

GUSTAVO NOBORU CAVALLARI INOUE

**Modulação da circulação de células tumorais e de citocinas após anestesia do  
neuroeixo em um modelo experimental de câncer de próstata**

**São Paulo**

**2023**

GUSTAVO NOBORU CAVALLARI INOUE

**Modulação da circulação de células tumorais e de citocinas após anestesia do  
neuroeixo em um modelo experimental de câncer de próstata**

**Versão Corrigida**

(Resolucao CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versao original encontra-se  
disponivel na Biblioteca da FMUSP)

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências.

Programa de Urologia

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Thalita  
dos Reis Faria

**São Paulo**

**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Inoue, Gustavo Noboru Cavallari

Modulação da circulação de células tumorais e de citocinas após anestesia do neuroeixo em um modelo experimental de câncer de próstata / Gustavo Noboru Cavallari Inoue. -- São Paulo, 2023.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Urologia.

Orientadora: Sabrina Thalita dos Reis Faria.

Descritores: 1.Neoplasias de próstata 2.Anestesia geral 3.Anestesia por condução 4.Estresse fisiológico 5.Células matadoras naturais 6.Células neoplásicas circulantes 7.Citocinas

USP/FM/DBD-036/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: Inoue, Gustavo Noboru Cavallari

Título: Modulação da circulação de células tumorais e de citocinas após anestesia do neuroeixo em um modelo experimental de câncer de próstata

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.



## **Dedicatória**

A meus pais, Silvana e Eduardo, pelo amor incondicional, pelo suporte e por todas as oportunidades que me permitiram crescer em todos os aspectos da vida e conquistar mais do que imaginava conseguir.

A Gabriela, namorada, amiga e companheira, que com amor e simpatia me faz enxergar as melhores faces da vida.

## **Agradecimentos**

A Profa. Dra. Sabrina Thalita dos Reis Faria, que além de orientadora, é uma grande amiga. Com paciência e simpatia me apresentou o mundo científico ainda nos tempos de faculdade e a quem devo grande parte dos ensinamentos sobre pesquisa científica.

Ao Dr. Daniel Perin, tutor, exemplo e amigo de profissão, com quem pude contar desde o início da carreira na anestesiologia. Sua dedicação ao ensino e seu perfeccionismo são dignos de grande admiração e sempre me inspiraram a buscar a excelência nos diversos aspectos da vida.

A Profa. Dra. Katia Ramos Moreira Leite, pelo apoio acadêmico e pelos seus grandiosos exemplos de liderança e de cientificismo.

Ao Prof. Dr. Joaquim Edson Vieira, Professor Associado da Disciplina de Anestesiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por toda a ajuda na elaboração desta tese e, mais ainda, pelos seus ensinamentos profissionais, filosóficos e humanos.

Aos amigos do LIM 55:

Ruan, pela amizade e por todo auxílio que foi essencial para esse trabalho ser realizado,

Juliana, Nayara, Vanessa e Iran, por todo auxílio, suporte e companheirismo no desenvolvimento e na execução das metodologias aqui performadas.

A colega Priscilla, do LIM60, pelo apoio e ajuda nos protocolos referentes a citometria de fluxo.

Agradeço ainda ao suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), com o auxílio à pesquisa sob o número 2019/16459-9.

Por fim, agradeço com todo o meu respeito aos animais desse estudo, cujas vidas não se foram em vão e servirão ao propósito maior e mais nobre de beneficiar outras vidas.

"Vivendo, se aprende; mas o que se aprende, mais, é só a fazer outras maiores perguntas."

João Guimarães Rosa

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. *Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP. Parte IV (Vancouver)*. Elaborado por: Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento e Suely Campos Cardoso. 3a ed. São Paulo; 2016.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
<i>Summary</i>	
1. INTRODUÇÃO .....	19
1.1 Câncer de próstata - Generalidades .....	20
1.2 Prostatectomia radical .....	22
1.3 Anestesia: aspectos gerais e tipos de anestesia .....	23
1.3.1 Anestesia Geral .....	23
1.3.2 Anestesia Regional .....	26
1.4 Resposta neuroendócrina ao trauma cirúrgico e sua relação com a anestesia .....	29
1.5 Modelos experimentais em CaP .....	33
1.6 Justificativa .....	34
2. OBJETIVOS .....	37
3. MÉTODOS .....	39
3.1 Estudos <i>in vitro</i> .....	40
3.1.1 Linhagem celular .....	40
3.2 Estudos <i>in vivo</i> .....	40
3.2.1 Estabelecimento do modelo animal de câncer de próstata subcutâneo .....	40
3.2.2 Comparação das técnicas anestésicas nos animais .....	43
3.2.3 Anestesia geral, morfina e raquianestesia .....	45
3.2.4 Excisão tumoral .....	47
3.2.5 Coleta de sangue .....	47
3.2.6 Análise das células tumorais circulantes .....	48
3.2.7 Ensaio de células NK .....	49
3.2.8 Análise da quantidade de citocinas .....	50

3.2.9	Contagem de metástases tumorais .....	51
3.3	Análise estatística .....	52
4.	RESULTADOS .....	53
4.1	Estudos para acompanhamento do crescimento de tumores subcutâneos e metástases a distância .....	54
4.2	Comparação das técnicas anestésicas durante excisão dos tumores subcutâneos .....	58
4.2.1	Quantidade de células NK .....	58
4.2.2	Análise da quantidade de células tumorais circulantes .....	59
4.2.3	Ensaio Multiplex .....	62
4.2.3.1	Interleucina 6 .....	63
4.2.3.2	Fator de necrose tumoral $\alpha$ .....	64
4.2.3.3	Interleucina 4 .....	65
4.2.3.4	Interleucina 10 .....	66
4.2.3.5	Interferon $\gamma$ .....	67
4.2.3.6	Interleucina 2 .....	68
4.2.3.7	Interleucina 12 .....	69
5.	DISCUSSÃO .....	71
6.	CONCLUSÃO .....	79
7.	REFERÊNCIAS .....	81

## Lista de abreviaturas

AL - Anestésico Local

AJCC - *American Joint Committee on Cancer*

AUA - *American Urology Association*

CaP - Câncer de Próstata

CEUA - Comissão de Ética no uso de Animais

CF - Citometria de Fluxo

DP - Desvio Padrão

FMUSP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

IFN - Interferon

IL - Interleucina

ISUP - *International Society of Urological Pathology*

IVIS - *In Vivo Image System*

NK - *Natural Killer*

NOD/SCID - *Non obese diabetic / Severe Combined Immuno Deficiency*

N<sub>2</sub>O - Óxido Nitroso

PBS - *Phosphate buffered saline*

PMN - Palpável e Não Mensurável

PSA - *Prostate Specific Antigen*

STR - *Short Tandem Repeats*

FNT - Fator de Necrose Tumoral

## Lista de figuras

Figura 1 -	Escore de Gleason e classificação ISUP .....	21
Figura 2 -	Linha do tempo com os principais anestésicos inalatórios ...	24
Figura 3 -	Curso de tempo típico da resposta metabólica ao estresse	30
Figura 4 -	Resposta imunológica após o trauma cirúrgico .....	31
Figura 5 -	Posição da agulha para injeção das células PC-3M-luc-C6 no flanco direito dos camundongos e tumoração inicial logo após injeção .....	42
Figura 6 -	Animais colocados no equipamento IVIS após a injeção intraperitoneal de luciferina .....	43
Figura 7 -	Esquematização dos tratamentos dos animais e seu acompanhamento ao longo do estudo .....	44
Figura 8 -	Técnica utilizada para realização de raquianestesia nos camundongos .....	45
Figura 9 -	Camundongo submetido ao <i>tail-flick test</i> .....	46
Figura 10 -	Coleta terminal do sangue dos camundongos pela veia cava inferior .....	48
Figura 11 -	Evolução da bioluminescência tumoral ao longo das semanas .....	56
Figura 12 -	Imagem da lâmina de um dos tumores subcutâneos retirados dos camundongos após 4 semanas .....	57
Figura 13 -	Números de células NK no sangue dos animais medido por citometria de fluxo .....	58
Figura 14 -	Gráfico mostrando a quantidade média de células NK em cada grupo estudado .....	42
Figura 15 -	Números de células tumorais circulantes no sangue dos animais, medido por citometria de fluxo .....	60
Figura 16 -	Gráfico mostrando a quantidade de células tumorais circulantes em cada grupo estudado .....	61
Figura 17 -	Comparação das concentrações plasmáticas médias de IL-6 entre os grupos .....	63
Figura 18 -	Comparação das concentrações plasmáticas de FNT- $\alpha$ entre os grupos .....	64
Figura 19 -	Comparação das concentrações plasmáticas de IL-4 entre os grupos .....	65
Figura 20 -	Comparação das concentrações plasmáticas de IL-10 entre os grupos .....	66
Figura 21 -	Comparação das concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$ entre os grupos .....	67



Figura 22 - Comparação das concentrações plasmáticas de IL-2 entre os grupos .....	68
Figura 23 - Comparação das concentrações plasmáticas médias de IL-12 entre os grupos .....	69

## Lista de tabelas

Tabela 1 -	Peso em gramas, volumes tumorais em milímetros cúbicos e picos de radiância ( $\rho/s/cm^2/sr$ ) .....	55
Tabela 2 -	Média das quantidades de células NK mostradas na citometria de fluxo em cada grupo .....	58
Tabela 3 -	Média das quantidades de células tumorais circulantes no sangue dos camundongos mostradas na citometria de fluxo em cada grupo .....	60
Tabela 4 -	Concentração sérica das citocinas por grupo expressa em médias e medianas .....	62

## RESUMO

Inoue GNC. *Modulação da circulação de células tumorais e de citocinas após anestesia do neuroeixo em um modelo experimental de câncer de próstata* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

**Introdução:** Apesar de ser uma das opções de tratamento para o câncer de próstata (CaP) localizado, a prostatectomia radical pode causar danos e alterações homeostáticas nos pacientes. O insulto cirúrgico provoca mudanças neuro-humorais no organismo que alteram a produção de citocinas responsáveis pela ativação de células da imunidade inata, importantes na defesa contra células potencialmente metastáticas. Nesse contexto, a técnica anestésica pode ter um papel importante nas cirurgias oncológicas. A relação entre os diferentes tipos de anestesia e os desfechos oncológicos tem sido estudada em diferentes cânceres e a anestesia regional parece ser vantajosa em cirurgias oncológicas por apresentar um efeito protetor na resposta inflamatória sistêmica perioperatória. **Objetivos:** Comparar a disseminação de células cancerígenas na corrente sanguínea em diferentes grupos que receberam anestesia combinada (raquianestesia e anestesia geral) ou anestesia geral em um modelo *in vivo* de CaP após o ato cirúrgico para exérese de tumores subcutâneos, assim como analisar o padrão de expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias e a quantidade de células *Natural Killer* (NK) entre os grupos. **Métodos:** Utilizamos um modelo de tumor subcutâneo, em camundongos NOD/SCID, machos, com 11 semanas de idade, com a linhagem celular PC-3M transfectada com um gene produtor da enzima luciferase (PC-3M-luc-C6). O crescimento tumoral foi avaliado com o sistema de bioluminescência *in vivo* e com medições utilizando um paquímetro digital. Após o devido estabelecimento tumoral e antes de ocorrer migração das células cancerígenas, foram realizadas as intervenções. Os animais foram submetidos a cirurgias de excisão tumoral recebendo anestesia geral ou anestesia combinada (raquianestesia e anestesia geral). O grupo controle foi apenas anestesiado. Vinte e quatro horas após os procedimentos, amostras de sangue foram coletadas para análise e os animais foram eutanasiados. Posteriormente, foram retirados tecidos para análise histológica. **Resultados:** O modelo de tumor subcutâneo com as células da

linhagem PC-3M-luc-C6 mostrou-se eficaz para originar metástases a distância após 35 dias. As quantidades de células tumorais circulantes no sangue dos animais submetidos a anestesia combinada foram menores do que as quantidades encontradas no grupo que recebeu anestesia geral ( $p=0,015$ ). Observamos ainda que os níveis de interleucina 6 foram diferentes em todos os grupos, com um aumento considerável no grupo submetido a anestesia geral. **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que a combinação de anestesia raquidiana e geral pode reduzir a quantidade de células tumorais circulantes no sangue no período pós-operatório. Além disso, a alteração dos níveis séricos de interleucina 6 sugere que a anestesia combinada altera a resposta neuroendócrina ao trauma cirúrgico.

**Descritores:** Neoplasias de próstata; Anestesia geral; Anestesia por condução; Estresse fisiológico; Células matadoras naturais; Células neoplásicas circulantes; Citocinas

## SUMMARY

Inoue GNC. *Modulation of the circulation of tumor cells and cytokines after neuroaxis anesthesia in an experimental model of prostate cancer* [thesis]. São Paulo: 'Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo'; 2023.

**Introduction:** Despite being one of the treatment options for localized prostate cancer (PC), radical prostatectomy can cause damage and homeostatic changes in patients. The surgical insult causes neurohumoral alterations in the body that change the production of cytokines responsible for activating innate immunity cells that are important in the defense against potential metastatic cells. In this context, the anesthetic technique may play an important role in oncologic surgeries. The relationship between different types of anesthesia and oncological outcomes has been studied in different cancers, and regional anesthesia seems to be advantageous in oncological surgeries as it has a protective effect on the perioperative systemic inflammatory response. **Objectives:** To compare the spread of cancer cells in the bloodstream in different groups submitted to combined anesthesia (spinal anesthesia and general anesthesia) or general anesthesia using an *in vivo* model of PC after surgery for subcutaneous tumor removal, as well as to analyze the pattern of expression of pro and anti-inflammatory cytokines and the amount of Natural Killer (NK) cells between groups. **Methods:** We used a subcutaneous tumor model, in male NOD/SCID mice, aged 11 weeks, with the PC-3M cell line transfected with a luciferase producing gene (PC-3M-luc-C6). Tumor growth was assessed with an *in vivo* bioluminescence system and with digital caliper measurements. After proper tumor establishment and before tumors become metastatic, interventions were performed. Animals were submitted to tumor excision surgeries receiving general anesthesia only or combined anesthesia. The control group was only anesthetized. Twenty-four hours after the procedures, blood samples were collected for analysis and the animals were killed. Tissues were later removed for histological analysis. **Results:** Our subcutaneous tumor model with PC-3M-luc-C6 cells lineage was effective in causing distant metastases after 35 days. The number of circulating tumor cells in the blood of animals undergoing combined anesthesia were lower than the amounts found in the general anesthesia group ( $p=0.015$ ). We

also observed that interleukin 6 levels were different in all groups, with a considerable increase in the group undergoing general anesthesia. **Conclusions:** Our results suggest that the combination of spinal and general anesthesia can reduce the amount of tumor cells circulating in the blood in the postoperative period. Furthermore, the change in serum levels of interleukin 6 suggests that combined anesthesia alters the neuroendocrine response to surgical trauma.

**Descriptors:** Prostatic neoplasms; Anesthesia, general; Anesthesia, conduction; Stress, physiological; Killer cells, natural; Neoplastic cells, circulating; Cytokines



# **1. INTRODUÇÃO**



## 1.1 Câncer de próstata - Generalidades

O câncer de próstata (CaP) é o tumor não cutâneo mais comum em homens e é a segunda causa de óbitos por neoplasias no Brasil. Apesar de ser considerado um câncer de terceira idade, dado que no mundo aproximadamente 75% dos casos ocorrem em indivíduos com mais de 65 anos, estimam-se cerca de 65 mil casos novos para cada ano do triênio 2020-2022, apenas no Brasil <sup>1</sup>. Dados mundiais apontam mais de um milhão de casos novos de CaP por ano, equivalendo a cerca de 7% de todos os valores de cânceres considerados <sup>2</sup>. Aproximadamente 12% dos homens serão diagnosticados com CaP em algum momento durante a vida, sendo que em 77% desses diagnósticos o tumor será localizado, em 13% haverá disseminação para linfonodos regionais e em 6% estarão presentes metástases a distância. Embora a sobrevida global do câncer limitado a próstata atualmente seja próxima a 100% em 5 anos, quando a doença é metastática essa taxa cai para 30% <sup>3</sup>.

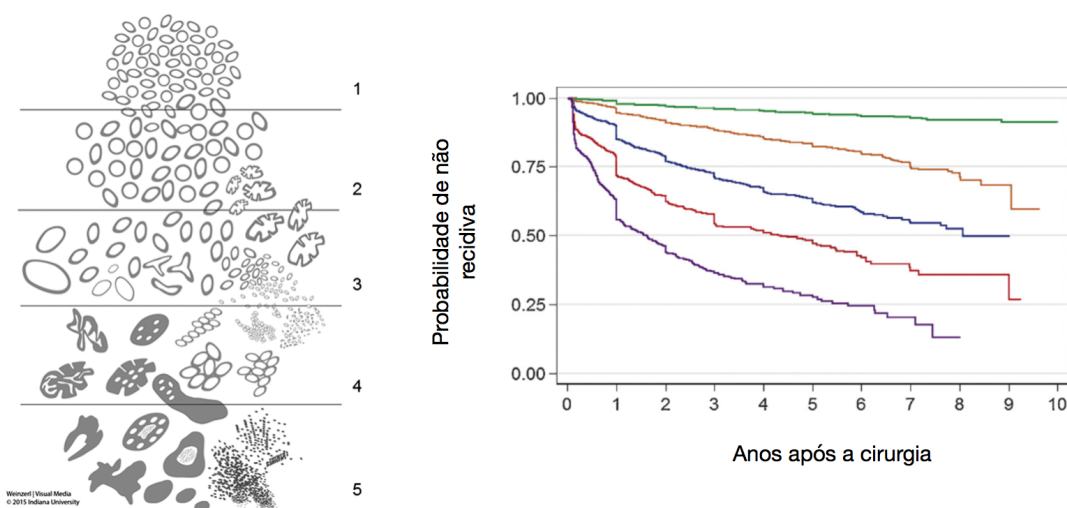
Após o tratamento local curativo, cerca de 30% dos homens sofrerão recidiva bioquímica. Em um período médio de 8 anos espera-se o surgimento de metástases e após a disseminação metastática a sobrevida média até a morte é de 5 anos <sup>4</sup>.

O surgimento do CaP depende da interação de vários eventos, dentre eles fatores genéticos ou familiares, hormonais, ambientais e alimentares. Os principais fatores não modificáveis são raça, idade, e ter parente de primeiro grau (pai ou irmão) com CaP antes dos 60 anos <sup>5</sup>. O único fator de risco modificável que apresenta evidências na literatura recente é a síndrome metabólica, estando associada principalmente a tumores clinicamente significantes e de alto grau <sup>6</sup>.

A avaliação clínica do paciente com suspeita de CaP inclui basicamente o exame sérico do antígeno prostático específico (PSA) e o toque retal. A partir disso, o diagnóstico é feito por meio da realização de biópsia por agulha, via transretal ou perineal e também em produtos de ressecção transuretral de próstata ou adenomectomias. O tipo histológico mais comum é o adenocarcinoma em 95% dos casos, sendo os outros 5% tumores mesenquimais ou uroteliais.

Após a biópsia o CaP é graduado conforme o escore de Gleason, que valoriza o padrão glandular e a relação entre glândulas e o estroma prostático. Nessa classificação, as células prostáticas são graduadas de 1 (lesões menos

diferenciadas) a 5 (lesões mais diferenciadas) a depender do seu padrão histológico e, no caso das biópsias, o escore final resulta da soma do padrão mais comum com o segundo mais comum. Além da escala de Gleason, mais recentemente a *International Society of Urothology* (ISUP) adicionou uma outra classificação, mais simples e mais realista com relação ao prognóstico dos pacientes (Figura 1) <sup>7, 8, 9</sup>. O prognóstico da doença vai depender dessas classificações e do estadiamento TNM da AJCC (*American Joint Committee on Cancer*), que leva em consideração aspectos histológicos, grau de invasão local e presença de metástases tumorais.



Grupo de risco	Classificação ISUP	Escore de Gleason
Muito baixo / Baixo	1	Até 6
Intermediário	2	7 (3+4)
	3	7 (4+3)
Alto / muito alto	4	8
	5	9 a 10

**Figura 1.** Escore de Gleason e classificação ISUP. Adaptado de Epstein J. I. E colaboradores <sup>7</sup>.

Existem diferentes tipos de tratamentos disponíveis para o CaP e as condutas devem ser analisadas individualmente, dado que os mesmos levam em consideração diversos fatores. Dentre eles, podemos citar: classificação da escala de Gleason, estadiamento do tumor, idade e expectativa de vida, comorbidades e preferências do paciente. Para indivíduos diagnosticados com CaP confinado à

próstata e com risco baixo ou intermediário, as opções de manejo incluem abordagens mais conservadoras como a vigilância ativa e intervenções mais invasivas como radioterapia, braquiterapia e procedimentos cirúrgicos como a prostatectomia radical.

Pacientes com CaP localmente avançado, que se estende difusamente através da cápsula prostática, são classificados como de alto risco de progressão ou recorrência da doença. Por isso, nesses casos, as tentativas de tratamento localizado são controversas <sup>10</sup>.

Linfonodos e ossos são os sítios mais comuns de metástase no CaP. Metástases pulmonares também são frequentes em autopsias e geralmente são assintomáticas. Além de linfonodos e ossos, podem ocorrer metástases para bexiga, fígado, adrenais e sistema nervoso central <sup>11</sup>.

