. 2010;162:280–8.
- 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;102:1103–7.
- Kim M, Lee YS, Mathews HL, et al. Induction of apoptotic cell death in a neuroblastoma cell line by dibucaine. *Exp Cell Res*. 1997;231:235–41.
- Unami A, Shinohara Y, Ichikawa T, et al. Biochemical and microarray analyses of bupivacaine-induced apoptosis. *J Toxicol Sci*. 2003;28:77–94.
- Perez-Castro R, Patel S, Garavito-Aguilar ZV, et al. Cytotoxicity of local anesthetics in human neuronal cells. *Anesth Analg*. 2009;108:997–1007.
- Lee HT, Xu H, Siegel CD, et al. Local anesthetics induce human renal cell apoptosis. *Am J Nephrol*. 2003;23:129–39.
- Nakamura K, Kido H, Morimoto Y, et al. Prilocaine induces apoptosis in osteoblastic cells. *Can J Anaesth*. 1999;46:476–82.
- Shen Q, Tian F, Jiang P, et al. EGCG enhances TRAIL-mediated apoptosis in human melanoma A375 cell line. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*. 2009;29:771–5.
- Ross BK, Coda B, Heath CH. Local anesthetic distribution in a spinal model: a possible mechanism of neurologic injury after continuous spinal anesthesia. *Reg Anesth*. 1992;17:69–77.
- Arai T, Hoka S. Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics. *J Anesth*. 2007;21:540–1.
- Kishimoto T, Bollen AW, Drasner K. Comparative spinal neurotoxicity of prilocaine and lidocaine. *Anesthesiology*. 2002;97:1250–3.
- Kamiya Y, Ohta K, Kaneko Y. Lidocaine-induced apoptosis and necrosis in U937 cells depending on its dosage. *Biomed Res*. 2005;26:231–9.
- Boselli E, Duflou F, Debon R, et al. The induction of apoptosis by local anesthetics: a comparison between lidocaine and ropivacaine. *Anesth Analg*. 2003;96:755–6.
- Bauer TW, Gutierrez M, Dudrick DJ, et al. A human melanoma xenograft in a nude rat responds to isolated limb perfusion with TNF plus melphalan. *Surgery*. 2003;133:420–8.
- Hansson J, Berhane K, Castro VM, et al. Sensitization of human melanoma cells to the cytotoxic effect of melphalan by the glutathione transferase inhibitor ethacrynic acid. *Cancer Res*. 1991;51:94–8.
- Ali QE, Manjunatha L, Amir SH, et al. Efficacy of clonidine as an adjuvant to ropivacaine in supraclavicular brachial plexus block: a prospective study. *Indian J Anaesth*. 2014;58:709–13.
- Chlebowski RT, Block JB, Cundiff D, et al. Doxorubicin cytotoxicity enhanced by local anesthetics in a human melanoma cell line. *Cancer Treat Rep*. 1982;66:121–5.
- Lirk P, Berger R, Hollmann MW, et al. Lidocaine time- and dose-dependently demethylates deoxyribonucleic acid in breast cancer cell lines *in vitro*. *Br J Anaesth*. 2012;109:200–7.
- Malet A, Faure MO, Deletage N, et al. The comparative cytotoxic effects of different local anesthetics on a human neuroblastoma cell line. *Anesth Analg*. 2015;120:589–96.
- Karpie JC, Chu CR. Lidocaine exhibits dose- and time-dependent cytotoxic effects on bovine articular chondrocytes *in vitro*. *Am J Sports Med*. 2007;35:1621–7.
- Fujisawa S, Atsumi T, Kadoma Y, et al. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology*. 2002;177:39–54.
- Ishihara M, Yokote Y, Sakagami H. Quantitative structure-cytotoxicity relationship analysis of coumarin and its derivatives by semiempirical molecular orbital method. *Anticancer Res*. 2006;26:2883–6.
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5:a008656.
- Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999;6:99–104.
- Chu CR, Coyle CH, Chu CT, et al. *In vivo* effects of single intra-articular injection of 0.5% bupivacaine on articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 2010;92:599–608.
- Neafsey PJ. Patching pain with lidocaine: new uses for the lidocaine 5% patch. *Home Healthc Nurse*. 2004;22:562–4.
- Di Croce DE, Trinks PW, de La CC. Amide-type local anesthetics action on the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase from fast-twitch skeletal muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2014;387:873–81.