

# Avaliação do sobrenadante da cultura de queratinócitos ou fibroblastos em modelo de hiperalgisia inflamatória

*Evaluation of the keratinocytes or fibroblasts culture supernatant in an inflammatory hyperalgisia model*

Cíntia Ávila Souza<sup>1,2</sup>, Gilson Gonçalves dos Santos<sup>1</sup>, Felipe Hertzing Farias<sup>1</sup>, Eli Ávila Souza Júnior<sup>3</sup>, Carlos Amilcar Parada<sup>1</sup>

DOI 10.5935/2595-0118.20200038

## RESUMO

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:** A inflamação é uma resposta de defesa do organismo a uma lesão celular causada por agentes físicos, químicos ou biológicos, a qual desencadeia, entre outros fatores, a dor. Apesar da inflamação possuir um importante papel na proteção e regeneração da lesão tecidual, a dor inflamatória culmina na diminuição da qualidade de vida. Diante disso, é de grande importância o desenvolvimento de formas seguras e menos invasivas para o tratamento da dor inflamatória. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial anti-hiperalgésico do sobrenadante de cultura de queratinócitos e fibroblastos humanos em modelo experimental de hiperalgisia inflamatória.

**MÉTODOS:** Avaliação da hiperalgisia inflamatória induzida por carragenina através do uso de von Frey eletrônico em modelos animais tratados com sobrenadante de cultura de queratinócitos e fibroblastos.

**RESULTADOS:** Observou-se que a administração local de naloxona, antagonista opioide não seletivo, em tecido periférico inibiu o efeito anti-hiperalgésico do sobrenadante da cultura de queratinócitos. Sobrenadante de cultura de fibroblastos dos dias 1 e 3 reverte por 2h a hiperalgisia inflamatória induzida por carragenina, sendo esta mediada por agonista  $\mu$  opioide.

**CONCLUSÃO:** Este estudo indicou que sobrenadante de cultura de fibroblastos e queratinócitos foi capaz de induzir antinocicepção em hiperalgisia inflamatória, mediada pela liberação

de opioides endógenos. Além disso, foi observado que o efeito analgésico do sobrenadante de cultura de fibroblastos é mediado especificamente por agonista  $\mu$  opioide, tendo uma duração de 2 horas.

**Descritores:** Analgesia, Fibroblastos, Pele, Queratinócitos, Sistema nervoso periférico.

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVES:** Inflammation is a defense response of the body to a cellular damage caused by physical, chemical, or biological agents, which triggers, among other factors, pain. Although inflammation plays an important role in the protection and regeneration of tissue injury, inflammatory pain results in decreased quality of life. In view of this, the development of safe and less invasive forms for the treatment of inflammatory pain is of great importance. The objective of this study was to evaluate the antihyperalgesic potential of the culture supernatant of keratinocytes and human fibroblasts in an experimental model of inflammatory hyperalgisia.

**METHODS:** Evaluation of carrageenan induced inflammatory hyperalgisia through the use of electronic von Frey in animal models treated with culture supernatant of keratinocytes and fibroblasts.

**RESULTS:** Local administration of naloxone, a nonselective opioid antagonist, in peripheral tissue, has been observed to inhibit the antihyperalgesic effect of the keratinocyte culture supernatant. Fibroblast culture supernatant on days 1 and 3 reverses for 2h the carrageenan induced inflammatory hyperalgisia, which is mediated by  $\mu$  opioid agonist.

**CONCLUSION:** This study indicates that culture supernatant of fibroblasts and keratinocytes is capable of inducing antinociception in inflammatory hyperalgisia, mediated by the release of endogenous opioids. In addition, it has been observed that the analgesic effect of the fibroblast culture supernatant is mediated specifically by the  $\mu$  opioid agonist, having a duration of 2 hours.

**Keywords:** Analgesia, Fibroblasts, Keratinocytes, Peripheral nervous system, Skin.

## INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta de defesa a uma lesão celular causada por agentes físicos, químicos ou biológicos<sup>1</sup>. O processo inflamatório é caracterizado por uma série de eventos inter-relacionados que procuram recuperar a integridade tecidual, entre os quais pode-se

Cíntia Ávila Souza – <https://orcid.org/0000-0001-8116-010X>;

Gilson Gonçalves dos Santos – <https://orcid.org/0000-0002-2704-3006>;

Felipe Hertzing Farias – <https://orcid.org/0000-0002-0521-9664>;

Eli Ávila Souza Júnior – <https://orcid.org/0000-0002-5054-874X>;

Carlos Amilcar Parada – <https://orcid.org/0000-0001-5209-8853>.

1. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Laboratório de Estudo da Dor, Campinas, SP, Brasil.

2. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Graduação em Medicina, Campinas, SP, Brasil.

3. Universidade Federal de Alfenas, Faculdade de Medicina, Alfenas, MG, Brasil.

Apresentado em 20 de fevereiro de 2020.

Aceito para publicação em 10 de maio de 2020.

Conflito de interesses: não há – Fontes de fomento: CNPq sob número 138343/2017-9.

### Endereço para correspondência:

Rua Jasmin, 190 – Chácara Primavera

13087-460 Campinas, SP, Brasil.

E-mail: [cintiaavilasouza@icloud.com](mailto:cintiaavilasouza@icloud.com) [cintia\\_avila\\_souza@hotmail.com](mailto:cintia_avila_souza@hotmail.com)

observar: aumento do fluxo sanguíneo para a região afetada, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de fluido, migração e acúmulo de células de defesa<sup>2</sup>. Como resultado, evidenciam-se sinais característicos de tal processo, denominados sinais cardinais: dor, tumor, rubor, perda de função e calor<sup>1-3</sup>.

Apesar de ser um importante mecanismo de alerta e proteção de uma possível lesão tecidual, a dor proporciona um sofrimento, que leva à diminuição da qualidade de vida<sup>4</sup>. Sabe-se que a percepção dolorosa é desencadeada pela ativação de células especializadas, denominadas nociceptores<sup>5</sup>. As terminações nervosas que detectam esse tipo de estímulo são as fibras Aδ e C. Enquanto as fibras Aδ são mielinizadas, com rápida transmissão do estímulo doloroso e, por isso, responsáveis pela fase aguda da dor, as fibras C, não mielinizadas e de velocidade de condução lenta, apresentam maior atuação na dor inflamatória e crônica<sup>6,7</sup>.

Durante o processo inflamatório, ocorre a liberação de substâncias algogênicas, que são capazes de sensibilizar os nociceptores, diminuindo o limiar de excitabilidade. Entre elas, podem ser citadas: acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, leucotrieno, substância P, entre outras<sup>8</sup>. A persistência da inflamação leva a mudanças no sistema nervoso periférico, onde haverá uma exacerbação da resposta ao estímulo doloroso, conhecida como hiperalgesia<sup>9</sup>.

Diante disso, mecanismos endógenos que contrabalançam as alterações de origem inflamatória desencadeadas pela lesão inicial são liberados visando sua regulação. Um exemplo característico é a liberação de opioides endógenos e peptídeos derivados de precursores proteicos sintetizados por células sinoviais, mastócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos e células da pele, como queratinócitos e fibroblastos que migraram para os locais de lesão<sup>9-12</sup>. Outro exemplo é o aumento da expressão de receptores em neurônios sensoriais periféricos e a ruptura da barreira perineural, facilitando a interação dos opioides e seus receptores<sup>13</sup>.

Na literatura são descritas três famílias de opioides endógenos: as endorfinas (derivadas da proopiomelanocortina – POMC), as encefalinas (derivadas da proencefalina – PENK) e as dinorfinas (derivadas da prodinorfina)<sup>14</sup>. Cada uma apresenta especificidades com diferentes receptores de opioides:  $\mu$  (endorfina e encefalina),  $\delta$  (encefalina e endorfina) e  $\kappa$  (dinorfina)<sup>12,15</sup>.

A produção de opioides endógenos é conhecidamente realizada por células do sistema imune<sup>11,16</sup>. Contudo, estudos demonstram sua produção também em queratinócitos e fibroblastos<sup>17-22</sup>. Autores observaram que fibroblastos e queratinócitos expressam RNA mensageiro funcional de proencefalina (PENK), estando aptas a sintetizar e secretar peptídeos derivados de PENK, como as encefalinas<sup>21</sup>. A liberação de fatores inflamatórios, principalmente interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), induz a expressão e liberação de opioides endógenos, que, uma vez ligados aos receptores das fibras nervosas periféricas, desencadeiam o aumento das correntes de potássio e a diminuição das correntes de cálcio nos corpos dos neurônios sensoriais, inibindo o disparo neuronal e a liberação do transmissor<sup>23,24</sup>.