## **1.2 Prostatectomia radical**

A prostatectomia radical foi descrita pela primeira vez em 1905 por Hugh Hampton Young como um dos tratamentos do CaP <sup>12</sup>. Inicialmente realizada com a técnica via perineal, foi apenas em 1947 que a abordagem retropúbica foi descrita por Millim <sup>13</sup>. Após mais de um século, avanços na técnica cirúrgica foram essenciais para diminuir a morbidade e as complicações associadas a esse procedimento. Como exemplos, pode-se citar a ligadura do plexo venoso dorsal, que diminuiu drasticamente a perda de sangue durante a cirurgia e o desenvolvimento do método de preservação do feixe neurovascular por Walsh e colaboradores <sup>14, 15</sup>, o qual reduziu a frequência de complicações como incontinência e impotência <sup>16</sup>.

O avanço da tecnologia tornou possível a existência de abordagens minimamente invasivas na cirurgia de próstata. Apesar de inicialmente apresentar longos tempos cirúrgicos e grandes períodos de internação, durante a década de 90 a técnica laparoscópica foi otimizada e tornou-se possível reproduzi-la em mais de um centro ao redor do mundo. No ano 2000 a primeira laparoscopia assistida por robô foi realizada. Com o uso de tecnologias que forneciam uma visão tridimensional e pinças laparoscópicas articuladas, mais avanços nos tempos intraoperatórios e intra-hospitalares foram atingidos. O surgimento da cirurgia robótica tornou ainda os movimentos laparoscópicos tecnicamente mais fáceis, encurtando as curvas de

aprendizagem e criando um amplo interesse de pacientes e de cirurgiões na prostatectomia minimamente invasiva <sup>17</sup>.

Além desses aspectos técnicos, o avanço dos equipamentos de monitorização perioperatória, dos medicamentos e dos tipos de anestesia também foram fundamentais para o estabelecimento da prostatectomia radical retropúbica como um dos principais tratamentos definitivos do CaP localizado. O século XX, sobretudo no período pós segunda guerra mundial, trouxe novas tecnologias que permitiram a queda da mortalidade relacionada a anestesia em pacientes saudáveis para níveis menores que 1:100.000 <sup>18</sup>. Nessas décadas, a ênfase no profissionalismo e no desenvolvimento da anestesiologia como especialidade médica estimularam ainda o surgimento de estudos que contribuíram definitivamente para o pleno estabelecimento das técnicas cirúrgicas.

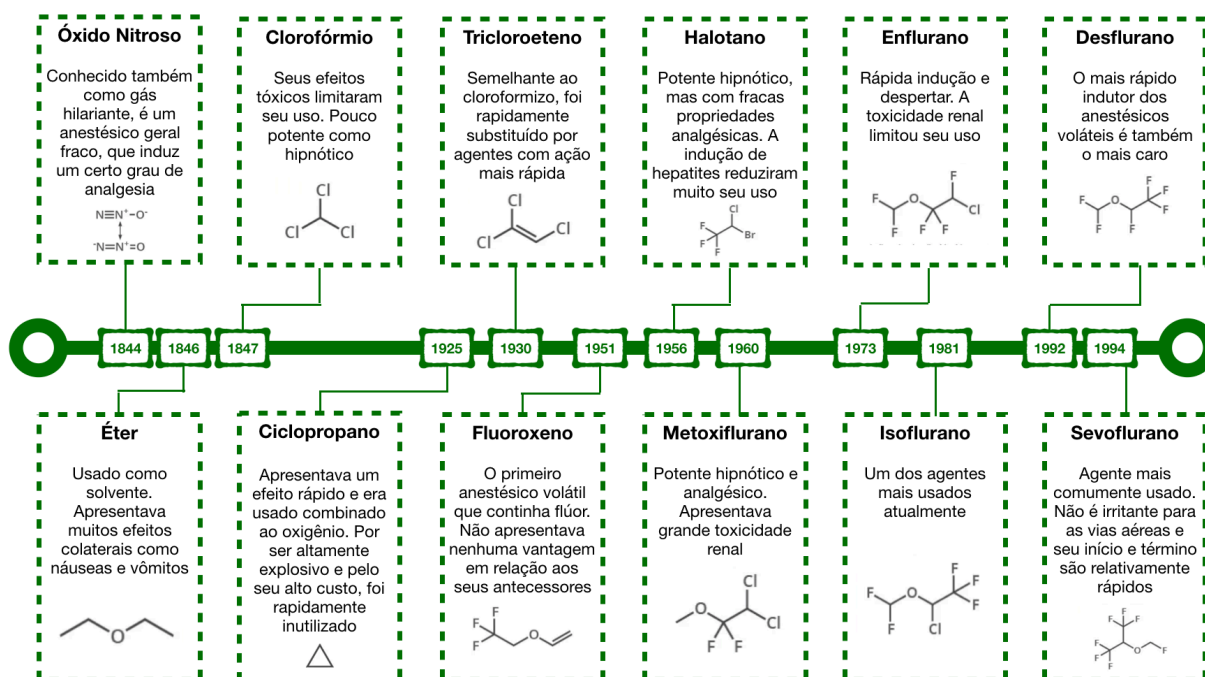
### **1.3 Anestesia: aspectos gerais e tipos de anestesia**

#### **1.3.1 Anestesia Geral**

Até o advento da anestesia, as operações eram rápidas e brutais. É possível encontrar evidências em civilizações antigas de tentativas de alívio para o desconforto causado por procedimentos invasivos, desde o uso do extrato de folhas de coca em feridas até a compressão na região das artérias carótidas (do grego, *karos* ou entorpecer) para que o indivíduo ficasse inconsciente <sup>19</sup>.

Apesar dessas práticas rudimentares existirem há milhares de anos, foi apenas durante o período denominado Iluminismo, na Europa, que métodos mais seguros e mensuráveis começaram a ser observados. Nessa época, mais precisamente final do século XVII e primeira metade do século XVIII, diferentes gases começaram a ser estudados. Dentre eles o óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) merece destaque, pois em 1799 foi o primeiro gás a ser descrito por provocar euforia e analgesia <sup>20</sup>. O N<sub>2</sub>O, no entanto, não era potente o suficiente para sozinho causar um efeito anestésico adequado. A indução e a manutenção de um estado de inconsciência com ausência de sensação de dor só foram concretizadas muitos anos depois com a demonstração da primeira anestesia com éter em 16 de outubro de 1846, no Hospital Geral de Massachusetts.

Desde então novos gases passaram a ser buscados e estudados (Figura 2). Além disso, com a criação da seringa hipodérmica de vidro e das agulhas para injeção no final do século XIX, a anestesia geral deixou de ser realizada apenas por meios inalatórios. Inicialmente, a falta de medicações adequadas tornou a anestesia geral endovenosa pouco praticada. Ao longo do século XX, no entanto, foram surgindo drogas importantes e com propriedades até hoje aproveitadas. Os barbitúricos marcaram o início da disseminação das técnicas endovenosas. Posteriormente, nos anos 60, Corssen e Domino realizaram estudos com a cetamina em humanos <sup>21</sup> e Godefroi e colaboradores descreveram pela primeira vez o etomidato <sup>22</sup>. Finalmente, em 1977, na Inglaterra, o propofol, o anestésico geral mais utilizado atualmente, foi produzido pela primeira vez pela antiga *Imperial Chemical Industries* <sup>23</sup>.



**Figura 2.** Linha do tempo com os principais anestésicos inalatórios. Adaptado de Miller RD. Miller's Anesthesia. 8th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier; 2015 <sup>24</sup>.

Ao longo desses séculos de novas descobertas farmacológicas outros empecilhos surgiram. Afinal, manter a inconsciência com ausência da sensibilidade dolorosa em uma época na qual ainda não se utilizavam técnicas anestésicas regionais não era uma tarefa trivial. O manejo das vias aéreas, inicialmente com o desenvolvimento de técnicas manuais simples até o estabelecimento da intubação orotraqueal e da ventilação com pressão positiva, foi essencial para o

desenvolvimento da anestesia geral, assim como a criação de métodos mais precisos de monitorização <sup>25</sup>.

Além dos gases e dos anestésicos gerais citados, com propriedades prioritariamente hipnóticas ou sedativas, outras drogas foram complementando o arsenal da anestesia geral ao longo do século XX e atualmente são amplamente utilizadas. Dentre elas, destacam-se os opióides e os bloqueadores neuromusculares.

Os derivados do ópio suprimem a dor tendo como alvo receptores no sistema nervoso, agindo no cérebro, na medula espinhal e nos nervos periféricos. Eles inibem a liberação de neurotransmissores dos neurônios sensoriais primários no corno dorsal da medula espinhal, mitigando a transferência de sensações dolorosas, modulam a transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal por meio de vias inibitórias descendentes e podem mudar a resposta afetiva à dor por meio de ações no prosencéfalo. Como o sistema nervoso influencia profundamente a função de todo o corpo, os opióides também afetam vários outros sistemas orgânicos, incluindo o respiratório e o cardiovascular, e podem causar uma variedade de efeitos adversos. Sua dosagem e o monitoramento adequados podem permitir que esses efeitos colaterais sejam minimizados <sup>26</sup>.

Os relaxantes musculares foram introduzidos na anestesia quase 100 anos após os anestésicos inalatórios, apesar de serem utilizados na caça por povos nativos da América do Sul há pelo menos 400 anos antes <sup>24</sup>. Após os primeiros usos clínicos, os bloqueadores neuromusculares foram integrados rapidamente à maioria das técnicas anestésicas para cirurgias de grande porte e se tornaram componentes importantes na prática anestésica. Seu uso permitiu que o relaxamento da musculatura esquelética fosse atingido sem a necessidade de altas doses de anestésicos gerais, que causavam excessiva depressão cardiovascular e não eram bem tolerados pela maioria dos pacientes. Foldes e colaboradores <sup>27</sup>, afirmaram: "... o primeiro uso dos relaxantes musculares não só revolucionou a prática da anestesia, mas também deu início à era moderna da cirurgia e tornou possível o desenvolvimento de cirurgias cardiorácicas, neurológicas e de transplante de órgãos." Atualmente, essas drogas são usadas de rotina para facilitar a intubação endotraqueal e a ventilação mecânica e são comumente utilizadas para manter o bloqueio neuromuscular durante diferentes procedimentos cirúrgicos.

O estado de "perda de sensações" obtido pela anestesia geral, portanto, pode ser atingido com uma combinação de diferentes classes de medicações. Com a evolução da técnica e de tecnologias que otimizaram sua aplicabilidade, efeitos colaterais potencialmente fatais dessas drogas como depressão cardiovascular e depressão respiratória ficaram contornáveis, tornando o ato anestésico mais seguro<sup>18</sup>.

### 1.3.2 Anestesia Regional

Os primeiros relatos escritos do uso de anestésicos locais (AL) são do século XVII. Manuscritos e cartas dessa época citavam que o consumo de folhas de coca pelos nativos americanos aliviava a fome e a sede e a primeira menção a seus efeitos anestésicos foi feita em um manuscrito de 1653 que relatou o alívio da dor de dente sentida por alguns colonos quando mascavam folhas de *Erythroxylum coca*<sup>28</sup>. Apesar disso, as folhas de coca já eram amplamente conhecidas pelas civilizações andinas antes da colonização europeia e pesquisas indicam que o uso dessa planta em humanos já ocorria há mais de 5000 anos na região do Equador<sup>28</sup>.

Com o isolamento do princípio ativo da cocaína, em 1860, pelo químico alemão Albert Niemann, seu uso na medicina começou a ser testado e no final do século XIX surgiram as primeiras recomendações para o uso dessa substância como anestésico em cirurgias<sup>28</sup>.

Pouco tempo depois, após ser estimulado por experiências prévias de Sigmund Freud, o oftalmologista vienense Carl Koller foi o primeiro médico a utilizar um AL em um procedimento cirúrgico. No dia 11 de setembro de 1884 o Dr. Koller realizou uma cirurgia em um paciente com glaucoma utilizando essa inovadora droga em Heidelberg, Alemanha<sup>28, 29</sup>.

A aplicabilidade dessa descoberta na anestesia regional começou rapidamente, apenas oito semanas após a conferência em Heidelberg, com alguns cirurgiões na cidade de Nova Iorque. Richard Hall e William Halsted começaram a conduzir experimentos enquanto realizavam operações na própria casa de Halsted. A primeira anestesia regional bem sucedida foi relatada no *New York Medical Journal* em 6 de dezembro de 1884<sup>29, 30</sup>. No artigo, Hall descreve que a injeção de 15 mg de cocaína no antebraço forneceu anestesia distalmente ao ponto da injeção. Posteriormente, eles injetaram 80 mg de cocaína próximo ao nervo ulnar no nível do

cotovelo e testemunharam um bloqueio de todo o território motor e sensitivo do nervo ulnar distalmente <sup>24</sup>.

Após a divulgação desses resultados, o uso da cocaína como AL se espalhou rapidamente pelo mundo. No entanto, seus efeitos tóxicos e seu risco de adição logo foram observados e no início do século XX iniciou-se uma busca por novos AL mais seguros e mais efetivos.

Outras técnicas de anestesia regional foram realizadas antes do final do século XIX, tanto com a aplicação de AL diretamente em mucosas como na injeção dessas drogas próximo ao trajeto de nervos periféricos. O bloqueio regional do neuroeixo surgiu entre 1895 e 1898 com experimentos separados realizados pelo neurologista Leonard Corning e por August Bier <sup>31, 32</sup>. O estabelecimento dessas técnicas, tanto da raquianestesia quanto da anestesia no espaço peridural, progrediu ao longo dos anos subsequentes. Cirurgiões em outros países começaram a realizar as técnicas regionais e tanto os sucessos quanto as complicações contribuíram para a otimização dos procedimentos que são realizados atualmente.

O bloqueio neuroaxial tem uma ampla gama de aplicações clínicas para cirurgia, obstetrícia, tratamento da dor aguda pós-operatória e alívio de dores crônicas. A anestesia espinhal ou peridural com injeção única de AL é mais comumente usada para cirurgias no abdome inferior, em órgãos pélvicos (por exemplo, próstata), em membros inferiores e para partos cesariana. Infusões epidurais contínuas são usadas para analgesia de parto e para alívio de dor pós-operatória após cirurgias de maior porte e podem ser utilizadas para analgesia por um período mais prolongado. Há evidências que o bloqueio do neuroeixo pode reduzir a morbimortalidade cardiovascular e pulmonar em pacientes de alto risco submetidos a cirurgias torácicas e abdominais de grande porte e isso serviu para impulsionar a prática da analgesia peridural no início dos anos 2000 <sup>33, 34</sup>. Mais recentemente, porém, o interesse na analgesia regional no neuroeixo foi direcionado para a facilitação da recuperação em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos hospitalares eletivos.

Os bloqueios neuroaxiais espinhais e peridurais resultam em uma combinação de bloqueio simpático, bloqueio sensorial e bloqueio motor, dependendo da dose, concentração e volume do AL administrado. Apesar dessas semelhanças, existem diferenças técnicas e fisiológicas implicadas nesses dois tipos de anestesia



regional. A raquianestesia requer uma pequena quantidade de droga que é quase desprovida de efeitos farmacológicos sistêmicos para produzir analgesia sensorial rápida (menos que 5 minutos) e profunda. Em contraste, a anestesia peridural progride mais lentamente (mais que 20 minutos) após o uso de uma grande quantidade de AL que produz níveis sanguíneos sistêmicos, que podem estar associados a efeitos colaterais e complicações inexistentes na raquianestesia. Em ambas as técnicas há um bloqueio do sistema simpático, mais generalizado na raquianestesia e mais localizado na anestesia peridural. Como consequência, efeitos colaterais resultantes da redução do tônus simpático são comuns, dentre eles: hipotensão devido à queda da resistência vascular periférica e do volume sistólico, bradicardia a depender do nível de bloqueio atingido (níveis espinhais T1 a T4) <sup>24, 35</sup>, redução do fluxo sanguíneo cerebral (em geral devido a hipotensão) e aumento do peristaltismo, que pode ocasionar náuseas e vômitos <sup>24, 36</sup>.

O bloqueio neuroaxial é indicado quando o procedimento cirúrgico pode ser realizado com um nível de anestesia espinal que não produz resultados adversos para o paciente. O nível de anestesia ou analgesia necessário é de primordial importância porque os efeitos fisiológicos de um bloqueio de nível alto podem ser deletérios. Em cirurgias nas quais os níveis sensoriais não são confortavelmente atingidos com técnicas regionais ou que requerem um controle adequado da ventilação (laparoscopias, por exemplo), a anestesia geral pode ser associada.

Além do benefício inquestionável no controle da dor pós-operatória, as técnicas de bloqueio do neuroeixo tendem a apresentar melhores desfechos nos mais diversos tipos de cirurgia. Meta-análises mostraram uma redução do risco relativo na mortalidade geral em pacientes que receberam bloqueio neuroaxial de até 30%, em pacientes submetidos a todos os tipos de cirurgia <sup>37</sup>, a 11%, em pacientes submetidos a cirurgia não cardíaca de risco intermediário a alto <sup>38</sup>. Para cirurgias cardíacas, a literatura mostra um risco reduzido de mortalidade e infarto do miocárdio, risco reduzido de insuficiência renal aguda, complicações pulmonares, arritmias supraventriculares e redução da duração da ventilação mecânica pós-operatória em pacientes que receberam anestesia geral intraoperatória combinada e anestesia peridural torácica <sup>39</sup>. Para cirurgias torácicas e abdominais de grande porte, a analgesia peridural torácica reduziu a mortalidade, complicações respiratórias e o consumo de opióides e reduziu o tempo para deambulação <sup>40, 41</sup>.

Mortalidade e morbidade à parte, existem outras vantagens do bloqueio neuroaxial. Para artroplastia total bilateral do joelho, a anestesia neuroaxial diminui a taxa de transfusão de sangue <sup>42</sup>. Em pacientes submetidos a grandes cirurgias vasculares e abdominais, a infusão de AL peridural torácica pode reverter o íleo paralítico pós-operatório associado à hiperatividade simpática induzida pela dor e por opióides sistêmicos <sup>43</sup>.

Em relação aos efeitos potenciais da anestesia neuroaxial na resposta ao estresse cirúrgico, no sistema imunológico e na recorrência do câncer, a anestesia neuroaxial pode ser benéfica em virtude de suas propriedades de preservação do uso de opióides e anestésicos gerais e de alívio do estresse cirúrgico. A imunidade celular inata é necessária para monitorar e erradicar o crescimento das células cancerosas. Células *natural killer* (NK) e linfócitos T citotóxicos, podem eliminar células tumorais através da via da perforina e da granzima ou através da secreção de citocinas (por exemplo, interferons) indutoras de apoptose. Além disso, as células T auxiliares controlam a angiogênese tumoral por meio de interleucinas, inibem a sinalização oncogênica e estimulam a destruição do tumor ao envolver macrófagos e granulócitos <sup>24</sup>. Existe uma relação inversa entre a atividade das células NK no momento da cirurgia e o desenvolvimento de doença metastática <sup>44</sup>. A disseminação sistêmica de células cancerosas pode ocorrer durante a dissecação e manipulação cirúrgica e, infelizmente, isso acontece em um momento de significativa imunossupressão. Os corticosteroides, hormônios do estresse liberados na corrente sanguínea após um trauma, bem como anestésicos voláteis inalatórios e opióides sistêmicos (morfina e fentanil, por exemplo), podem diminuir a função das células NK <sup>24, 44</sup>. Apesar das evidências ainda serem controversas e pouco consistentes, dados animadores indicam uma redução da recorrência do câncer associada ao uso de anestesia neuroaxial perioperatória em pacientes submetidos à prostatectomia retropúbica <sup>45, 46</sup> e ressecções de câncer retal <sup>47</sup> e de câncer ovariano <sup>48</sup>.

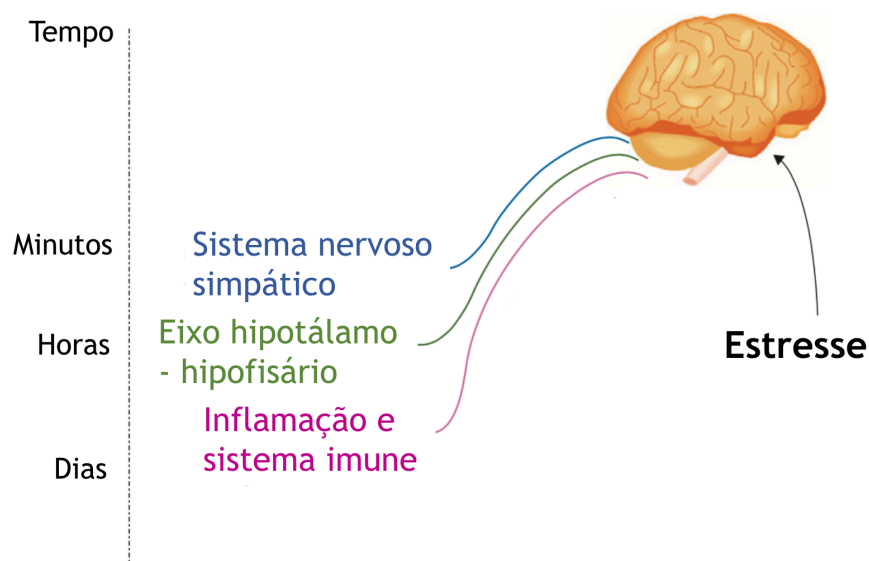
#### **1.4 Resposta neuroendócrina ao trauma cirúrgico e sua relação com a anestesia**

Traumas corporais significativos, cirúrgicos ou acidentais, provocam uma resposta inflamatória sistêmica previsível e temporária, causada por mediadores

hormonais, imunológicos e metabólicos. Esta resposta inflamatória é essencial para o reparo tecidual e em condições naturais serve para maximizar o potencial de cura do organismo. No entanto, quando a lesão tecidual é mais extensa, uma resposta pró-inflamatória exagerada pode sobrecarregar o sistema imune e aumentar o risco de infecções e complicações sépticas <sup>49</sup>.

A resposta metabólica ao estresse envolve um componente neuroendócrino e um componente inflamatório-imunológico. Inicialmente, quando um estímulo traumático é detectado e sinalizado para o sistema nervoso central, uma resposta é desencadeada, resultando na ativação do sistema nervoso simpático e do eixo hipotálamo-hipofisário e, posteriormente, do sistema imunológico. Muitos estressores diferentes podem ser detectados e transmitidos, por exemplo: uma lesão de tecido periférico induzida por um trauma que ativa os nervos aferentes, a hipoxemia ou a hipercapnia, que estimulam quimiorreceptores e a hipovolemia, que desencadeia uma resposta via barorreceptores vasculares <sup>50</sup>.

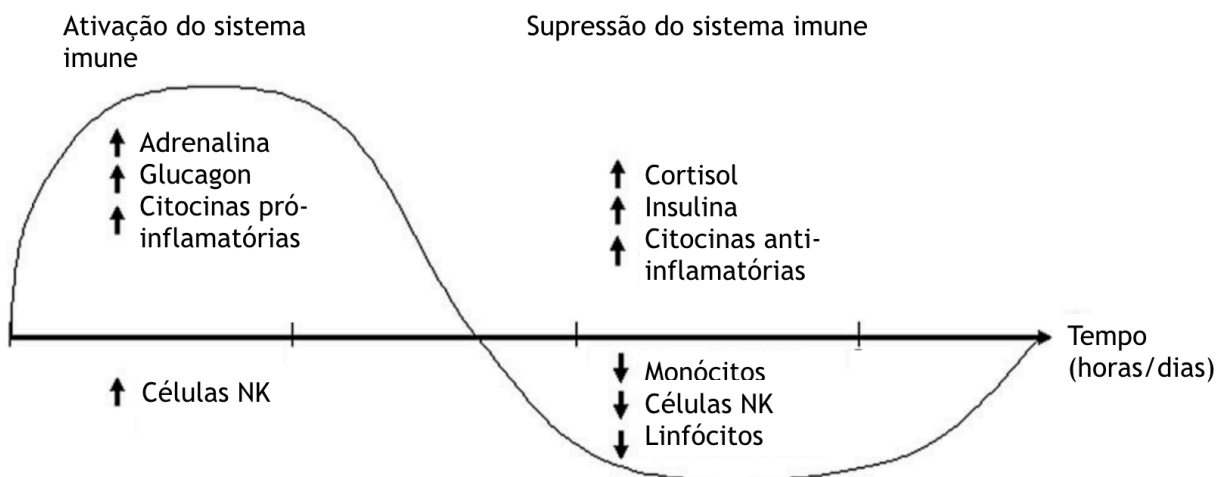
O sistema nervoso simpático é o primeiro a agir após um estímulo traumático por meio da liberação de epinefrina e norepinefrina no organismo quase que instantaneamente (Figura 3). A ativação do eixo hipotálamo-hipofisário resulta na liberação de hormônio adrenocorticotrófico, hormônio estimulador da tireoide, hormônio do crescimento e vasopressina. Devido a inativação periférica, os níveis circulantes de hormônios liberados nas glândulas periféricas em resposta a esses fatores hipofisários estão diminuídos, com a notável exceção do cortisol <sup>49, 50</sup>.



**Figura 3.** Curso de tempo típico da resposta metabólica ao estresse. Adaptado de Preiser J. C. e colaboradores <sup>50</sup>.

O componente inflamatório é parcialmente regulado pelo sistema nervoso central, por meio de citocinas e mediadores inflamatórios. A resposta imunológica compreende uma resposta imune inata e uma resposta específica, sendo esta última subdividida em celular e humoral, que inclui a liberação de anticorpos e de citocinas <sup>49</sup>.

A resposta imune é orquestrada de modo a auxiliar na cicatrização de feridas após o insulto cirúrgico e é composta de duas fases: uma fase pró-inflamatória aguda seguida por uma fase anti-inflamatória prolongada <sup>50, 51</sup> (Figura 4). Inicialmente, o dano tecidual no sítio cirúrgico leva à grande produção de citocinas pró-inflamatórias (interleucina [IL] -2, IL-6 e fator de necrose tumoral [FNT]  $\alpha$ , por exemplo), sendo que a liberação desses mediadores é diretamente proporcional ao insulto ao organismo <sup>52</sup>.



**Figura 4.** Resposta imunológica após o trauma cirúrgico. Adaptado de Toft P. e colaboradores <sup>49</sup>.

Dentre essas citocinas, a IL-6 ganha certa importância, pois é uma citocina dominante no período pós-operatório tanto no sangue periférico quanto no local do trauma cirúrgico <sup>51</sup>. A IL-6 ainda apresenta correlação, com a duração da cirurgia e com o risco de complicações pós-operatórias. Indiretamente essa molécula apresenta funções anti-inflamatórias ao estimular a liberação de citocinas que inibem o processo inflamatório, como a IL-10 <sup>49</sup>, e ao exercer uma retroalimentação negativa na produção de mais IL-6 e de FNT- $\alpha$  <sup>51</sup>. Sendo assim, a IL-6 torna-se importante também na transição da fase pró para a fase anti-inflamatória após o

trauma. Além disso, a produção concomitante de outras moléculas supressoras da inflamação, como a IL-4, contribui para o início da fase anti-inflamatória <sup>53</sup>.

Nesse segundo momento, após instituída a fase anti-inflamatória pós-operatória, a imunidade mediada por células não específicas (neutrófilos, monócitos e células NK) é suprimida <sup>49</sup>. Outras citocinas como IL-2, IL-12 e interferon (IFN)  $\gamma$ , produzidas em grande parte por células do sistema imune, também sofrem interferência no período perioperatório. Tais moléculas favorecem a imunidade celular e encontram-se reduzidas após o estresse cirúrgico <sup>44</sup>.

As células NK em particular fornecem uma defesa de primeira linha contra a disseminação de células com potencial metastático no sangue e uma redução na sua atividade pode, portanto, ser prejudicial nessas circunstâncias <sup>54, 55</sup>.

Durante os períodos intra e pós-operatório, algumas medicações são utilizadas tanto para manter o paciente anestesiado, quanto para prevenir ou minimizar desconfortos após a cirurgia. Apesar dessas drogas terem o intuito teórico de reduzir o estresse cirúrgico (controlando a dor e reduzindo a inflamação, por exemplo), algumas delas podem interferir no sistema imune <sup>44, 56</sup>. Os agentes inalatórios usados durante a anestesia geral suprimem as atividades das células NK tanto *in vitro* quanto *in vivo* <sup>57, 58</sup>, enquanto que os agentes endovenosos promovem a imunidade mediada por células e aparentam ter propriedades antineoplásicas <sup>44, 56</sup>. Estudos retrospectivos em câncer de mama, cólon e reto demonstraram que os anestésicos inalatórios estão associados à redução da sobrevida geral em comparação com a anestesia intravenosa total com propofol <sup>59 - 61</sup>. Da mesma forma, uma meta-análise conduzida por Yap e colaboradores sugeriu uma sobrevida livre de recorrência significativamente maior em pacientes submetidos a anestesia intravenosa total com propofol quando comparados a indivíduos que receberam anestésicos inalatórios em uma compilação de alguns tipos de câncer (mama, esôfago e pulmão não pequenas células) <sup>62</sup>.

Outra classe de medicações comumente utilizadas são os opióides. Seu uso pode inibir a resposta imunológica celular e humoral basicamente por reduzir a atividade das células NK <sup>56</sup>. Estudos retrospectivos mostram piores desfechos associados ao aumento das doses de opióides no perioperatório <sup>63, 64</sup>.

Nesse contexto, a anestesia representa uma tentativa de ajustar esse desequilíbrio causado pelo estresse cirúrgico na homeostase do organismo. A

capacidade potencial da anestesia regional de melhorar os resultados após a cirurgias oncológicas pode ser atribuída a pelo menos três mecanismos diferentes: primeiro, a anestesia neuroaxial atenua o efeito imunossupressor da cirurgia <sup>24, 44</sup> e pode inibir a resposta neuroendócrina ao estresse cirúrgico. Em segundo lugar, os pacientes que recebem analgesia regional têm menor necessidade de opióides no período perioperatório. Os opióides podem inibir a imunidade mediada por células e as defesas antitumorais do hospedeiro. Finalmente, quando a anestesia regional é usada em combinação com a anestesia geral, a quantidade de anestésicos gerais necessária durante a cirurgia é na maioria das vezes reduzida <sup>44, 65</sup>.

### 1.5 Modelos experimentais em CaP

O camundongo (*Mus musculus*) é um dos melhores animais utilizados para modelos *in vivo* de câncer, devido as suas características biológicas homogêneas, ao curto tempo de desenvolvimento do câncer neste organismo e aos baixos custos necessários para gerar grandes populações desses animais.

Como a incidência de CaP nestes animais é baixa quando comparada com humanos, os modelos experimentais para o CaP envolvem indivíduos mutados com algum grau de deficiência do sistema imune, podendo ser total ou parcialmente desprovidos de imunidade como os SCID (*Severe Combined Immuno Deficiency*), que não apresentam linfócitos T e B. Os animais SCID foram descritos em 1983 por pesquisadores da Pensilvânia, EUA, e possuem uma mutação autossômica recessiva no alelo *Prkdc<sup>scid</sup>* no cromossomo 16 <sup>66</sup>. Em 1995, Shultz e colaboradores descreveram um novo modelo de camundongo imunodeficiente obtido pelo cruzamento das cepas de camundongos SCID e NOD (*non obese diabetic*) <sup>67</sup>. A cepa NOD é caracterizada por déficit de linfócitos B e T, ausência de complemento circulante e defeitos na diferenciação e função das células apresentadoras de antígenos. O modelo NOD/SCID combina vários defeitos funcionais de imunidade adaptativa e inata e é adequado para xenoenxertos de linhagens tumorais humanas <sup>68</sup>, no entanto, isso leva a uma grande suscetibilidade desses animais a infecção e óbito. Quando células ou tecidos tumorais são inoculados no sítio primário do tumor, temos o chamado modelo ortotópico; quando em outro local, heterotópico e metastático quando difuso.

Algumas linhagens celulares de CaP podem ser usadas para o estudo dessa doença nos camundongos NOD/SCID, dentre elas: PC3, DU 145 e LNCaP, e seus locais de inoculação incluem injeção subcutânea, renal subcapsular, medula óssea, ortotópica e corrente sanguínea (por veias periféricas ou injeção intracardíaca). A linhagem celular PC3 foi originalmente derivada de uma metástase óssea de origem de adenocarcinoma prostático humano <sup>69</sup>. As células PC-3M são variantes derivadas de metástases de PC3. Elas são obtidas a partir da inoculação ortotópica de células previamente cultivadas em tumores prostáticos ou em nódulos linfáticos. Esse processo aumenta a incidência de metástases dessa linhagem <sup>70</sup>.

Um dos possíveis modelos heterotópicos para os camundongos NOD/SCID é a inoculação subcutânea de linhagens tumorais. Apesar de levar alguns dias a mais para apresentarem metástases do que em modelos ortotópicos, a injeção subcutânea de células PC-3M é um método de fácil manejo e com boa reprodutibilidade <sup>71</sup>. Estudos prévios mostram que o período mais comum para o surgimento de metástases a distância, sobretudo em ossos, é entre 3 e 4 semanas após a inoculação do tumor <sup>72, 73</sup>.

Para identificar micrometástases ósseas, a radiografia simples não é adequada, pois detecta apenas grandes lesões osteolíticas. No entanto, existe a possibilidade de utilizar células tumorais geneticamente modificadas contendo genes que codificam proteínas emissoras de fluorescência ou bioluminescência e a utilização dos sistemas de análise de imagem *in vivo*. O surgimento dessa técnica permitiu estudos do desenvolvimento tumoral abrindo possibilidades para a avaliação contínua da resposta tumoral à diversas intervenções. Além disso, essa técnica permite direcionar a coleta de tecidos após o sacrifício dos animais estudados, direcionando a análise histológica.

## **1.6 Justificativa**

Levando em conta a morbidade do CaP e considerando que este seja um dos tumores mais comuns em homens, torna-se de extrema importância todo elemento que possa melhorar o tratamento dos pacientes.

A anestesia, ato de grande relevância durante a cirurgia para ressecção do CaP, parece ser uma parte importante para o sucesso do tratamento e para a

otimização do período perioperatório dos pacientes submetidos a esse procedimento.

Levando isso em consideração, avaliamos a eficácia da anestesia combinada, *in vivo*, no controle da disseminação de células tumorais durante o ato cirúrgico no tratamento do CaP quando comparada com a anestesia geral. Além disso, comparamos o padrão de expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias e a quantidade de células NK no sangue dos animais submetidos a um desses dois tipos de anestesia.





## **2. OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo primário**

Comparar a disseminação de células cancerígenas na corrente sanguínea em diferentes grupos submetidos a anestesia combinada (raquianestesia e anestesia geral) ou anestesia geral em um modelo *in vivo* de CaP após o ato cirúrgico para exérese de tumores subcutâneos.

## **2.2 Objetivos secundários**

Comparar o padrão da expressão de citocinas pró (FNT- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, 5, 6 e 12) e anti-inflamatórias (IL-4 e 10) e a quantidade de células NK no sangue dos animais entre os grupos que receberam anestesia geral e anestesia combinada.

## **3. MÉTODOS**

### 3.1 Estudos *in vitro*

#### 3.1.1 Linhagem celular

A linhagem PC-3M-luc-C6, com origem no *MD Anderson Cancer Center (University of Texas/Novartis Institute for Biomedical Research)* foi adquirida da empresa *Caliper Life Sciences* (Hopkinton, MA, EUA) e cultivada em meio essencial mínimo suplementado com glutamina. Todas as culturas foram complementadas com 10% de soro fetal bovino e solução antibiótica e antimicótica (*Sigma Co, St. Louis, MO, EUA*) a 1% em frascos apropriados em estufa de cultura de células a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado a cada dois dias e no estado de subconfluência as células foram ressuspensas e subcultivadas em frascos adicionais.

A autenticação da linhagem celular foi realizada por ensaio *short tandem repeats* (STR) através do serviço disponível pela Rede Premium da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

### 3.2 Estudos *in vivo*

#### 3.2.1 Estabelecimento do modelo animal do CaP subcutâneo

O presente projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da FMUSP sob número 1332/2019.

Foram utilizados no total 26 camundongos machos, tipo NOD/SCID, com peso entre 10 e 20 g e com 11 a 13 semanas de idade. Inicialmente, foram realizados experimentos com o objetivo de padronizar o modelo proposto de aplicação das células tumorais.

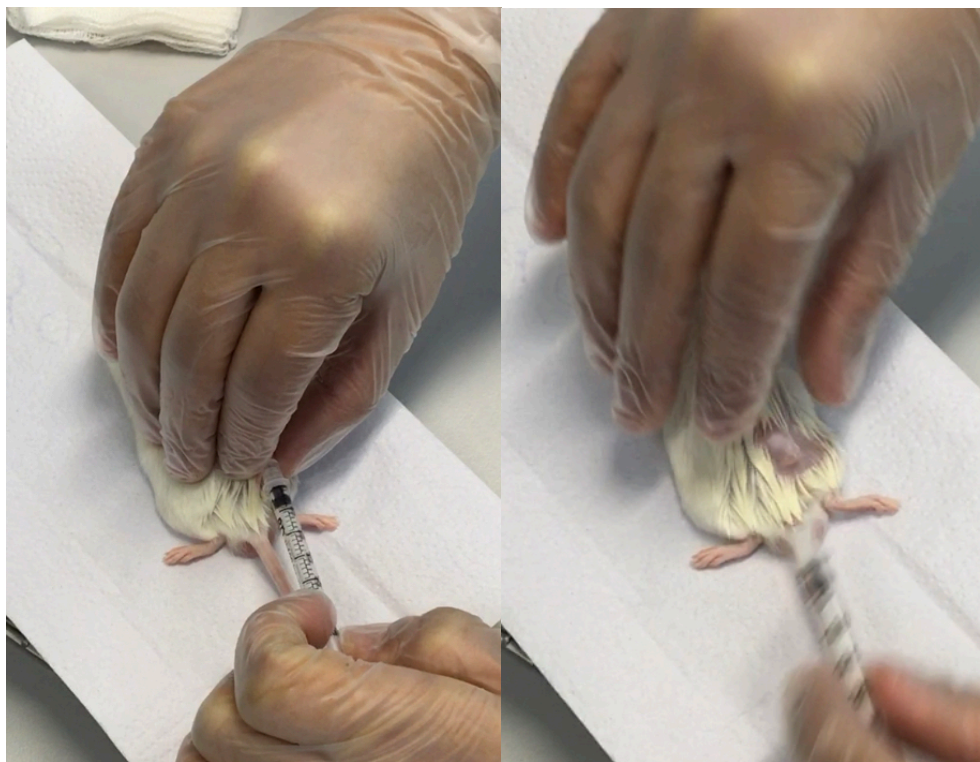
Seguindo tentativas previamente descritas na literatura <sup>71, 74</sup>, selecionamos células de CaP humano da linhagem PC-3M transfectadas com genes do vaga-lume (*Firefly*), espécie *Photinus pyralis* da América do Norte, utilizando um plasmídeo, no caso o pGL3, que expressa a proteína luciferase emissora de fluorescência (PC-3M-luc-C6). Essa linhagem serve para modelos *in vivo* de tumores subcutâneos,

intravenosos e intracardíacos. Essas células foram inoculadas na região subcutânea do flanco inferior direito dos camundongos.

Devido a variações existentes na literatura em relação a quantidade de células injetadas inicialmente <sup>72-75</sup>, a quantidade de semanas observadas para início da formação de tumores subcutâneos palpáveis e ao surgimento de metástases locais e a distância, foi realizado um experimento inicial para observação do crescimento tumoral ao longo de 5 semanas.

O primeiro grupo foi constituído por 3 animais. Seguindo modelos previamente descritos <sup>72</sup> e baseados em experiências prévias do nosso grupo, optamos inicialmente pela inoculação subcutânea de  $1,5 \times 10^6$  células tumorais em 50  $\mu$ l de solução tamponada PBS. Após a implantação dos tumores os camundongos ficaram climatizados em um ambiente com comida e água a vontade em regime de luz/escuro de 12 horas. Semanalmente (7, 14, 21, 28 e 35 dias), durante 5 semanas, foram realizadas medidas do tamanho tumoral por paquímetro digital, assim como análises de intensidade de bioluminescência *in vivo* (*In vivo Imaging System* - IVIS - Xenogen - IVIS® Spectrum, Perkin Elmer, EUA). O volume estimado pelas medidas com o paquímetro foi calculado com base na fórmula:  $V = [L \times C \times (L + C) / 2] \times 0,52$ , sendo V o volume, L a largura e C o comprimento <sup>75</sup>.

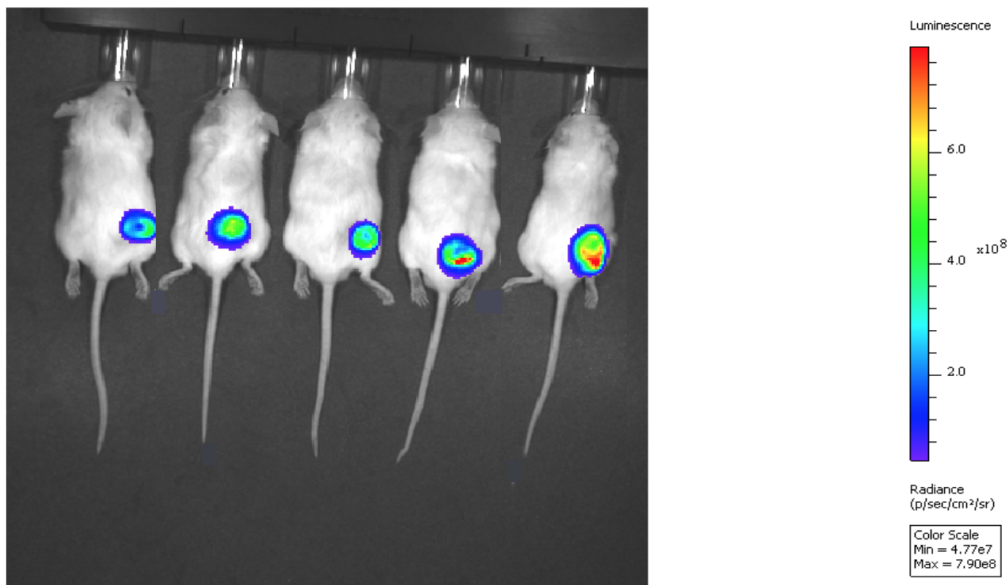
Para a injeção das células tumorais no tecido subcutâneo, os animais foram anestesiados com 60  $\mu$ l de cetamina na concentração de 50 mg/ml por via intraperitoneal. Após sedação profunda, com respiração espontânea e ausência de movimento a estímulos de pressão das patas traseiras, os animais foram posicionados em decúbito ventral com as patas imobilizadas. Utilizamos paramentação estéril e antisepsia do flanco do animal com álcool 70%. A injeção foi feita com seringa de 1 ml com agulha hipodérmica 30 G, 6 mm (BD®) com 50  $\mu$ L de uma solução de PBS estéril contendo  $1,5 \times 10^6$  células da linhagem PC-3M-luc-C6 (Figura 5).