Considerando que a hiperalgesia inflamatória desencadeia aspectos negativos em esferas emocionais e físicas comprometendo a qualidade de vida<sup>3</sup>, é de grande importância o desenvolvimento de formas seguras de tratamento. Opioides exógenos ainda são as opções mais utilizados no tratamento de diferentes estímulos algéscicos<sup>25</sup>. No entanto, importantes efeitos adversos associados a essas opções farma-

cológicas continuam a ser uma grande desvantagem ao seu uso<sup>26-28</sup>. A relação direta entre sistema nervoso periférico, queratinócitos e fibroblastos evidencia-se como fato promissor na busca por diferentes formas seguras de analgesia, sobretudo por se tratar de uma ação local. Dessa forma, o presente estudo avaliou o potencial anti-hiperalgésico do sobrenadante de cultura de queratinócitos e fibroblastos humanos em modelo experimental de hiperalgesia inflamatória.

## MÉTODOS

Foram utilizados 72 ratos Wistar machos com 6 a 8 semanas de idade (200-250g), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB). Os animais foram acondicionados em gaiolas apropriadas contendo 4 animais/caixa, permanecendo em estantes ventiladas com temperatura e umidade controladas (22°C e 55%, respectivamente) com ciclo claro/escuro de 12h. Os animais receberam água e ração *ad libitum* no decorrer de toda pesquisa. Os animais foram divididos aleatoriamente nos grupos. Após o estudo, os animais foram anestesiados e, em seguida, eutanasiados por decapitação. O tamanho do grupo (n) para cada grupo experimental é apresentado a seguir:

### Processamento do material biológico (pele)

Os fragmentos de pele humana provenientes de blefaroplastias de indivíduos saudáveis realizadas pela equipe da Plástica Oftalmológica do Hospital de Clínicas da universidade em questão foram encaminhadas ao Laboratório de Cultivo de Células da Pele sob o número de protocolo 16013-2/2016 e processados em área estéril, sala limpa classe ISO 7, descartado o tecido adiposo, colocado sobre uma placa de Petri e dividido em duas porções, sendo que uma delas foi congelada em freezer -80°C. A outra foi seccionada em fragmentos de 2 a 3mm, utilizando instrumento cirúrgico sob fluxo laminar, de modo a manter todo o procedimento estéril. Os fragmentos menores de pele foram submetidos ao tratamento enzimático com 10mL de solução de tripsina a 0,25% e 1mM de ácido etilenodiaminotetracético com a epiderme sempre voltada para cima, e incubados a 37°C, com tensão de 5% de CO<sub>2</sub> por quatro horas, resultando na separação da epiderme da derme.

### Isolamento e cultivo de fibroblastos

Transcorrida a incubação dos fragmentos, a tripsina foi inativada com o mesmo volume de meio de cultura e os fragmentos da derme foram colocados em um frasco de cultura com meio para fibroblastos M199, suplementado com L-glutamina 2mM, penicilina 100UI/mL, estreptomicina 0,1mg/mL e 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram nutridas, trocando o meio de cultura a cada três dias. Quando estas células obtiveram confluência de 90%, aproximadamente 7 dias após início do cultivo, foi feito o repique com auxílio de solução de tripsina a 0,25% e 1mM de ácido etilenodiaminotetracético. As células foram utilizadas entre 2-3ª passagens. No momento da utilização os fibroblastos obtidos foram lavados três vezes com solução de Hank's.