**Figura 5.** Posição da agulha para injeção das células PC-3M-luc-C6 no flanco direito dos camundongos e tumoração inicial logo após injeção.

Nos intervalos citados, após a inoculação e crescimento mensurável dos tumores, foram injetados por via intraperitoneal o substrato da luciferase, a D-luciferina (*MISSION® LightSwitch Luciferase Assay Reagent™, Merck, Darmstadt, Alemanha*) na dose de 5 mg/kg para primeira imagem *in vivo* no equipamento IVIS.

A partir dos resultados desse teste inicial, foi realizado um novo teste com mais 2 animais. Foram mantidas as características de climatização do primeiro grupo. Nesse segundo experimento, foram inoculadas novamente  $1,5 \times 10^6$  células tumorais em 50  $\mu$ l de DBPS no subcutâneo do flanco inferior direito dos animais. A técnica de inoculação, assim como as medidas de tamanho tumoral e de bioluminescência seguiram os mesmos padrões do grupo anterior (Figura 6).



**Figura 6.** Animais colocados no equipamento IVIS após a injeção intraperitoneal de luciferina.

Considerando o D0 como o dia da injeção dos tumores subcutâneos, os primeiros sinais sugestivos de metástases a distância detectados pela bioluminescência *in vivo* ocorreram após a quinta semana (D35) em todos os animais.

### 3.2.2 Comparação das técnicas anestésicas nos animais

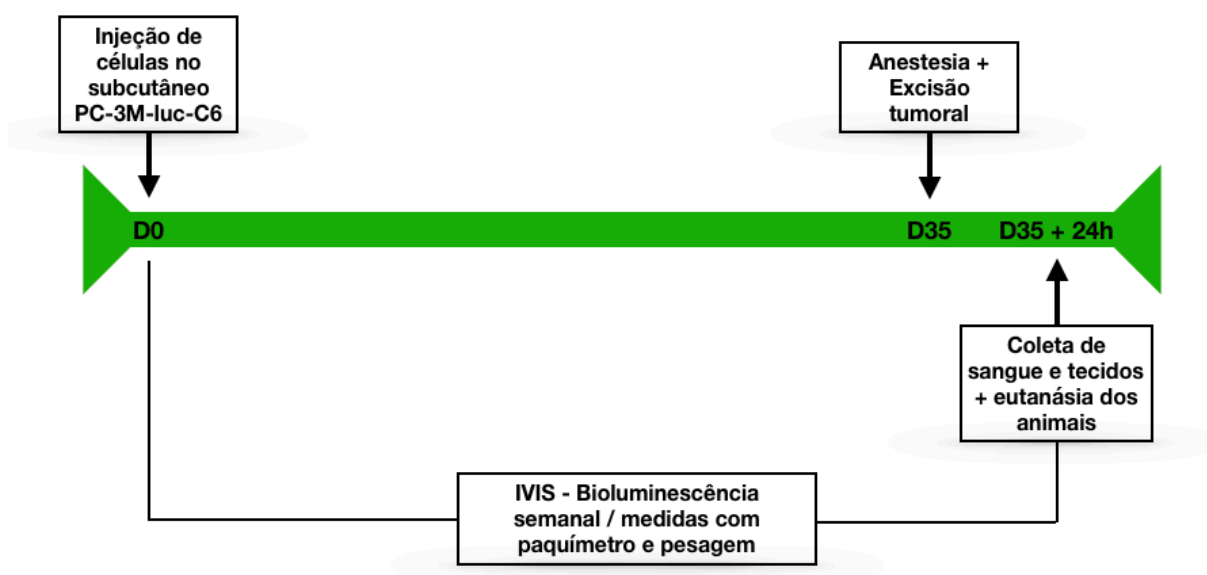
Após o estabelecimento do número de dias de crescimento tumoral com o surgimento dos primeiros sinais que indicavam a ocorrência de metástases (D35), foram utilizados mais 21 animais seguindo a divisão:

- a) grupo controle (n = 7): animais com tumores subcutâneos, submetidos a anestesia geral no D35, sem realização de cirurgia para excisão tumoral;
- b) grupo intervenção com cirurgia e apenas anestesia geral (n = 7): animais com tumores subcutâneos, submetidos a anestesia geral e cirurgia para excisão tumoral no D35;
- c) grupo intervenção com cirurgia e anestesia combinada (geral e raquianestesia associadas) (n = 7): animais com tumores subcutâneos, submetidos a anestesia combinada e cirurgia para excisão tumoral no D35.



Todos esses animais receberam  $1,5 \times 10^6$  células tumorais PC-3M-luc-C6 suspensas em 50  $\mu$ l de PBS no subcutâneo do flanco inferior direito inicialmente, no D0.

Seguindo os resultados do experimento citado previamente com 5 animais, as cirurgias foram realizadas 35 dias após as injeções subcutâneas, quando os tumores já apresentavam um crescimento mensurável e com sinais de metástases detectadas na bioluminescência *in vivo*. O sangue dos camundongos foi coletado 24 horas após o procedimento. Os animais eram então eutanasiados com overdose de isoflurano, de modo que a concentração elevada desse agente anestésico (maior que 5%) causasse parada respiratória nos camundongos em plano anestésico profundo. Os animais pertencentes ao grupo controle foram inoculados com os tumores no subcutâneo e após 35 dias não passaram por nenhuma intervenção cirúrgica, sendo apenas anestesiados com isoflurano antes da coleta de sangue e eutanásia. Tanto a injeção dos tumores quanto a retirada de sangue foram concluídas em menos de 1 hora em todos os experimentos. Cada experimento foi conduzido separadamente, e os camundongos não foram usados para mais de uma intervenção. Todas as análises de sangue dos animais foram realizadas no mesmo dia, no máximo 3h após as coletas das mesmas pelo mesmo pesquisador (Figura 7).

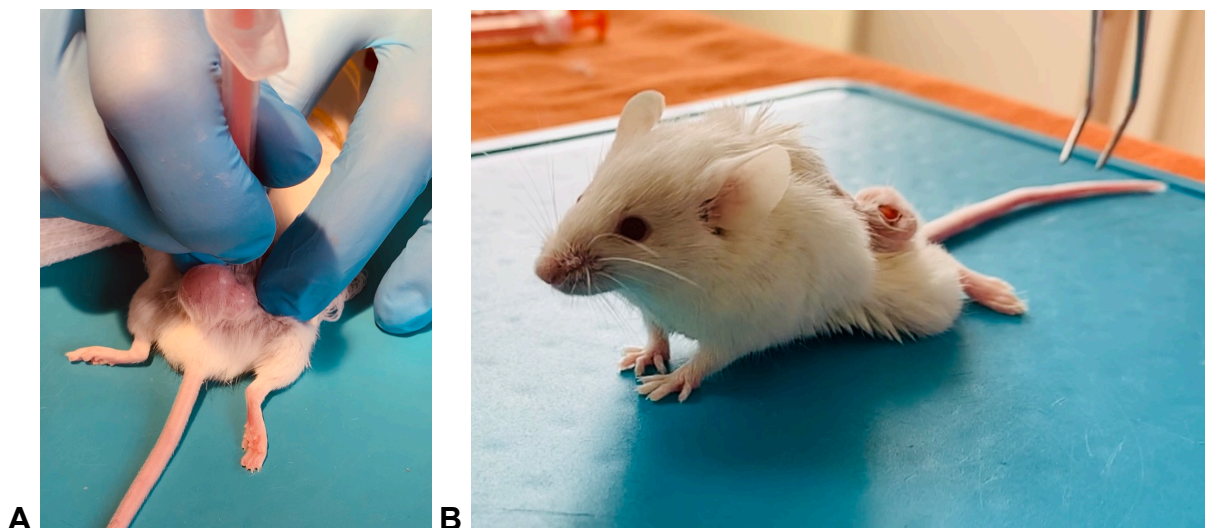


**Figura 7.** Esquemática dos tratamentos dos animais e seu acompanhamento ao longo do estudo.

### 3.2.3 Anestesia geral, morfina e raquianestesia

A anestesia geral foi induzida com isoflurano e mantida a 1,2% de isoflurano em ar ambiente com oxigênio 50% por meio de um vaporizador. Os camundongos respiraram espontaneamente durante a anestesia e a concentração de anestésico foi ajustada de acordo com o padrão respiratório do animal.

A técnica de injeção espinal foi adaptada baseada em métodos previamente descritos <sup>76-79</sup>. Após a indução com isoflurano, os animais foram segurados em decúbito ventral e apoiados em um pequeno rolo de plástico, de modo que a coluna vertebral ficasse fletida anteriormente, e uma agulha de aço inoxidável de calibre 30 G ligada a uma seringa de 10 µl fosse inserida entre as vértebras L5 e L6 ou L4 e L5 (níveis vertebrais nos quais ocorre o término do cone medular nos camundongos). A penetração no canal vertebral foi confirmada com movimento da cauda ou da perna traseira e foram injetados 5 µl de bupivacaína 0,5%, contendo 1,25 µg de sulfato de morfina. Este regime de drogas foi adaptado de estudos experimentais anteriores <sup>76, 79</sup> (Figura 8).



**Figura 8.** A, técnica utilizada para realização de raquianestesia nos camundongos. Os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório e posicionados sobre um coxim de gases de modo que sua coluna ficasse em leve flexão. A região sacral foi palpada e a agulha inserida cerca de 3 mm entre as vértebras L5/L6 ou L4/L5. Na figura ainda é possível observar o tumor subcutâneo já volumoso após 35 dias. B, camundongo após a aplicação da anestesia intratecal, com ausência de tônus nas patas traseiras e na cauda.

A analgesia para animais sem anestesia regional foi fornecida com sulfato de morfina. Essa droga foi preparada na concentração de 5 mg/ml em solução salina e

injetada por via intraperitoneal na dose de 10 mg/kg em agulha de calibre 30 G. A injeção foi realizada após anestesia geral induzida com isoflurano.

Para validar o efeito analgésico da morfina sistêmica intraperitoneal e do bloqueio espinhal, realizamos testes álgicos uma vez antes e 5 minutos após aplicar qualquer um desses métodos analgésicos. O limiar de dor foi avaliado medindo a latência para a retirada da cauda após imersão em água a 50°C (*tail-flick test*) (Figura 9). Esse teste foi realizado antes dos animais serem submetidos a qualquer tipo de anestesia, com a retirada imediata da cauda por todos os camundongos nessa ocasião. Após indução inalatória com isoflurano a raquianestesia ou a inoculação de morfina intraperitoneal foram realizadas nos camundongos. Com a analgesia aplicada e após os camundongos acordarem da anestesia inalatória com isoflurano, o tempo de latência para a retirada da cauda foi novamente medido em todos os animais. Um tempo de corte de 10 segundos foi definido para evitar danos aos tecidos da cauda dos animais. Em seguida, após a comprovação da analgesia, os animais foram novamente anestesiados com isoflurano e as intervenções cirúrgicas foram realizadas.



**Figura 9.** Camundongo submetido ao *tail-flick test* após receber raquianestesia.

### **3.2.4 Excisão tumoral**

Após tricotomia e antissepsia com álcool 70%, foi feita uma incisão elíptica e centrada sobre os tumores subcutâneos. As incisões apresentaram um terço do comprimento da lesão, com margens laterais médias de 2 mm. Após os tumores serem dissecados da fáscia adjacente, a pele foi suturada com pontos simples utilizando fios de nylon 5.0. Os camundongos foram acordados cerca de 3 a 5 minutos após a sutura.

### **3.2.5 Coleta de sangue**

O sangue dos animais foi coletado por drenagem de sangue terminal pela veia cava inferior. Seguindo um método previamente descrito <sup>80</sup>, a cavidade abdominal foi aberta com uma incisão longitudinal de 1 cm, os intestinos foram desviados para a esquerda e o fígado foi empurrado para a frente. A veia cava inferior ficava então facilmente localizada e o sangue foi retirado com uma agulha de calibre 30 G conectada a uma seringa de 1 ml (Figura 10). Todos os animais foram anestesiados antes deste procedimento e eutanasiados após a coleta de sangue conforme já descrito anteriormente. Após a coleta o sangue de cada animal foi armazenado em tubos contendo EDTA e em tubos de coleta simples.



**Figura 10.** Coleta terminal do sangue dos camundongos pela veia cava inferior. Após a coleta os animais foram eutanasiados.

### 3.2.6 Análise das células tumorais circulantes

As células tumorais circulantes foram analisadas com base na bioluminescência produzida pela linhagem celular PC-3M-luc-C6 após reação *in vitro* com a enzima luciferase. As amostras de sangue dos animais foram coletadas em tubos estéreis contendo EDTA e 100  $\mu$ l de sangue total foram expostos ao reagente do ensaio de luciferase (*MISSION LightSwitch Luciferase Assay Reagent™*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Seguindo as recomendações do fabricante, a luciferina disponível no kit foi misturada com a solução solvente de modo a ficar na concentração 100x. Essa mistura foi então armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  no escuro. Antes de cada teste, essa solução de substrato e solvente era aquecida a temperatura ambiente e 10  $\mu$ l eram diluídos em 990  $\mu$ l do tampão fornecido pelo kit. Cada 100  $\mu$ l de sangue total coletados eram expostos a 100  $\mu$ l dessa solução final e armazenados por 30 min protegidos de luz em temperatura ambiente. Após esse

intervalo, as células eram então tratadas com solução de lise (BD FACSTM *Lysing Solution*, Nova Jersey, NJ, EUA) diluída na proporção 1:10 em água destilada. Cada tubo era adicionado com 2 ml da solução de lise e vortexado para homogeneização da solução e armazenados por 10 min. A seguir eram acrescentados mais 2 ml de uma solução contendo PBS (1x) e albumina de soro bovina (0,5%) e os tubos eram centrifugados a 1800 RPM. Com o descarte do sobrenadante, esse processo era repetido mais 2 vezes (total de 3 vezes), com a adição de 2 ml dessa última solução antes da centrifugação. Após o terceiro ciclo, 300 µl de PBS (1x) eram adicionados. A seguir, 50 µl desse recipiente eram analisados no citômetro de fluxo (*Muse™ Cell Analyzer*, EMD Millipore Corporation, Hayward, CA, EUA). O comprimento de onda emitido pela reação do substrato com a luciferase presente nas células tumorais fica em torno de 570 nm. Essa medida pode ser detectada pelo citômetro de fluxo citado nos detectores de fluorescência (fotodiodos amarelos - 576/28).

### **3.2.7 Ensaios de células NK**

As células NK dos camundongos expressam em sua superfície a proteína NK1.1, também conhecida como CD161. Essa é uma proteína de membrana pertencente a família de receptores NKR-P1 e é uma das responsáveis pela ativação e indução da citotoxicidade das células NK. Após a coleta de 100 µl de sangue total em tubos estéreis contendo EDTA, as células NK foram identificadas usando anticorpo monoclonal anti-NK1.1 conjugado com fluoresceína R-ficoeritrina (PE) (*BD PharMingen*, San Diego, CA). A fluoresceína PE é uma proteína isolada de algas vermelhas que ao ser estimulada por lasers com comprimento de onda entre 488 e 561 nm, exibe fluorescência vermelho-alaranjada (pico de fluorescência em 578 nm). Quando ligados a proteína NK1.1, esses anticorpos, portanto são lidos no citômetro de fluxo de acordo com a fluorescência emitida por essa proteína conjugada.

Seguindo as instruções do fabricante e o protocolo cedido por colegas do Laboratório de Investigação Médica de Imunologia Clínica e Alergia (LIM 60), os anticorpos foram armazenados no escuro, na temperatura de 4°C e quando utilizados, eram adicionados na proporção de 0,5 µl para cada tubo contendo 100 µl de sangue total. Após feita essa mistura, os anticorpos eram incubados por 20

minutos ainda a 4°C protegidos da luz. Após esse intervalo, as células eram então tratadas com solução de lise (BD FACSTM *Lysing Solution*, Nova Jersey, NJ, EUA) diluída na proporção 1:10 em água destilada. Cada tubo era adicionado com 2 ml da solução de lise e vortexado para homogeneização da solução e armazenados por 10 minutos. A seguir eram acrescentados mais 2 ml de uma solução contendo PBS (1x) e albumina de soro bovina (0,5%) e os tubos eram centrifugados a 1800 RPM. Com o descarte do sobrenadante, esse processo era repetido mais 2 vezes (total de 3 vezes), com a adição de 2 ml dessa última solução antes da centrifugação. Após o terceiro ciclo, 300 µl de PBS (1x) eram adicionados. A seguir, 50 µl desse recipiente eram analisados no citômetro de fluxo (*Muse™ Cell Analyzer*, EMD Millipore Corporation, Hayward, CA, EUA).

### **3.2.8 Análise da quantidade de citocinas**

Após a coleta do sangue em tubos simples com gel separador, 200 µl de sangue total foram centrifugados por 15 minutos a 2.500 rpm e o sobrenadante foi obtido e armazenado a - 20°C. Com todas as amostras já separadas, as análises de citocinas foram realizadas pelo ensaio xMAP (*Multiple Analyte Profiling*) da Luminex®, que possibilita quantificar vários biomarcadores ao mesmo tempo em uma pequena quantidade de amostra biológica. Essa tecnologia utiliza microesferas magnéticas fluorescentes que são revestidas com anticorpos de captura específicos para a substância analisada. Depois que esse complexo captura o analito, anticorpos de detecção biotinilados se ligam a esse substrato e estreptavidina-ficoeritrina é adicionada. Esta se liga aos anticorpos de detecção biotinilados, fornecendo sinais fluorescentes com intensidades em proporção à quantidade de analito ligado. Essas intensidades são capturadas e analisadas por softwares que expressam os níveis dos biomarcadores.

Para realização do ensaio, as amostras foram descongeladas e centrifugadas à 4500 rpm, em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram preparadas em uma placa de 96 poços utilizando o kit de 7 citocinas, *MAP Milliplex Mouse Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel* (Millipore Corp., Billerica, MA, EUA), seguindo os protocolos específicos do kit. Para reconstituição do padrão e montagem da curva, diluições de microesferas, amostras, anticorpos,



estreptavidina-ficoeritrina e solução de lavagem foram seguidas as instruções da bula dos kits, de acordo com o fabricante. Microesferas coloridas revestidas com anticorpos de captura contra as citocinas de interesse (IL-2, 4, 6, 10, 12, IFN- $\gamma$  e FNT- $\alpha$ ) foram pipetadas em uma placa com 96 poços. A seguir, foram pipetadas as amostras de plasma e as soluções foram incubadas em um agitador de placas (IKA MTS 2/4 digital). Após lavagem desse conjunto, o anticorpo de detecção foi adicionado à placa, que passou por novo período de incubação. As lavagens foram realizadas em uma lavadora magnética (*Bio-plex PRO II Wash Station*) e as microesferas permaneceram retidas na placa pela ação de um ímã. Foi adicionada, posteriormente, a estreptavidina-ficoeritrina, que emite sinal fluorescente quando excitada por um diodo emissor de luz (LED, *light emitting diode*). Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, foi adicionada aos poços uma solução tampão que permite a análise no equipamento leitor de microesferas Magpix Milliplex (*Luminex Corp, Austin, Texas, EUA*). Dois LEDs, um verde, com comprimento de ondas de 525 nm identifica os biomarcadores, e um vermelho, com comprimento 635 nm identifica a microesfera. Uma câmera com dispositivo de carga acoplado capturou essas imagens e as enviou para o software Xponent 4.2 (*Luminex Corp, Austin, Texas, EUA*). A análise dos dados foi realizada pelo software *Milliplex Analyst 5.1 (EMD Millipore)*. Os níveis das citocinas foram expressos em pg/ml e as concentrações dos biomarcadores foram determinadas com base no ajuste da curva padrão para a intensidade média de fluorescência versus pg/ml. Todas as citocinas foram medidas em triplicatas.

### **3.2.9 Contagem de metástases tumorais**

Com base nos órgãos nos quais mais comumente surgem metástases originadas por células PC-3M, selecionamos tecidos para análises histológicas subsequentes. Após a coleta de sangue, os camundongos foram eutanasiados e retiramos mandíbula, costelas, fêmur, pulmão, fígado, coração, rins e cérebro. Esses órgãos foram fixados em formalina tamponada (10%) por até 24 horas. Posteriormente, as amostras foram processadas de modo habitual e embebidas em parafina. Cortes de 5  $\mu$ m de espessura foram realizados seguidos por coloração pela Hematoxilina-Eosina.



### 3.3 Análise estatística

Para calcular o tamanho de nossa amostra foi utilizada a equação de recursos ( $E = \text{número total de animais} - \text{número de grupos}$ , sendo que  $E$  representa o grau de liberdade da análise de variâncias e é um número entre 10 e 20) <sup>81, 82</sup>.

As análises estatísticas foram realizadas com o software *IBM SPSS Statistics 19.0*. Após a realização do teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição das amostras, a análise de variâncias (ANOVA) ou o teste de Kruskal Wallis foram utilizados para comparar os dados das células tumorais no sangue, das células NK e das citocinas. Posteriormente, para comparações múltiplas, 2 a 2, foram usados os testes de Bonferroni ou de Dunn. Para todas as estatísticas, considerou-se nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão para dados paramétricos e mediana com máximos e mínimos para dados não paramétricos.

## **4. RESULTADOS**

#### **4.1 Estudos para acompanhamento do crescimento de tumores subcutâneos e metástases a distância**

O primeiro grupo, com 5 camundongos, foi usado como piloto para checar a aplicabilidade do modelo de tumor subcutâneo e a quantidade de dias necessária para haver células tumorais no sangue dos animais. A tabela 1 mostra a evolução do peso dos animais, dos volumes tumorais de acordo com as medidas realizadas no paquímetro digital e dos picos de radiância observados nos camundongos quando expostos ao substrato da enzima luciferase, a luciferina.

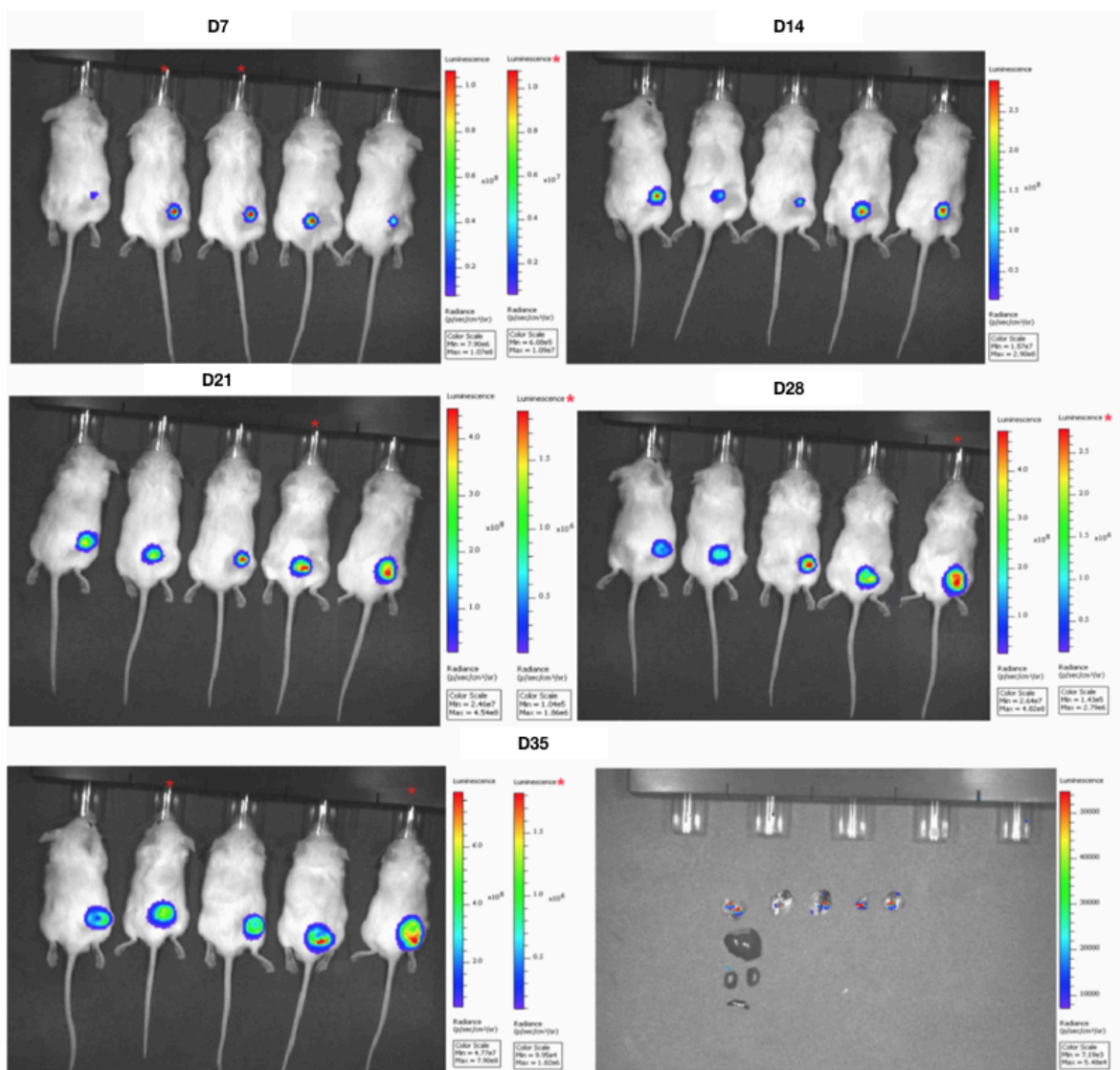
**Tabela 1.** Peso em gramas, volumes tumorais em milímetros cúbicos e picos de radiância (p/s/cm<sup>2</sup>/sr) ao longo do tempo, ao término de cada semana. PNM, palpável e não mensurável.

Tempo	Animais	Peso (g)	Medidas no paquímetro (mm <sup>3</sup> )	Pico de radiância / animal / dia
<b>7 dias</b>	1	22,43	-	6,91 x 10 <sup>7</sup>
	2	20,73	-	3,16 x 10 <sup>5</sup>
	3	20,78	PNM	2,32 x 10 <sup>7</sup>
	4	21,51	-	3,03 x 10 <sup>8</sup>
	5	21,1	PNM	9,15 x 10 <sup>7</sup>
<b>14 dias</b>	1	21,64	PNM	9,26 x 10 <sup>8</sup>
	2	21,41	PNM	3,15 x 10 <sup>8</sup>
	3	21,46	PNM	1,77 x 10 <sup>8</sup>
	4	22,01	PNM	1,08 x 10 <sup>9</sup>
	5	21,23	PMN	9,73 x 10 <sup>8</sup>
<b>21 dias</b>	1	21,21	PMN	1,88 x 10 <sup>9</sup>
	2	21	PNM	1,53 x 10 <sup>9</sup>
	3	20,9	PNM	1,32 x 10 <sup>9</sup>
	4	19,92	PMN	1,02 x 10 <sup>7</sup>
	5	20,54	PNM	3,34 x 10 <sup>9</sup>
<b>28 dias</b>	1	20,35	489	1,13 x 10 <sup>9</sup>
	2	20,03	276	1,62 x 10 <sup>9</sup>
	3	20,53	310	2,18 x 10 <sup>9</sup>
	4	18,55	402	2,67 x 10 <sup>9</sup>
	5	19,16	505	3,02 x 10 <sup>7</sup>
<b>35 dias</b>	1	19,6	667	3,63 x 10 <sup>9</sup>
	2	19,8	337	1,38 x 10 <sup>9</sup>
	3	19,94	328	4,06 x 10 <sup>9</sup>
	4	19,23	340	6,35 x 10 <sup>9</sup>
	5	18,75	803	2,83 x 10 <sup>9</sup>

Na medida que os tumores cresceram houve um aumento dos sinais de bioluminescência e uma redução de peso inversamente proporcional em todos os animais.

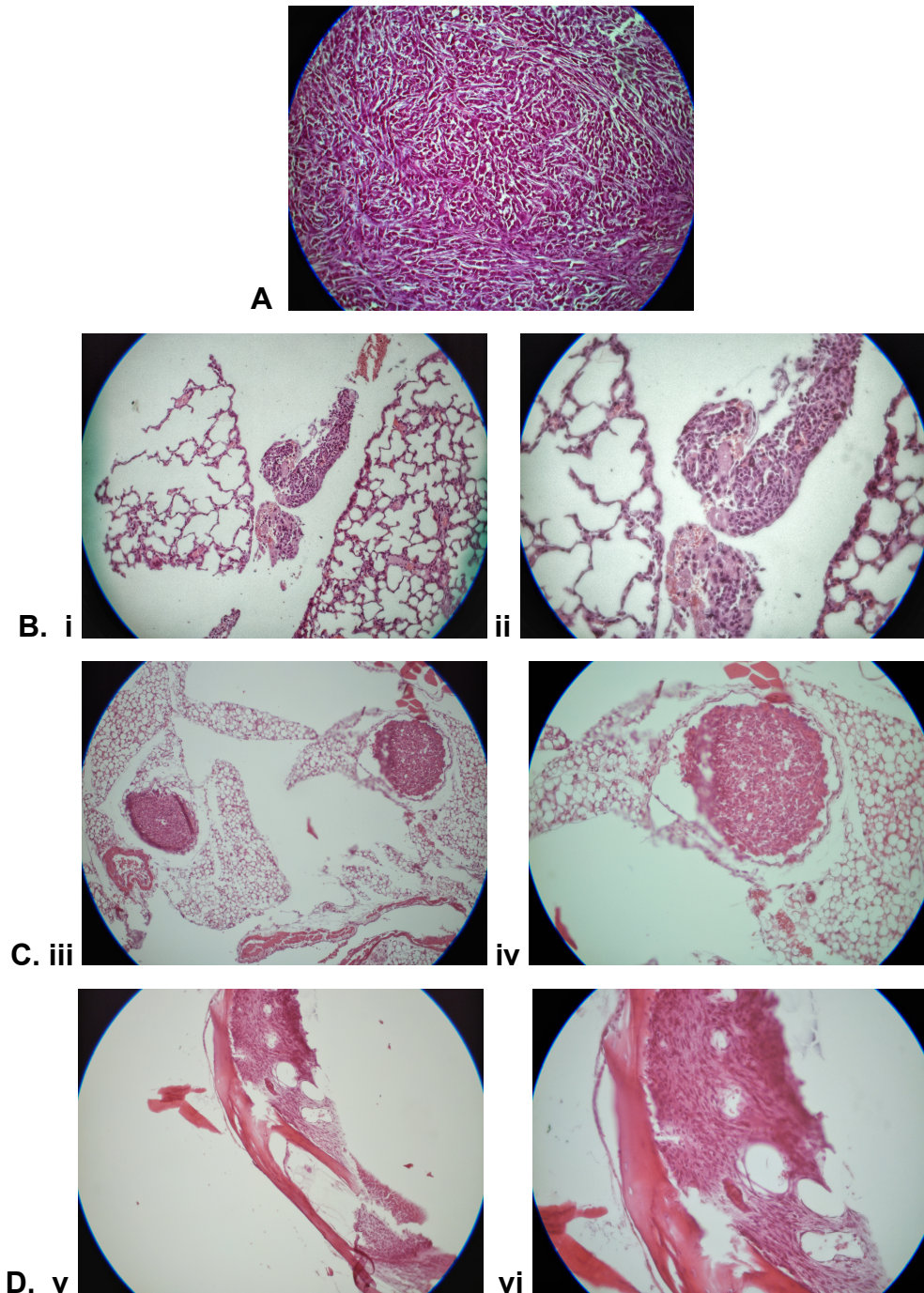
Antes do descarte desses camundongos, os pulmões dos animais que seriam analisados nos estudos anátomo patológicos foram colocados novamente no equipamento IVIS e foi observada a presença de sinal de bioluminescência nos pulmões dos cinco animais. Esses sinais só puderam ser vistos após a remoção dos órgãos dado que o sinal emitido foi muito menos intenso que o dos tumores subcutâneos (cerca de 100 a 1000 vezes menor).

A figura 11 mostra a evolução dos ensaios com bioluminescência ao longo dos dias. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados e os órgãos foram analisados isoladamente no equipamento IVIS, no qual notamos a presença de sinais emitidos pela luciferase *post mortem*.



**Figura 11.** Evolução da bioluminescência tumoral ao longo das semanas.

Além dessas análises, também foram realizados estudos anatomopatológicos e foi observada a presença de doença metastática em lâminas obtidas das costelas, pulmões e mandíbulas dos animais estudados (figura 12).



**Figura 12.** A. Microfotografia da lâmina de um dos tumores subcutâneos retirados dos camundongos após 5 semanas da inoculação das células, aumento de 20x. B. Cortes do pulmão de um dos animais após 5 semanas de inoculação das células tumorais. i. aumento de 20x; ii. aumento de 40x. C. Cortes das costelas de um dos animais após 5 semanas de inoculação das células tumorais. iii. aumento de 20x; iv. aumento de 40x. D. Cortes da mandíbula de um dos animais após 5 semanas de inoculação das células tumorais. v. aumento de 20x; vi. aumento de 40x.

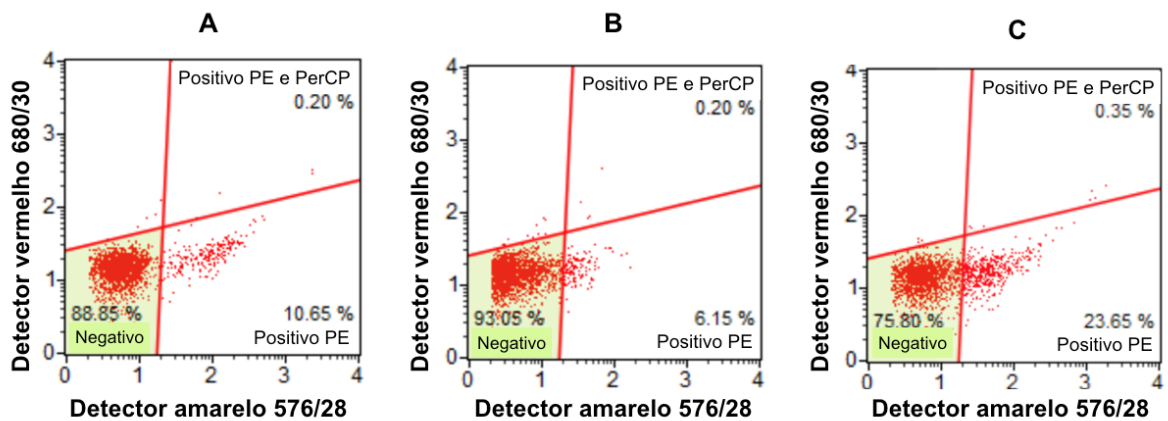
## 4.2 Comparação das técnicas anestésicas durante excisão dos tumores subcutâneos

### 4.2.1 Quantidade de células NK

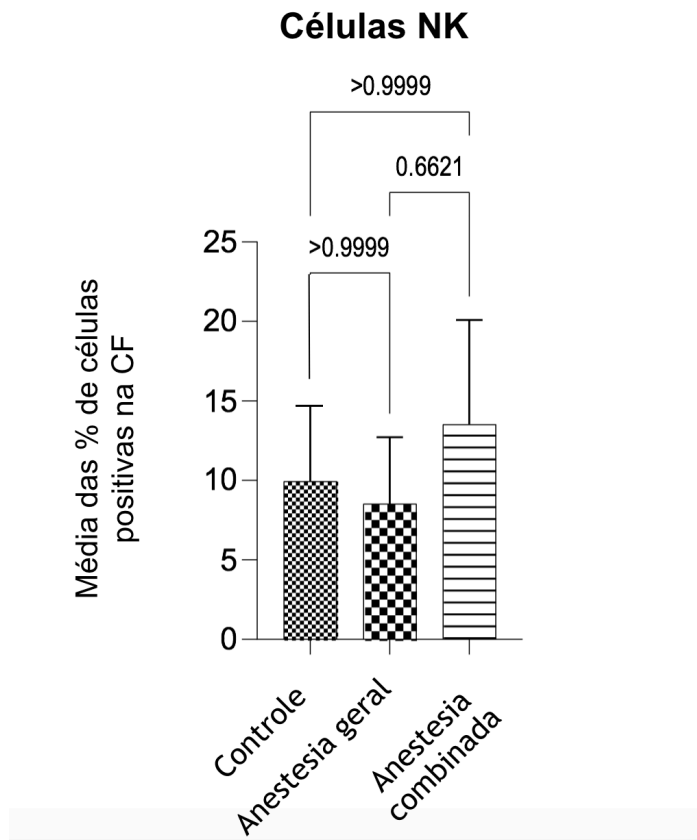
As quantidades de células NK no sangue dos animais, medidas por citometria de fluxo (figura 13), nos três grupos podem ser observados na tabela 2 e na figura 14.

**Tabela 2.** Média das quantidades de células NK mostradas na citometria de fluxo em cada grupo. DP, desvio padrão. # Teste ANOVA

	Média de quantidade de células NK $\pm$ DP (%)
Controle	9,94 $\pm$ 4,8
Anestesia geral	8,53 $\pm$ 4,18
Anestesia combinada	13,54 $\pm$ 4,5
p	0,440#



**Figura 13.** Exemplos dos experimentos nos 3 grupos. O gráfico das células NK marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos detectados na citometria de fluxo como amarelo (PE, comprimento de onda 576/28 nm). A, uma imagem de um dos animais do grupo controle; B, um dos animais do grupo sem raquianestesia; C, um exemplo do grupo com anestesia do neuroeixo.



**Figura 14.** Gráfico mostrando a quantidade média de células NK e os respectivos desvios padrão de cada grupo. CF, citometria de fluxo. Os números sobre as barras referem-se aos  $p$  obtidos pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

Apesar de observarmos uma menor média na quantidade de células NK no grupo cirúrgico sem anestesia do neuroeixo, não houve diferença estatística na comparação entre os três grupos (controle vs. anestesia geral e controle vs. anestesia combinada,  $p > 0,9999$  e anestesia geral vs. anestesia combinada,  $p = 0,6621$ ).

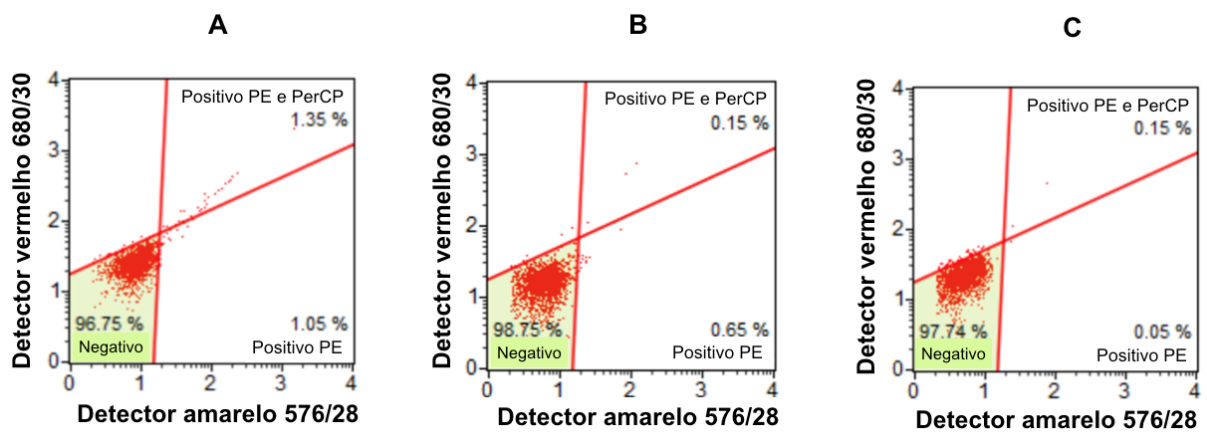
#### 4.2.2 Análise da quantidade de células tumorais circulantes

Em relação às células tumorais circulantes detectadas no citômetro de fluxo (figura 15), na tabela 3 e na figura 16, pode ser observada uma redução significativa na quantidade de células PC-3M-luc-C6 no sangue dos animais quando comparamos os grupos submetidos a cirurgia com e sem anestesia do neuroeixo ( $p = 0,028$ ).



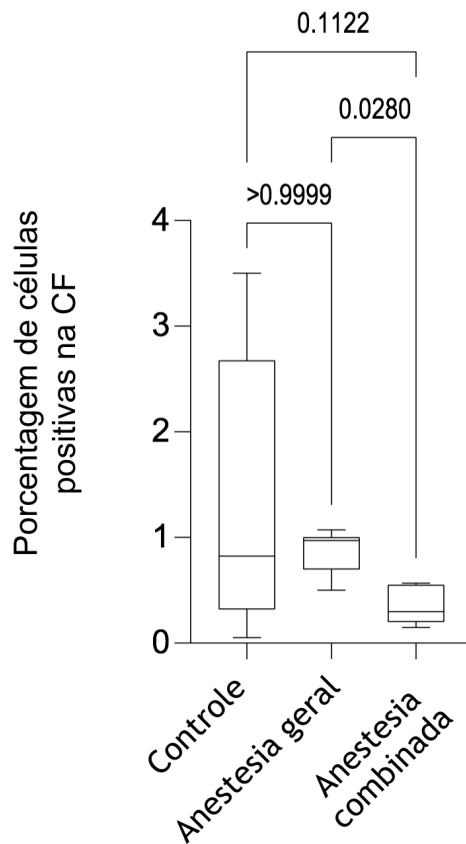
**Tabela 3.** Média das quantidades de células tumorais circulantes no sangue dos camundongos mostradas na citometria de fluxo em cada grupo (gráfico expresso em mediana). \* Teste Kruskal-Wallis.

	Mediana da quantidade de células tumorais circulantes (máx; min) (%)
Controle	0,825 (3,50; 0,05)
Anestesia geral	0,970 (1,07; 0,50)
Anestesia combinada	0,300 (0,57; 0,15)
<b>p</b>	<b>0,015*</b>



**Figura 15.** Exemplos dos experimentos nos 3 grupos. O gráfico das células tumorais circulantes estimuladas pela enzima luciferase e detectados na citometria de fluxo com a cor amarela (PE, comprimento de onda 576/28 nm). A, uma imagem de um dos animais do grupo controle; B, um dos animais do grupo seu raquianestesia; C, um exemplo do grupo com anestesia do neuroeixo.

## Células tumorais no sangue



**Figura 16.** Gráfico mostrando a quantidade de células tumorais circulantes em cada grupo. CF, citometria de fluxo. Os valores de p entre os grupos estão indicados sobre as linhas e foram calculados pelo teste *post-hoc* de Dunn.

Apesar da aparente diferença entre os grupos intervenção e o grupo controle, os testes estatísticos não demonstraram significância nessa comparação (controle vs. anestesia geral,  $p > 0,99$  e controle vs. anestesia combinada,  $p = 0,1122$ ).

### 4.2.3 Ensaio *Multiplex*

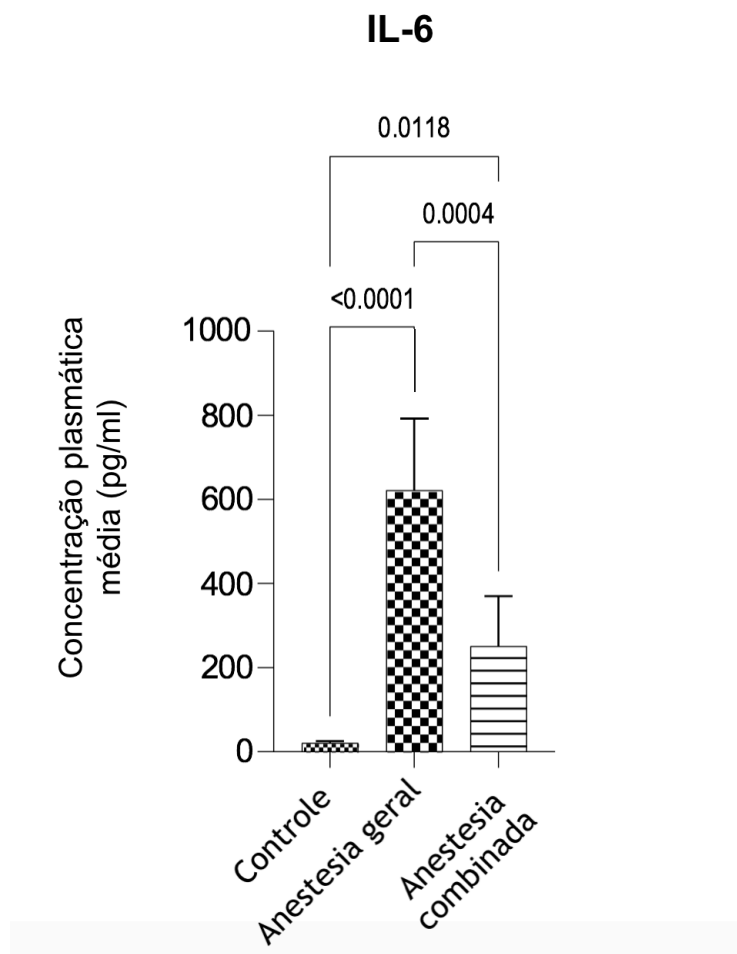
As respectivas quantidades médias de citocinas plasmáticas dos grupos estudados podem ser observadas na tabela 4. Foram realizados testes comparativos para cada uma das moléculas em cada grupo. A seguir, testes *post-hoc* foram utilizados e seus resultados estão indicados nos gráficos que seguem cada citocina.

**Tabela 4.** Concentração sérica das citocinas por grupo expressa em médias e medianas. Todas as concentrações foram expressas em pg/ml. DP, desvio padrão. \* Teste de Kruskal Wallis, # Teste ANOVA.

Citocina	Controle	Anestesia geral	Anestesia combinada	p	
<b>IL-6</b>	Média ± DP	21,52 ± 3,76	621,75 ± 170,64	251,59 ± 118,41	<0,001 #
	Mediana (máx; min)	21,31 (29,60; 15,77)	701 (1030; 321,7)	230,7 (397,3; 104,8)	
<b>FNT-<math>\alpha</math></b>	Média ± DP	3,48 ± 0,89	13,30 ± 2,07	6,96 ± 2,79	<0,001 *
	Mediana (máx; min)	3,03 (5,67; 2,61)	8,11 (30,31; 4,96)	6,78 (10,23; 3,37)	
<b>IL-4</b>	Média ± DP	53,86 ± 3,63	49,33 ± 2,77	49,20 ± 3,95	0,013*
	Mediana (máx; min)	52,80 (61,53; 48,73)	50,76 (52,50; 44,74)	48,73 (54,92; 42,80)	
<b>IL-10</b>	Média ± DP	9,80 ± 1,11	12,74 ± 3,89	16,63 ± 5,56	0,007*
	Mediana (máx; min)	9,61 (12,30; 8,16)	11,14 (21,13; 10,10)	12,20 (36,06; 9,61)	
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Média ± DP	16,73 ± 2,32	18,46 ± 3,46	25,17 ± 20,41	0,569*
	Mediana (máx; min)	16,60 (19,86; 11,22)	19,32 (23,65; 3,78)	16,22 (79,94; 15,13)	
<b>IL-2</b>	Média ± DP	5,61 ± 0,49	5,40 ± 0,33	5,27 ± 0,31	0,328*
	Mediana (máx; min)	5,56 (6,97; 5,11)	5,33 (6,01; 5,11)	5,11 (5,790; 4,90)	
<b>IL-12</b>	Média ± DP	42,82 ± 3,89	43,40 ± 4,71	43,50 ± 1,49	0,088#
	Mediana (máx; min)	42,54 (50,26; 37,28)	42,54 (51,95; 38,97)	43,42 (45,30; 40,75)	

#### 4.2.3.1 Interleucina 6

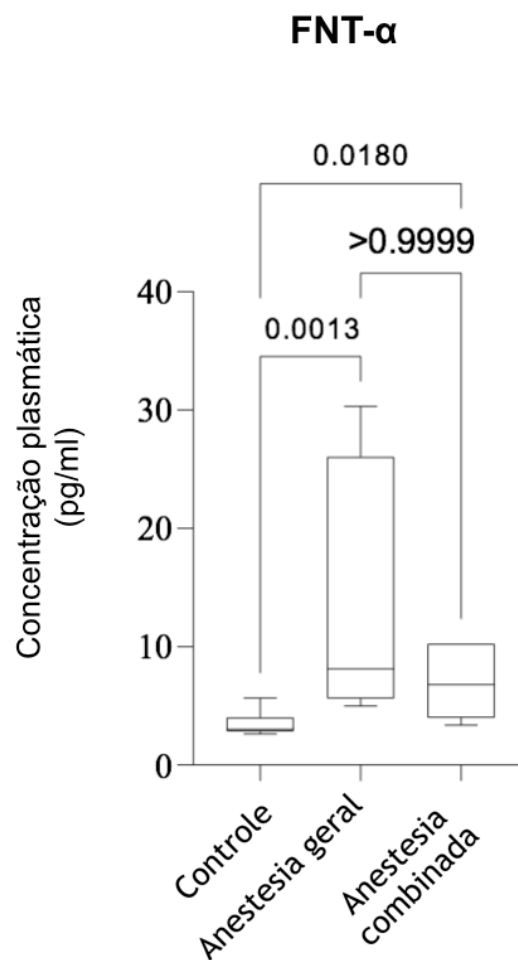
As cirurgias aumentaram de forma significativa os níveis de IL-6 em ambos os grupos anestesia geral ( $621,75 \pm 170,64$  pg/ml,  $p < 0,0001$ ) e anestesia combinada ( $251,59 \pm 118,41$  pg/ml,  $p = 0,0118$ ) em relação ao grupo controle ( $21,52 \pm 3,76$  pg/ml) (figura 17). Além disso, quando comparados entre os dois grupos submetidos a cirurgia, foi observada uma diferença importante entre os níveis de IL-6 ( $p = 0,0004$ ), sendo os níveis desta citocina consideravelmente maiores no grupo anestesia geral.



**Figura 17.** Comparação das concentrações plasmáticas médias de IL-6 entre os grupos (pg/ml). Os números sobre as barras referem-se aos p obtidos pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

#### 4.2.3.2 Fator de necrose tumoral $\alpha$

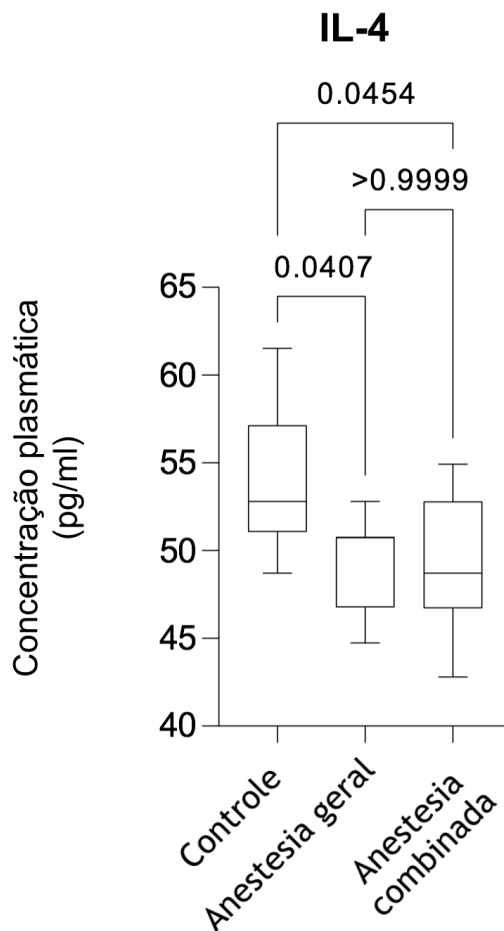
A produção de FNT- $\alpha$  após o estímulo cirúrgico foi aumentada de forma significativa quando comparada aos animais do grupo controle [3,03 (5,67; 2,61) pg/ml] (figura 18). Apesar de apresentar uma aparente diferença na quantidade de FNT- $\alpha$  no grupo submetido a raquianestesia [6,78 (10,23; 3,37) pg/ml] quando comparado ao grupo anestesia geral apenas [8,11 (30,31; 4,96) pg/ml], essa diferença não se demonstrou significativa ( $p > 0,99$ ).



**Figura 18.** Comparação das concentrações plasmáticas de FNT- $\alpha$  entre os grupos (pg/ml). Os números sobre as caixas referem-se aos p obtidos pelo teste *post-hoc* de Dunn.

#### 4.2.3.3 Interleucina 4

Os níveis de IL-4 diminuíram significativamente em resposta à cirurgia (grupo controle [52,80 (61,53; 48,73) pg/ml] tanto no grupo anestesia combinada [48,73 (54,92; 42,80) pg/ml;  $p = 0,0407$ ], quanto no grupo sem anestesia regional [50,76 (52,50; 44,74) pg/ml;  $p = 0,0454$ ]. No entanto, não houve diferença entre os grupos intervenção ( $p > 0,9999$ ) (figura 19).

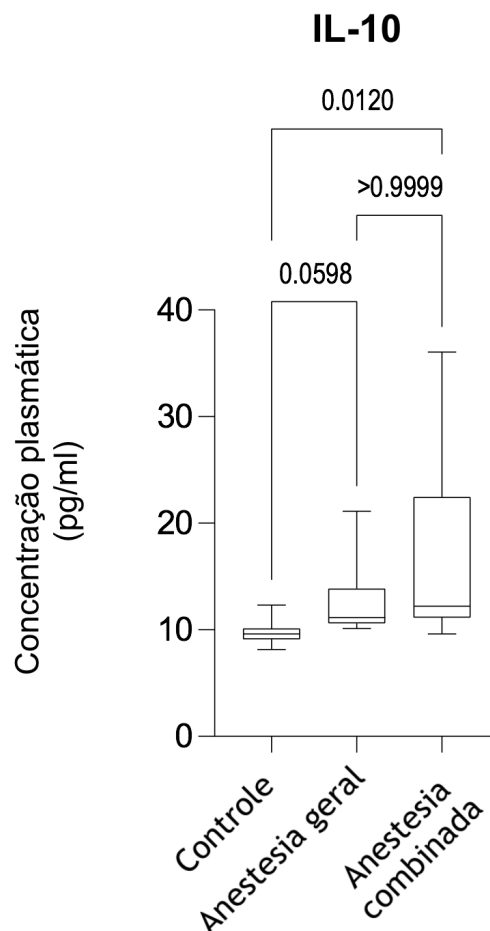


**Figura 19.** Comparação das concentrações plasmáticas de IL-4 entre os grupos (pg/ml). Os valores de  $p$  entre os grupos estão indicados sobre as caixas e foram calculados pelo teste *post-hoc* de Dunn.

#### 4.2.3.4 Interleucina 10

A produção de IL-10 apresentou um aumento no grupo submetido a cirurgia com anestesia geral [11,14 (21,13; 10,10) pg/ml] em relação ao grupo controle [9,61 (12,30; 8,16) pg/ml], mas sem significância estatística ( $p = 0,0598$ ). No entanto, no grupo cirúrgico que recebeu anestesia regional [12,20 (36,06; 9,61) pg/ml] essa diferença foi significativa quando comparado com os animais controles ( $p = 0,012$ ).

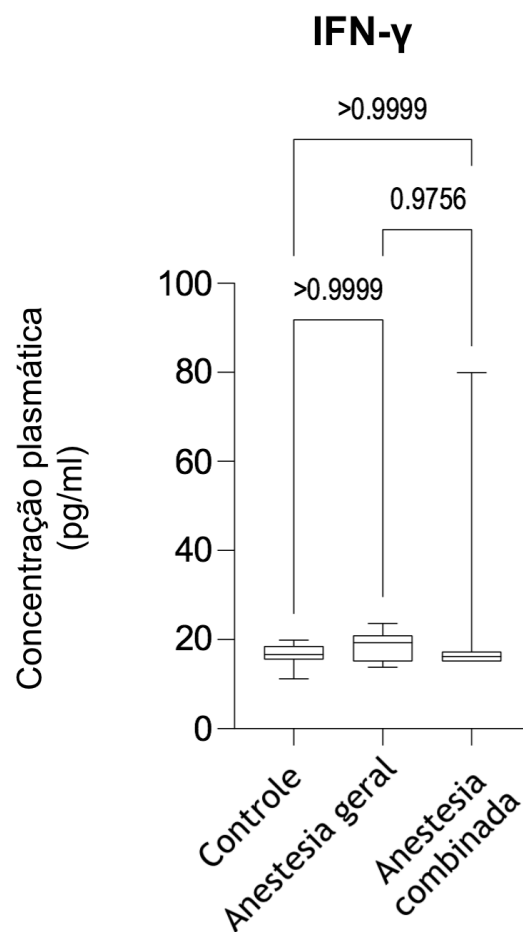
Embora o grupo que recebeu raquianestesia tenha apresentado níveis maiores de IL-10 ao compará-lo com o grupo submetido a anestesia geral, essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,99$ ) (figura 20).



**Figura 20.** Comparação das concentrações plasmáticas de IL-10 entre os grupos (pg/ml). Os valores de  $p$  entre os grupos estão indicados sobre as caixas e foram calculados pelo teste *post-hoc* de Dunn.

#### 4.2.3.5 Interferon $\gamma$

A quantidade de IFN- $\gamma$  não apresentou variações entre os grupos em nenhuma das comparações (grupo controle, 16,60 (19,86; 11,22) pg/ml; grupo anestesia geral 19,32 (23,65; 3,78) pg/ml; grupo anestesia combinada 16,22 (79,94; 15,13) pg/ml) como mostra a figura 21 (controle vs. anestesia geral,  $p > 0.9999$ , controle vs. anestesia combinada,  $p > 0.9999$ , e anestesia geral vs. anestesia combinada,  $p = 0,9756$ ).

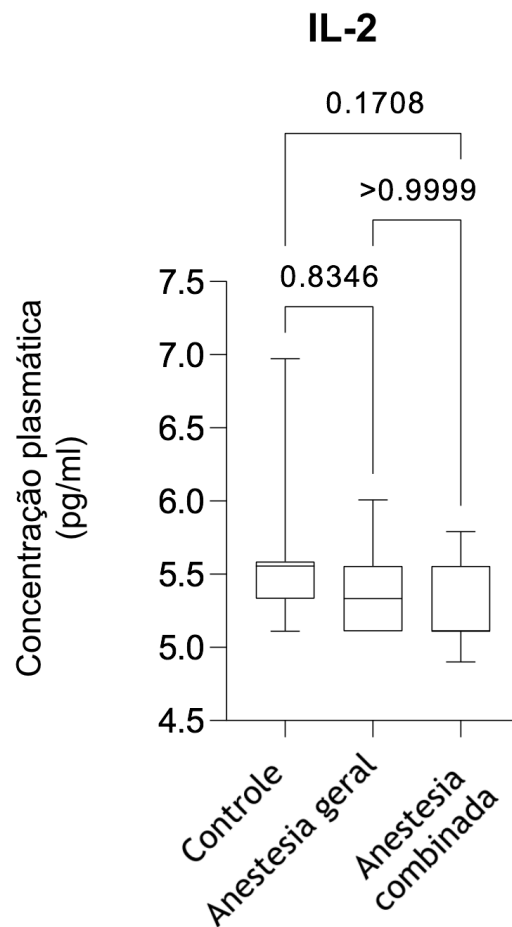


**Figura 21.** Comparação das concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  entre os grupos (pg/ml). Os valores de  $p$  entre os grupos estão indicados sobre as caixas e foram calculados pelo teste *post-hoc* de Dunn.



#### 4.2.3.6 Interleucina 2

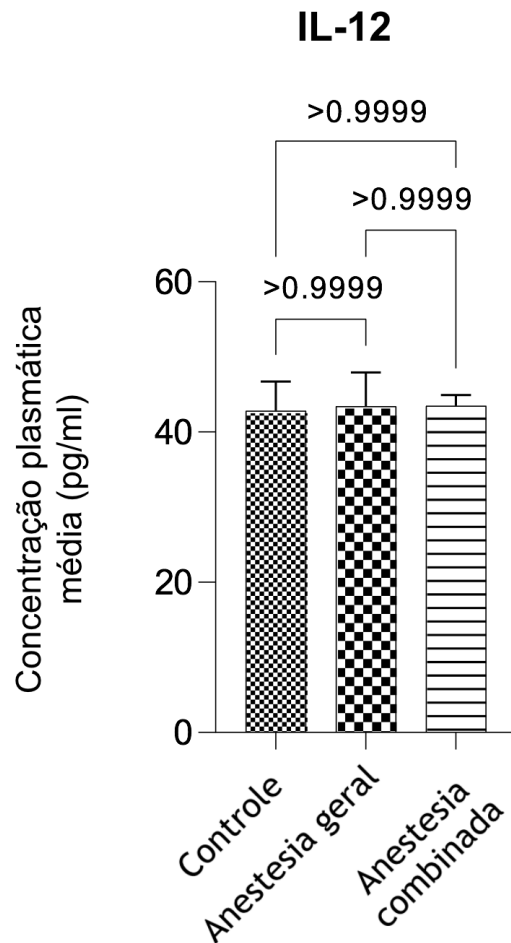
Os níveis de IL-2 no plasma dos camundongos não apresentaram variações significativas entre os grupos [controle 5,56 (6,97; 5,11); anestesia geral 5,33 (6,01; 5,11); anestesia combinada 5,11 (5,790; 4,90)], como mostra a figura 22 (controle vs. anestesia geral,  $p = 0,8346$ , e controle vs. anestesia combinada,  $p = 0,1708$ , e anestesia geral vs. anestesia combinada,  $p > 0,9999$ ) (figura 17).



**Figura 22.** Comparação das concentrações plasmáticas de IL-2 entre os grupos (pg/ml). Os valores de  $p$  entre os grupos estão indicados sobre as caixas e foram calculados pelo teste *post-hoc* de Dunn.

#### 4.2.3.7 Interleucina 12

Assim como na IL-2, os níveis plasmáticos de IL-12 também não apresentaram variações entre os grupos (controle,  $42,82 \pm 3,89$  pg/ml; morfina IP  $43,40 \pm 4,71$  pg/ml; raquianestesia  $43,50 \pm 1,49$  pg/ml) (controle vs. anestesia geral, controle vs. anestesia combinada e anestesia geral vs. anestesia combinada,  $p > 0,99$ ) (figura 23).



**Figura 23.** Comparação das concentrações plasmáticas médias de IL-12 entre os grupos (pg/ml). Os valores de  $p$  entre os grupos estão indicados sobre as linhas e foram calculados pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.



## **5. DISCUSSÃO**

Neste estudo foi testada a influência dos tipos de anestesia na modulação do estresse cirúrgico e suas possíveis consequências na disseminação de células tumorais após o ato operatório. Além disso, foi testado com sucesso um modelo de CaP heterotópico em camundongos NOD/SCID com o uso da linhagem celular originada de uma metástase óssea conjugada com o gene da luciferase para emissão de bioluminescência, a PC-3M-luc-C6. Esse modelo possibilita a avaliação da evolução tumoral de forma contínua, segura e com fácil reprodutibilidade. Diferente de outros métodos, como medidas de volume, tomografia e até o PET scan (*positrons emission tomography*), o sistema de bioluminescência *in vivo* traduz a atividade celular tumoral visto que a luz (dada em fótons por segundo) só é emitida por células viáveis e em atividade.

Os achados deste estudo sugerem que a quantidade de células tumorais na corrente sanguínea e o nível sérico de determinadas interleucinas podem ser alterados pela resposta neuroendócrina desencadeada após um trauma cirúrgico. A anestesia regional, no caso o bloqueio espinhal, pode atenuar essa resposta, reduzindo assim a liberação de células cancerígenas na corrente sanguínea no período pós-operatório. Esses resultados vão ao encontro de outros trabalhos prévios que investigaram outros tipos de tumores metastáticos em modelos animais <sup>76, 77</sup>.

Dados na literatura apontam que cirurgias oncológicas podem ser afetadas por muitos fatores, incluindo transfusão de sangue <sup>83</sup>, hipotermia <sup>84</sup>, quimioterapia <sup>85</sup>, estresse psicológico <sup>86</sup> e agentes anestésicos <sup>44, 87</sup>. No entanto, o trauma cirúrgico é geralmente considerado como tendo um papel maior do que os demais na alteração da resposta imune <sup>76</sup>. Levando em conta que as células NK representam uma população que reconhece e destrói espontaneamente as células cancerígenas e são especialmente importantes no controle de células tumorais circulantes e de micrometástases <sup>77, 88</sup>, foi optado por estudá-las como uma das variáveis neste trabalho.

Apesar de apresentar uma queda em relação aos grupos controle e anestesia combinada, a diferença do número de células NK medido por citometria de fluxo no sangue do grupo anestesia geral não foi estatisticamente significativa. Quando comparamos a quantidade de células NK nesses dois grupos com o grupo controle, também não foi possível observarmos uma diferença significativa (figura 14). A

supressão da atividade das células NK ocorre horas após a cirurgia, dura alguns dias e é diretamente proporcional à magnitude do procedimento <sup>89, 90</sup>. Sendo assim, uma redução na quantidade dessas células poderia ser esperada nos grupos de camundongos submetidos a cirurgia. Uma das possíveis justificativas para essa ausência de diferença estatística entre os grupos seria o fato de os animais NOD/SCID, imunodeprimidos, não apresentarem linfócitos T, uma célula que pode interagir, tanto diretamente quanto por meio de citocinas, com as células NK e promover sua proliferação <sup>91</sup>. A coleta do sangue 24h após as cirurgias também poderia contribuir para essas análises, pois a meia vida das células NK maduras no sangue de camundongos é de cerca de 7 a 10 dias <sup>92</sup> e o intervalo entre as cirurgias e a obtenção do sangue pode ter sido insuficiente para que houvesse uma queda impactante no número dessas células nos grupos submetidos a excisão tumoral.

O número de células tumorais, analisadas a partir da bioluminescência, não apresentou diferença significativa quando comparamos o grupo controle com os grupos submetidos a cirurgia. A manipulação cirúrgica de um tumor pode levar ao aumento de células tumorais na circulação sanguínea <sup>93</sup> e posteriormente a uma maior taxa de recorrência de doença em alguns tipos de cânceres <sup>94, 95</sup>. No entanto, esse aumento pós-operatório de células cancerígenas circulantes não foi observado em nossos resultados. Uma possível justificativa para essa observação seria o fato de os tumores usados em nosso modelo animal serem subcutâneos e, portanto, mais bem delimitados <sup>96</sup>. Por estarem mais isolados, esses tumores poderiam liberar menores quantidades de células na circulação durante a sua manipulação cirúrgica, tornando essas medições mais semelhantes às quantidades observadas no grupo controle. Ademais, o grupo controle permaneceu 24h a mais com os tumores nos camundongos. Apesar de ser um período curto, no nosso estudo realizado previamente com um grupo piloto, a partir da quinta semana após inoculação de células tumorais, os animais já apresentavam metástases que emitiam baixos sinais de bioluminescência. Sendo assim, essas 24h a mais com os tumores também podem ter aumentado o número de células tumorais no sangue dos animais do grupo controle. Por outro lado, quando foram comparados os grupos anestesia combinada e anestesia geral apenas, foi notada uma diferença considerável, sendo o grupo no qual foi administrada a raquianestesia o que apresentou menores quantidades de células tumorais no sangue. Esse achado contribui para a hipótese

de que a anestesia regional apresenta benefícios não só para o controle algico e para complicações perioperatórias, como também para o controle da disseminação de células tumorais no pós-operatório. Outros trabalhos semelhantes que usaram modelos tumorais metastáticos com injeção endovenosa de células cancerígenas, também mostraram redução da invasividade de células tumorais hepáticas e pulmonares após o uso de anestesia no neuroeixo <sup>76, 77</sup>.

Outro componente da resposta metabólica ao trauma cirúrgico levado em consideração neste trabalho diz respeito a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias. Essas citocinas podem prejudicar algumas das funções fisiológicas do organismo. A IL-6, por exemplo, desempenha um papel importante na determinação da resposta inflamatória local e sistêmica e é utilizada em muitos estudos como indicador de estresse cirúrgico <sup>51</sup>. Os níveis de IL-6 correlacionam-se ainda com a magnitude da lesão, a duração da cirurgia e o risco de complicações pós-operatórias <sup>97-99</sup>. Dados sobre anestesia regional e níveis de IL-6 no pós-operatório relatam que o manejo anestésico pode interferir na produção dessa citocina nesse período <sup>100, 101</sup>. Os resultados apresentados nesse estudo em relação a IL-6 estão de acordo com essas observações. No grupo em que foi realizada a cirurgia e a analgesia foi obtida apenas com morfina sistêmica, houve uma elevada produção desse mediador inflamatório, tanto em relação ao grupo controle, quanto em relação ao grupo com raquianestesia e ambas as comparações demonstraram significância estatística. O fato de os níveis de IL-6 também estarem elevados no grupo raquianestesia sugere ainda que o bloqueio espinhal reduz em parte, mas não totalmente, o estresse neuroendócrino <sup>49, 99</sup>.

Duas outras citocinas também apresentaram alterações nos grupos intervenção quando comparados com o grupo controle. A IL-4 possui uma grande capacidade de reprimir algumas funções de células NK *in vitro*, como a produção de citocinas ou sua citotoxicidade <sup>102</sup>. Foi ainda demonstrado que a IL-4 suprime o aumento da produção de citocinas inflamatórias (IFN- $\gamma$  e FNT- $\alpha$ , por exemplo) que é induzido após o tratamento com IL-12 em células NK humanas <sup>103</sup>. Da mesma forma, em células NK de camundongo, o tratamento com IL-4 resulta em uma diminuição na atividade de lise de células tumorais <sup>103</sup>. Em um estudo com animais, Salman-Ehr e colaboradores <sup>53</sup> demonstraram que a IL-4 é expressa durante o período inicial da cicatrização de feridas, mas a maior parte dessa citocina foi

encontrada em tecidos localizados próximos às lesões. De fato, a IL-4 possui propriedades anti-inflamatórias e exerce seus efeitos regenerativos diretamente nas células danificadas <sup>104, 105</sup>. Considerando o estado pró-inflamatório sistêmico imediatamente após a cirurgia e os efeitos localizados da IL-4, uma redução sanguínea na concentração dessa interleucina poderia ser esperada no pós-operatório. Um estudo de caso-controle em humanos que sofreram lesões cerebrais traumáticas também mostrou uma redução na IL-4 sérica pós-lesões <sup>106</sup>. Nossos resultados estão de acordo com esses achados. Por outro lado, não houve diferenças aparentes entre as quantidades dessa molécula nos grupos anestesia geral e anestesia combinada. Portanto, a anestesia combinada parece não ter efeito sobre a produção sistêmica dessa citocina em nosso modelo animal.

O FNT- $\alpha$  desempenha um papel crítico nos eventos iniciais e tardios envolvidos na inflamação, desde a localização do agente nocivo e amplificação das respostas celulares, até a apoptose de células danificadas <sup>98, 102</sup>. O FNT- $\alpha$  pode induzir a ativação das células NK e aumentar sua citotoxicidade <sup>107</sup>. Neste trabalho houve aumento nos níveis de FNT- $\alpha$  em todos os animais após a cirurgia, mas não encontramos uma diferença significativa entre os grupos anestesia geral e combinada. Além de ser um componente importante da defesa imunológica, o FNT- $\alpha$  desempenha um papel na síntese de colágeno e na cicatrização de feridas <sup>105</sup> e apresenta-se aumentado em estados pró-inflamatórios <sup>102, 108</sup>, o que está de acordo com nossos resultados pós-operatórios. No entanto, a expressão quase ubíqua de receptores de FNT- $\alpha$  em várias células, a sua produção por uma série de diferentes tipos celulares sob uma variedade de condições imunes e inflamatórias e a complexa interação entre esta e outras citocinas tornam a definição precisa do papel fisiológico do FNT- $\alpha$  uma tarefa difícil. Por isso, não está claro como a anestesia regional afetaria essa interleucina. Em um estudo com 32 pacientes que foram aleatoriamente designados para anestesia geral isolada ou anestesia geral combinada com bloqueio do nervo femoral para cirurgias de quadril, concentrações mais baixas de FNT- $\alpha$  foram observadas com o bloqueio anestésico do nervo femoral <sup>109</sup>. Os achados deste estudo sugerem que a anestesia regional pode atenuar a elevação pós-operatória dessa interleucina. Ao que tudo indica, o FNT- $\alpha$  parece estar aumentado de maneira geral em estados pró-inflamatórios <sup>102, 108</sup>, o que vai ao encontro com os resultados aqui obtidos.



O IFN- $\gamma$ , de maneira semelhante ao FNT- $\alpha$ , também apresenta múltiplas funções relacionadas ao sistema imune e está envolvido no aumento da atividade citotóxica das células NK <sup>108</sup>. Além disso, em situações nas quais a imunidade inata é estimulada, o IFN- $\gamma$  é liberado pelas próprias células NK <sup>110</sup>. Apesar de não ter apresentado significância estatística neste estudo, pode-se observar uma tendência ao aumento da quantidade de IFN- $\gamma$  após a cirurgia, maior em camundongos que receberam anestesia combinada, o que está de acordo com achados de Wada e colaboradores <sup>76</sup>. Indiretamente, a tendência ao aumento dessa molécula no grupo submetido a anestesia de neuroeixo poderia representar uma maior atividade das células NK nesses animais <sup>51</sup>.

A IL-10 mostrou-se aumentada de forma expressiva apenas no grupo com anestesia combinada. A IL-10 é considerada uma citocina imunossupressora, e sua capacidade de reduzir a inflamação e promover o reparo de lesões em locais periféricos está bem documentada <sup>111</sup>. Seguindo essa premissa, o fato dela estar aumentada no grupo citado contribui para a ideia de os bloqueios regionais diminuir a resposta inflamatória ao trauma. Apesar de ser considerada uma citocina imunossupressora, a IL-10 não inibe as funções das células NK <sup>112</sup>. Sendo assim, seu aumento no grupo submetido a anestesia combinada fala a favor de uma elevação da atividade anti-inflamatória nos animais que receberam raquianestesia.

Tanto a IL-2 quanto a IL-12 não apresentaram grandes diferenças entre os seus níveis plasmáticos nos três grupos. Os efeitos *in vitro* da IL-2 estão relacionados ao aumento da atividade de células NK citotóxicas, mas efeitos *in vivo* são difíceis de avaliar <sup>113</sup>. Aparentemente, a produção de IL-2 resulta principalmente da estimulação do sistema imunológico. Essa citocina pode, portanto, ter um papel importante para as células NK após um estímulo inflamatório <sup>114, 115</sup>, mas neste estudo não foi possível comprovar esse achado. A IL-12 foi outra citocina que também não apresentou alterações em suas quantidades nos três grupos estudados. O principal papel da IL-12 *in vivo* é induzir a produção de IFN- $\gamma$ , enquanto um efeito secundário foi descrito inicialmente na proliferação precoce e no desenvolvimento de citotoxicidade <sup>113</sup>. Sendo assim, seria esperado um aumento dessa molécula no grupo que recebeu anestesia combinada. Dados da literatura sobre o efeito da anestesia regional na IL-2 e IL-12 pós-operatória são contraditórios, com alguns relatando níveis aumentados com anestesia regional,

mas outros não <sup>116-118</sup>. Nossos resultados sugerem que a cirurgia e a anestesia regional não tenha influência sobre essas citocinas séricas em nosso modelo animal. Uma possível justificativa para essa observação poderia ser que essas duas interleucinas são amplamente produzidas por linfócitos T <sup>119</sup>, ausentes nos camundongos NOD/SCID, e por células apresentadoras de antígenos, que têm funções limitadas nestes animais.

Essas disfunções imunológicas constituem uma limitação importante deste estudo. Embora os múltiplos defeitos na imunidade inata e adaptativa nesses camundongos levem a baixa rejeição de xenoenxertos, eles também podem causar uma capacidade reduzida de produção de algumas citocinas. Como essa linhagem de camundongos não possui linfócitos T funcionais, as interleucinas produzidas por essas células ou por sua interação com outras células são as mais afetadas nessa situação.

O próprio modelo experimental murino também constitui uma limitação neste estudo. Apesar de ser um método facilmente reproduzível e capaz de liberar células tumorais humanas na corrente sanguínea dos animais <sup>74</sup>, o uso de xenoenxertos subcutâneos em camundongos não reproduz de maneira fiel o microambiente tumoral do CaP humano, o que pode interferir no processo de invasão das células cancerígenas <sup>120</sup>. Outra possível limitação neste estudo seria ainda a quantidade de animais nos grupos. A equação de recursos, utilizada para o cálculo de tamanho das amostras quando não há dados para realizar o cálculo estatístico do tamanho do efeito, pode superestimar esse valor e, conseqüentemente, aceitar valor menores de indivíduos por grupo <sup>121</sup>.

Os resultados obtidos neste estudo fornecem evidências que a raquianestesia combinada com anestesia geral pode reduzir a quantidade de células tumorais circulantes no sangue no período pós-operatório. Além disso, a alteração dos níveis séricos de IL-6 sugere que a anestesia combinada altere a resposta neuroendócrina ao trauma cirúrgico. No entanto, o significado clínico da atenuação da resposta fisiológica ao estresse cirúrgico no pós-operatório pela anestesia regional ainda não está claro e estudos clínicos controlados devem ser considerados. Até onde sabemos, o presente estudo fornece a primeira evidência experimental de que a anestesia regional pode reduzir a disseminação de células tumorais na corrente sanguínea no período pós-operatório no CaP.



## **6. CONCLUSÃO**

A combinação de anestesia geral com a raquianestesia reduziu o número de células tumorais circulantes no sangue dos animais que foram submetidos a cirurgia para exérese de tumores subcutâneos quando comparados com camundongos que receberam apenas anestesia geral 24h após o ato cirúrgico.

A IL-6 foi a citocina que apresentou maiores alterações em sua expressão no sangue dos animais entre os grupos que receberam anestesia geral e anestesia combinada, apresentando valores mais elevados nos camundongos que receberam apenas anestesia geral. As demais interleucinas e a quantidade de células NK no sangue não apresentaram mudanças significativas no seu padrão de expressão entre esses dois grupos estudados.

## **7. REFERÊNCIAS**

1. Brasil. Ministério da Saúde. Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro (RJ): Ministério da Saúde; 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/>
2. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol.* 2019;10(2):63-89.
3. U.S. Department of Health and Human Services NIOH, National Cancer Institute. U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Cancer Institute USA2020 [cited 2020]. Disponível em: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>.
4. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA.* 1999;281(17):1591-7.
5. Reddy S, Shapiro M, Morton R, Brawley OW. Prostate cancer in black and white Americans. *Cancer Metastasis Rev.* 2003;22(1):83-6.
6. Stocks T, Bjørge T, Ulmer H, Manjer J, Häggström C, Nagel G, et al. Metabolic risk score and cancer risk: pooled analysis of seven cohorts. *Int J Epidemiol.* 2015;44(4):1353-63.
7. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C, et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol.* 2016;69(3):428-35.
8. Berman DM, Epstein JI. When is prostate cancer really cancer? *Urol Clin North Am.* 2014;41(2):339-46.
9. Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU Int.* 2013;111(5):753-60.
10. Bolla M, Maingon P, Carrie C, Villa S, Kitsios P, Poortmans PM, et al. Short Androgen Suppression and Radiation Dose Escalation for Intermediate- and High-Risk Localized Prostate Cancer: Results of EORTC Trial 22991. *J Clin Oncol.* 2016;34(15):1748-56.
11. Bubendorf L, Schöpfer A, Wagner U, Sauter G, Moch H, Willi N, et al. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol.* 2000;31(5):578-83.

12. Young HH. The early diagnosis and radical cure of carcinoma of the prostate. Being a study of 40 cases and presentation of a radical operation which was carried out in four cases. 1905. *J Urol.* 2002;168(3):914-21.
13. Lepor H. A review of surgical techniques for radical prostatectomy. *Rev Urol.* 2005;7 Suppl 2:S11-7.
14. Walsh PC, Lepor H, Eggleston JC. Radical prostatectomy with preservation of sexual function: anatomical and pathological considerations. *Prostate.* 1983;4(5):473-85.
15. Walsh PC. The discovery of the cavernous nerves and development of nerve sparing radical retropubic prostatectomy. *J Urol.* 2007;177(5):1632-5.
16. Ghavamian R, Knoll A, Boczko J, Melman A. Comparison of operative and functional outcomes of laparoscopic radical prostatectomy and radical retropubic prostatectomy: single surgeon experience. *Urology.* 2006;67(6):1241-6.
17. Bivalacqua TJ, Pierorazio PM, Su LM. Open, laparoscopic and robotic radical prostatectomy: optimizing the surgical approach. *Surg Oncol.* 2009;18(3):233-41.
18. Braz LG, Braz JRC, Modolo MP, Corrente JE, Sanchez R, Pacchioni M, et al. Perioperative and anesthesia-related cardiac arrest and mortality rates in Brazil: A systematic review and proportion meta-analysis. *PLoS One.* 2020;15(11):e0241751.
19. Robinson DH, Toledo AH. Historical development of modern anesthesia. *J Invest Surg.* 2012;25(3):141-9.
20. Sprigge JS. Sir Humphry Davy; his researches in respiratory physiology and his debt to Antoine Lavoisier. *Anaesthesia.* 2002;57(4):357-64.
21. Corssen G, Domino EF. Dissociative anesthesia: further pharmacologic studies and first clinical experience with the phencyclidine derivative CI-581. *Anesth Analg.* 1966;45(1):29-40.
22. GODEFROI EF, JANSSEN PA, VANDEREYCKEN CA, VANHEERTUM AH, NIEMEGEERS CJ. DL-1-(1-ARYLALKYL)IMIDAZOLE-5-CARBOXYLATE ESTERS. A NOVEL TYPE OF HYPNOTIC AGENTS. *J Med Chem.* 1965;8:220-3.



23. James R, Glen JB. Synthesis, biological evaluation, and preliminary structure-activity considerations of a series of alkylphenols as intravenous anesthetic agents. *J Med Chem.* 1980;23(12):1350-7.
24. Miller RD. *Miller's Anesthesia*. 8th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier; 2015.
25. Matic AA. An Anesthesiologist's Perspective on the History of Basic Airway Management: The "Progressive" Era, 1904 to 1960. *Anesthesiology.* 2018;128(2):254-71.
26. Gutstein HB, Akil H. Opioid analgesics. In: Hardman JG, Limbird LE, editors. *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th ed. New York: McGraw-Hill; 2001:569–619
27. FOLDES FF, MCNALL PG, BORREGO-HINOJOSA JM. Succinylcholine: a new approach to muscular relaxation in anesthesiology. *N Engl J Med.* 1952;247(16):596-600.
28. Calatayud J, González A. History of the development and evolution of local anesthesia since the coca leaf. *Anesthesiology.* 2003;98(6):1503-8
29. Fink BR. Leaves and needles: the introduction of surgical local anesthesia. *Anesthesiology.* 1985;63(1):77-83.
30. López-Valverde A, De Vicente J, Cutando A. The surgeons Halsted and Hall, cocaine and the discovery of dental anaesthesia by nerve blocking. *Br Dent J.* 2011;211(10):485-7.
31. Wulf HF. The centennial of spinal anesthesia. *Anesthesiology.* 1998;89(2):500-6.
32. Larson MD. Tait and Cagliari. The first spinal anesthetic in America. *Anesthesiology.* 1996;85(4):913-9.
33. Rigg JR, Jamrozik K, Myles PS, Silbert BS, Peyton PJ, Parsons RW, et al. Epidural anaesthesia and analgesia and outcome of major surgery: a randomised trial. *Lancet.* 2002;359(9314):1276-82.
34. Nimmo SM. Benefit and outcome after epidural analgesia. 2 ed. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 2004. p. 44 - 7.
35. Wink J, Veering BT, Aarts LPHJ, Wouters PF. Effects of Thoracic Epidural Anesthesia on Neuronal Cardiac Regulation and Cardiac Function. *Anesthesiology.* 2019;130(3):472-91.

36. Zoumprouli A, Chatzimichali A, Papadimitriou S, Papaioannou A, Xynos E, Askitopoulou H. Gastrointestinal motility following thoracic surgery: the effect of thoracic epidural analgesia. A randomised controlled trial. *BMC Anesthesiol.* 2017;17(1):139.
37. Rodgers A, Walker N, Schug S, McKee A, Kehlet H, van Zundert A, et al. Reduction of postoperative mortality and morbidity with epidural or spinal anaesthesia: results from overview of randomised trials. *BMJ.* 2000;321(7275):1493.
38. Wijeyesundera DN, Beattie WS, Austin PC, Hux JE, Laupacis A. Epidural anaesthesia and survival after intermediate-to-high risk non-cardiac surgery: a population-based cohort study. *Lancet.* 2008;372(9638):562-9.
39. Bignami E, Landoni G, Biondi-Zoccai GG, Boroli F, Messina M, Dedola E, et al. Epidural analgesia improves outcome in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2010;24(4):586-97.
40. Pöpping DM, Elia N, Marret E, Remy C, Tramèr MR. Protective effects of epidural analgesia on pulmonary complications after abdominal and thoracic surgery: a meta-analysis. *Arch Surg.* 2008;143(10):990-9; discussion 1000.
41. Wu CL, Sapirstein A, Herbert R, Rowlingson AJ, Michaels RK, Petrovic MA, et al. Effect of postoperative epidural analgesia on morbidity and mortality after lung resection in Medicare patients. *J Clin Anesth.* 2006;18(7):515-20.
42. Stundner O, Chiu YL, Sun X, Mazumdar M, Fleischut P, Poultides L, et al. Comparative perioperative outcomes associated with neuraxial versus general anesthesia for simultaneous bilateral total knee arthroplasty. *Reg Anesth Pain Med.* 2012;37(6):638-44.
43. Freise H, Van Aken HK. Risks and benefits of thoracic epidural anaesthesia. *Br J Anaesth.* 2011;107(6):859-68.
44. Snyder GL, Greenberg S. Effect of anaesthetic technique and other perioperative factors on cancer recurrence. *Br J Anaesth.* 2010;105(2):106-15.
45. Biki B, Mascha E, Moriarty DC, Fitzpatrick JM, Sessler DI, Buggy DJ. Anesthetic technique for radical prostatectomy surgery affects cancer recurrence: a retrospective analysis. *Anesthesiology.* 2008;109(2):180-7.

46. Wuethrich PY, Hsu Schmitz SF, Kessler TM, Thalmann GN, Studer UE, Stueber F, et al. Potential influence of the anesthetic technique used during open radical prostatectomy on prostate cancer-related outcome: a retrospective study. *Anesthesiology*. 2010;113(3):570-6.
47. Gupta A, Björnsson A, Fredriksson M, Hallböök O, Eintrei C. Reduction in mortality after epidural anaesthesia and analgesia in patients undergoing rectal but not colonic cancer surgery: a retrospective analysis of data from 655 patients in central Sweden. *Br J Anaesth*. 2011;107(2):164-70.
48. de Oliveira GS, Ahmad S, Schink JC, Singh DK, Fitzgerald PC, McCarthy RJ. Intraoperative neuraxial anesthesia but not postoperative neuraxial analgesia is associated with increased relapse-free survival in ovarian cancer patients after primary cytoreductive surgery. *Reg Anesth Pain Med*. 2011;36(3):271-7.
49. Toft P, Tønnesen E. The systemic inflammatory response to anaesthesia and surgery. 5 - 6 ed. *Current Anaesthesia & Critical Care* 2008. p. 349 - 53.
50. Preiser JC, Ichai C, Orban JC, Groeneveld AB. Metabolic response to the stress of critical illness. *Br J Anaesth*. 2014;113(6):945-54.
51. Angka L, Khan ST, Kilgour MK, Xu R, Kennedy MA, Auer RC. Dysfunctional Natural Killer Cells in the Aftermath of Cancer Surgery. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8).
52. Alazawi W, Pirmadjid N, Lahiri R, Bhattacharya S. Inflammatory and Immune Responses to Surgery and Their Clinical Impact. *Ann Surg*. 2016;264(1):73-80.
53. Salmon-Ehr V, Ramont L, Godeau G, Birembaut P, Guenounou M, Bernard P, et al. Implication of interleukin-4 in wound healing. *Lab Invest*. 2000;80(8):1337-43.
54. Walker WS, Leaver HA. Immunologic and stress responses following video-assisted thoracic surgery and open pulmonary lobectomy in early stage lung cancer. *Thorac Surg Clin*. 2007;17(2):241-9, ix.
55. Hietbrink F, Koenderman L, Rijkers G, Leenen L. Trauma: the role of the innate immune system. *World J Emerg Surg*. 2006;1:15.
56. Lusty AJ, Hosier GW, Koti M, Chenard S, Mizubuti GB, Jaeger M, et al. Anesthetic technique and oncological outcomes in urology: A clinical practice review. *Urol Oncol*. 2019;37(12):845-52.

57. Woods GM, Griffiths DM. Reversible inhibition of natural killer cell activity by volatile anaesthetic agents in vitro. *Br J Anaesth.* 1986;58(5):535-9.
58. Brand JM, Kirchner H, Poppe C, Schmucker P. The effects of general anesthesia on human peripheral immune cell distribution and cytokine production. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997;83(2):190-4.
59. Lee JH, Kang SH, Kim Y, Kim HA, Kim BS. Effects of propofol-based total intravenous anesthesia on recurrence and overall survival in patients after modified radical mastectomy: a retrospective study. *Korean J Anesthesiol.* 2016;69(2):126-32.
60. Wigmore TJ, Mohammed K, Jhanji S. Long-term Survival for Patients Undergoing Volatile versus IV Anesthesia for Cancer Surgery: A Retrospective Analysis. *Anesthesiology.* 2016;124(1):69-79.
61. Cho JS, Lee MH, Kim SI, Park S, Park HS, Oh E, et al. The Effects of Perioperative Anesthesia and Analgesia on Immune Function in Patients Undergoing Breast Cancer Resection: A Prospective Randomized Study. *Int J Med Sci.* 2017;14(10):970-6.
62. Yap A, Lopez-Olivo MA, Dubowitz J, Hiller J, Riedel B, Group GO-ARC. Anesthetic technique and cancer outcomes: a meta-analysis of total intravenous versus volatile anesthesia. *Can J Anaesth.* 2019;66(5):546-61.
63. Exadaktylos AK, Buggy DJ, Moriarty DC, Mascha E, Sessler DI. Can anesthetic technique for primary breast cancer surgery affect recurrence or metastasis? *Anesthesiology.* 2006;105(4):660-4.
64. Cata JP, Keerty V, Keerty D, Feng L, Norman PH, Gottumukkala V, et al. A retrospective analysis of the effect of intraoperative opioid dose on cancer recurrence after non-small cell lung cancer resection. *Cancer Med.* 2014;3(4):900-8.
65. Sessler DI, Pei L, Huang Y, Fleischmann E, Marhofer P, Kurz A, et al. Recurrence of breast cancer after regional or general anaesthesia: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2019;394(10211):1807-15.
66. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature.* 1983;301(5900):527-30.

67. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol.* 1995;154(1):180-91.
68. Bastide C, Bagnis C, Mannoni P, Hassoun J, Bladou F. A Nod Scid mouse model to study human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2002;5(4):311-5.
69. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.* 1979;17(1):16-23.
70. Pettaway CA, Pathak S, Greene G, Ramirez E, Wilson MR, Killion JJ, et al. Selection of highly metastatic variants of different human prostatic carcinomas using orthotopic implantation in nude mice. *Clin Cancer Res.* 1996;2(9):1627-36.
71. Wu X, Gong S, Roy-Burman P, Lee P, Culig Z. Current mouse and cell models in prostate cancer research. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20(4):R155-70.
72. Jenkins DE, Yu SF, Hornig YS, Purchio T, Contag PR. In vivo monitoring of tumor relapse and metastasis using bioluminescent PC-3M-luc-C6 cells in murine models of human prostate cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2003;20(8):745-56.
73. Cifuentes FF, Valenzuela RH, Contreras HR, Castellón EA. Development of an orthotopic model of human metastatic prostate cancer in the NOD-SCIDy mouse (*Oncol Lett.* 2015;10(4):2142-8.
74. Pang K, Xie C, Yang Z, Suo Y, Zhu X, Wei D, et al. Monitoring circulating prostate cancer cells by in vivo flow cytometry assesses androgen deprivation therapy on metastasis. *Cytometry A.* 2018;93(5):517-24.
75. Rocha GZ, Dias MM, Ropelle ER, Osório-Costa F, Rossato FA, Vercesi AE, et al. Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth. *Clin Cancer Res.* 2011;17(12):3993-4005.
76. Wada H, Seki S, Takahashi T, Kawarabayashi N, Higuchi H, Habu Y, et al. Combined spinal and general anesthesia attenuates liver metastasis by preserving TH1/TH2 cytokine balance. *Anesthesiology.* 2007;106(3):499-506.

77. Bar-Yosef S, Melamed R, Page GG, Shakhar G, Shakhar K, Ben-Eliyahu S. Attenuation of the tumor-promoting effect of surgery by spinal blockade in rats. *Anesthesiology*. 2001;94(6):1066-73.
78. Mestre C, Péliissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1994;32(4):197-200.
79. Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol*. 1980;67(2-3):313-6.
80. Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R. Blood sample collection in small laboratory animals. *J Pharmacol Pharmacother*. 2010;1(2):87-93.
81. Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample Size Calculation in Animal Studies Using Resource Equation Approach. *Malays J Med Sci*. 2017;24(5):101-5.
82. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother*. 2013;4(4):303-6.
83. Faenza A, Cunsolo A, Selleri S, Lucarelli S, Farneti PA, Gozzetti G. Correlation between plasma or blood transfusion and survival after curative surgery for colorectal cancer. *Int Surg*. 1992;77(4):264-9.
84. Beilin B, Shavit Y, Razumovsky J, Wolloch Y, Zeidel A, Bessler H. Effects of mild perioperative hypothermia on cellular immune responses. *Anesthesiology*. 1998;89(5):1133-40.
85. Pollock RE, Lotzová E, Stanford SD. Mechanism of surgical stress impairment of human perioperative natural killer cell cytotoxicity. *Arch Surg*. 1991;126(3):338-42.
86. Glaser R, Rabin B, Chesney M, Cohen S, Natelson B. Stress-induced immunomodulation: implications for infectious diseases? *JAMA*. 1999;281(24):2268-70.
87. Page GG, Blakely WP, Ben-Eliyahu S. Evidence that postoperative pain is a mediator of the tumor-promoting effects of surgery in rats. *Pain*. 2001;90(1-2):191-9.
88. Whiteside TL, Herberman RB. The role of natural killer cells in human disease. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989;53(1):1-23.

89. Angka L, Martel AB, Kilgour M, Jeong A, Sadiq M, de Souza CT, et al. Natural Killer Cell IFN $\gamma$  Secretion is Profoundly Suppressed Following Colorectal Cancer Surgery. *Ann Surg Oncol*. 2018;25(12):3747-54.
90. Shi L, Guo H, Zheng Z, Liu J, Jiang Y, Su Y. Laparoscopic Surgery Versus Open Surgery for Colorectal Cancer: Impacts on Natural Killer Cells. *Cancer Control*. 2020;27(1):1073274820906811.
91. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008;9(5):503-10.
92. Zhang Y, Wallace DL, de Lara CM, Ghattas H, Asquith B, Worth A, et al. In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology*. 2007;121(2):258-65.
93. Sawabata N, Nakamura T, Kawaguchi T, Watanabe T, Ouji NS, Ito T, et al. Circulating tumor cells detected only after surgery for non-small cell lung cancer: is it a predictor of recurrence? *J Thorac Dis*. 2020;12(9):4623-32.
94. Bissolati M, Sandri MT, Burtulo G, Zorzino L, Balzano G, Braga M. Portal vein-circulating tumor cells predict liver metastases in patients with resectable pancreatic cancer. *Tumour Biol*. 2015;36(2):991-6.
95. Park Y, Jun HR, Choi HW, Hwang DW, Lee JH, Song KB, et al. Circulating tumour cells as an indicator of early and systemic recurrence after surgical resection in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep*. 2021;11(1):1644
96. Cunningham D, You Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods*. 2015;2(1).
97. Shenkin A, Fraser WD, Series J, Winstanley FP, McCartney AC, Burns HJ, et al. The serum interleukin 6 response to elective surgery. *Lymphokine Res*. 1989;8(2):123-7.
98. Mokart D, Capo C, Blache JL, Delpero JR, Houvenaeghel G, Martin C, et al. Early postoperative compensatory anti-inflammatory response syndrome is associated with septic complications after major surgical trauma in patients with cancer. *Br J Surg*. 2002;89(11):1450-6.
99. Jawa RS, Anillo S, Huntoon K, Baumann H, Kulaylat M. Interleukin-6 in surgery, trauma, and critical care part II: clinical implications. *J Intensive Care Med*. 2011;26(2):73-87.

100. Matsumoto M, Flores EM, Kimachi PP, Gouveia FV, Kuroki MA, Barros ACSD, et al. Benefits in radical mastectomy protocol: a randomized trial evaluating the use of regional anesthesia. *Sci Rep.* 2018;8(1):7815.
101. Liu L, Ni XX, Zhang LW, Zhao K, Xie H, Zhu J. Effects of ultrasound-guided erector spinae plane block on postoperative analgesia and plasma cytokine levels after uniportal VATS: a prospective randomized controlled trial. *J Anesth.* 2021;35(1):3-9.
102. Brady J, Carotta S, Thong RP, Chan CJ, Hayakawa Y, Smyth MJ, et al. The interactions of multiple cytokines control NK cell maturation. *J Immunol.* 2010;185(11):6679-88.
103. Marcenaro E, Della Chiesa M, Bellora F, Parolini S, Millo R, Moretta L, et al. IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. *J Immunol.* 2005;174(7):3992-8.
104. Pan D, Schellhardt L, Acevedo-Cintron JA, Hunter D, Snyder-Warwick AK, Mackinnon SE, et al. IL-4 expressing cells are recruited to nerve after injury and promote regeneration. *Exp Neurol.* 2022;347:113909.
105. Jayme TS, Leung G, Wang A, Workentine ML, Rajeev S, Shute A, et al. Human interleukin-4-treated regulatory macrophages promote epithelial wound healing and reduce colitis in a mouse model. *Sci Adv.* 2020;6(23):eaba4376.
106. Rusiecki J, Levin LI, Wang L, Byrne C, Krishnamurthy J, Chen L, et al. Blast traumatic brain injury and serum inflammatory cytokines: a repeated measures case-control study among U.S. military service members. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):20.
107. Almishri W, Santodomingo-Garzon T, Le T, Stack D, Mody CH, Swain MG. TNF $\alpha$  Augments Cytokine-Induced NK Cell IFN $\gamma$  Production through TNFR2. *J Innate Immun.* 2016;8(6):617-29.
108. Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD. Natural killer cell-produced IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induce target cell cytotoxicity through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol.* 2012;91(2):299-309.
109. Jang JS, Lee YH, Kandahar HK, Shrestha SK, Lee JS, Lee JK, et al. [Changes in the tumor necrosis factor- $\alpha$  level after an ultrasound-guided



- femoral nerve block in elderly patients with a hip fracture]. *Braz J Anesthesiol.* 2018;68(6):558-63.
- 110.Lee AJ, Mian F, Poznanski SM, Stackaruk M, Chan T, Chew MV, et al. Type I Interferon Receptor on NK Cells Negatively Regulates Interferon- $\gamma$  Production. *Front Immunol.* 2019;10:1261.
- 111.Burmeister AR, Marriott I. The Interleukin-10 Family of Cytokines and Their Role in the CNS. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:458.
- 112.Guillerey C, Huntington ND, Smyth MJ. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat Immunol.* 2016;17(9):1025-36.
- 113.Marçais A, Viel S, Grau M, Henry T, Marvel J, Walzer T. Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines. *Front Immunol.* 2013;4:450.
- 114.Bihl F, Pecheur J, Bréart B, Poupon G, Cazareth J, Julia V, et al. Primed antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells are required for NK cell activation in vivo upon *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 2010;185(4):2174-81.
- 115.Granucci F, Zanoni I, Pavelka N, Van Dommelen SL, Andoniou CE, Belardelli F, et al. A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. *J Exp Med.* 2004;200(3):287-95.
- 116.Žura M, Kozmar A, Šakić K, Malenica B, Hrgovic Z. Effect of spinal and general anesthesia on serum concentration of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Immunobiology.* 2012;217(6):622-7.
- 117.Mejía-Terrazas GE, Ruíz-Suárez M, Vadillo-Ortega F, Franco Y Bourland RE, López-Muñoz E. Effect of interscalene nerve block on the inflammatory response in shoulder surgery: a randomized trial. *J Shoulder Elbow Surg.* 2019;28(9):e291-e303.
- 118.Deegan CA, Murray D, Doran P, Moriarty DC, Sessler DI, Mascha E, et al. Anesthetic technique and the cytokine and matrix metalloproteinase response to primary breast cancer surgery. *Reg Anesth Pain Med.* 2010;35(6):490-5.
- 119.Deegan CA, Murray D, Doran P, Moriarty DC, Sessler DI, Mascha E, et al. Anesthetic technique and the cytokine and matrix metalloproteinase response to primary breast cancer surgery. *Reg Anesth Pain Med.* 2010;35(6):490-5.
- 120.Zhang W, Fan W, Rachagani S, Zhou Z, Lele SM, Batra SK, et al. Comparative Study of Subcutaneous and Orthotopic Mouse Models of

Prostate Cancer: Vascular Perfusion, Vasculature Density, Hypoxic Burden and BB2r-Targeting Efficacy. *Sci Rep.* 2019;9(1):11117.

121.Festing MF, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J.* 2002;43(4):244-58.



# APÊNDICES

## APÊNDICE A - Artigo científico publicado

Annals of Medicine and Surgery

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.103398>

Annals of Medicine and Surgery 75 (2022) 103398

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Annals of Medicine and Surgery

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/amsu](http://www.elsevier.com/locate/amsu)

Experimental Research

## Combined spinal and general anesthesia attenuate tumor promoting effects of surgery. An experimental animal study

Gustavo N.C. Inoue<sup>a,\*</sup>, Ruan Pimenta<sup>a</sup>, Juliana A. Camargo<sup>a</sup>, Nayara I. Viana<sup>a</sup>,  
Vanessa R. Guimarães<sup>a</sup>, Miguel Srougi<sup>a</sup>, William C. Nahas<sup>b</sup>, Katia R.M. Leite<sup>a</sup>, Sabrina T. Reis<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Medical Investigation (LIM55), Urology Department, University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, 01246-903, Brazil

<sup>b</sup> Uro-Oncology Group, Urology Department, University of Sao Paulo Medical School and Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Sao Paulo, 01246-000, Brazil



## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Anesthesia  
Spinal  
Prostatic neoplasms  
Neoplastic cells  
Circulating  
Cytokines  
Killer cells  
Natural

## ABSTRACT

**Background:** Radical prostatectomy, a standard management approach for localized Prostate Cancer (PC), may cause a stress response associated with immune modulating effects. Regional anesthesia was hypothesized to reduce the immune effects of surgery by minimizing the neuroendocrine surgical stress response, thus mitigating tumor cells dissemination. Our primary objective was to investigate whether the use of spinal blocks attenuates PC tumor cells dissemination on an animal model. We also assessed the number of circulating NK cells and the amount of inflammatory and anti-inflammatory cytokines.

**Materials and methods:** A subcutaneous tumor model, with PC-3M cell line transfected with a luciferase-producing gene (PC-3M-luc-C6) was used. After proper tumor establishment and before tumors became metastatic, animals were submitted to tumor excision surgeries under general or combined (general and spinal) anesthesia. A control group was only anesthetized with general anesthesia.

**Results:** The subcutaneous tumor model with PC-3M-luc-C6 cells was effective in causing distant metastasis after 35 days. The number of circulating tumor cells increased in animals that underwent surgery under general anesthesia alone compared to the group submitted to combined anesthesia. Interleukin 6 levels were different in all groups, with increase in the general anesthesia group.

**Conclusion:** Our results suggest that combination of spinal and general anesthesia may attenuate the suppression of innate tumor immunity and it might be related to a reduction in the neuroendocrine response to surgery.

**Institutional protocol number:** Animal Ethics Committee 1332/2019.

## 1. Introduction

Mortality from Prostate Cancer (PC) is usually attributable to distant organ metastasis despite surgical resection with curative intent. Surgical resection is the primary definitive treatment for localized PC, but minimal residual disease in the form of microscopic foci not removed by radical surgery may be unavoidable in some patients [1]. Whether these residual cells result in clinical relapse is a function of host defense and tumor survival and growth [2].

At least two major factors shift the balance towards dissemination of minimal residual disease during the perioperative phase. First, local

tissue damage can activate the sympathetic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis with subsequent releases of catecholamines and glucocorticoids, both with immunomodulating effects that can last for several days [3]. Imbalance between pro and anti-inflammatory cytokines results in decreased number of circulating natural killer (NK) cells, cytotoxic T lymphocytes, dendritic cells and T helper cells after major surgeries [2,4,5]. Second, drugs used in anesthesia, such as opioids and volatile agents, may suppress cell mediated and humoral immunity on host defenses [1,2] and promote tumor growth in animal models [4–6].

Regional anesthesia, including epidural and spinal block, attenuates

**Abbreviations:** ANOVA, analysis of variance; ICTC, circulating tumor cells; IFN, interferon; IL, interleukin; IVIS, In Vivo Imaging System; FC, flow cytometry; NK, natural killer; NOD/SCID, non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency; PC, prostate cancer; SD, standard deviation; TNF, tumor necrosis factor.

\* Corresponding author. Medical Investigation Laboratory (LIM55), Urology Department, University of Sao Paulo Medical School (FMUSP), Sao Paulo, Brazil, Av. Dr. Arnaldo 455, 2nd floor, room 2145, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, 01246-903, Brazil.

E-mail address: [gustavo.inoue@usp.br](mailto:gustavo.inoue@usp.br) (G.N.C. Inoue).

<https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.103398>

Received 12 February 2022; Accepted 21 February 2022

Available online 24 February 2022

2049-0801/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of IJS Publishing Group Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**ANEXOS**

## ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética no Uso dos Animais



A **CEUA** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 26/04/19 **APROVOU o documento** abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº **1107/18** intitulado “**ANÁLISE DE ANESTESIA DO NEUROEIXO COM O PROGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA.**” apresentado pelo Departamento de Cirurgia

- Inclusão do aluno Gustavo Noboru Cavallari como pesquisador executante.

Pesquisador Responsável: **Profa. Dra. Sabrina T. Reis**

CEUA-FMUSP, 26 de Abril de 2019

Dr. Eduardo Pompeu  
Coordenador  
Comissão de Ética no Uso de Animais