### Isolamento e cultivo de queratinócitos

Após a separação da epiderme, a tripsina foi neutralizada utilizando o mesmo volume de meio de cultura específico para querati-

nócitos. A suspensão celular obtida foi filtrada em filtro de nylon de 40µm e centrifugada a 1200rpm e 4°C durante 10 minutos. O “pool” de células obtidos, constituído por queratinócitos e melanócitos, foi contado e plaqueado em frascos de cultura, com 1x10<sup>5</sup> células por cm<sup>2</sup>, incubados a 37°C, com 5% de tensão de CO<sub>2</sub>, em meio de cultura específico para queratinócitos, complementado com L-glutamina 2mM/mL, penicilina 100UI/mL e estreptomina 0,1mg/mL. A cultura primária de queratinócitos foi obtida a partir da adesão das células aos frascos de cultura que ocorreu em aproximadamente 48h. As células foram nutridas trocando o meio de cultura a cada três dias. O repique foi realizado em aproximadamente 7 dias, quando as células atingiram 90% de confluência e foram utilizadas na segunda passagem.

### Fármacos

Para indução da hiperalgesia inflamatória foi utilizado carragenina a 100µg/50µL/pata (Sigma). A administração de carragenina (100µg/50µL) no tecido subcutâneo da pata traseira induz hiperalgesia inflamatória por 6h, cujo pico da dor ocorre na terceira hora<sup>31</sup>.

Os antagonistas seletivos dos receptores opioides utilizados foram: CTOP (Sigma Aldrich/ P5296, antagonista da subunidade µ), Nor-BNI (Norbinaltorphimine/Sigma Aldrich; antagonista da subunidade kappa) e N115 (Naltrindole/ HCL – Sigma Aldrich; antagonista da subunidade delta). O antagonista não seletivo de receptor opioide utilizado foi a naloxona (nalo, Sigma Aldrich).

### Injeção intraplantar de fármacos

A administração de fármacos pela via intraplantar (i.p.l.) foi realizada através da utilização de uma agulha hipodérmica BD Ultra-Fine® (29G), a qual foi inserida após antisepsia no tecido subcutâneo da superfície plantar do membro posterior direito.

### Teste comportamental (teste von Frey eletrônico)

A avaliação da hiperalgesia mecânica na pata de ratos foi realizada através de von Frey eletrônico em condições basais e após o estímulo na pata. Nesse método foi utilizado o anestesiômetro eletrônico, composto por um transdutor de pressão ligado a um cabo conectado a um detector digital de força, no qual a força exercida foi expressa em gramas. Na extremidade do transdutor há uma ponteira, por meio da qual foi aplicada uma força em ângulo reto na região central da pata traseira do animal com pressão gradualmente crescente. O estímulo foi interrompido após a observação característica de retirada da pata (flinches).

Para o experimento, foram utilizadas 6 caixas acrílicas, medindo 12x20x17cm, cujo assoalho era composto por uma rede de malha de ferro, na qual havia, 25cm abaixo das caixas de experimentação, um espelho inclinado usado para visualização da parte inferior da pata, facilitando a aplicação da ponteira. Antes de iniciado o experimento, os animais foram mantidos por 15 minutos nas caixas para ambientação. Foram realizadas 3 medições por animal sendo o valor final a média das medidas. A intensidade de hipernocicepção mecânica foi quantificada como a variação na pressão D de reação em gramas, obtida subtraindo-se o valor observado antes do procedimento experimental basal do valor de reação após a administração do estímulo inflamatório. As sessões de teste foram reali-

zadas durante a fase clara, entre 09h00 e 17h00, em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida a 23°C.

### Avaliação do efeito anti-hiperalgésico do sobrenadante da cultura de queratinócitos

Em uma primeira fase, administraram-se carragenina (100µg/50µL/pata) pela via i.p.l., a qual induziu hiperalgesia inflamatória pelas 6h avaliadas. Após duas horas da administração do agente hiperalgésico, um antagonista opioide não seletivo (naloxona) foi administrado no mesmo local. Após 2h30min, 50µl de sobrenadante de cultura de queratinócitos (grupos tratados, n=6) de 3 dias ou 50µL de meio de cultura de queratinócitos (grupo controle, n=6) foram administrados no mesmo local. Após 30 minutos da administração do sobrenadante, foi avaliada a hiperalgesia mecânica através do teste de von Frey (Resultados item 1).

### Avaliação da curva tempo-resposta dos diferentes dias (1 ou 3 dias) de sobrenadante de cultura de queratinócitos ou fibroblastos frente a hiperalgesia inflamatória

Foi realizado teste eletrônico de hiperalgesia mecânica (von Frey) previamente ao estudo. Após 1h, foi administrada carragenina (100µg/50µL/pata) pela via i.p.l. da pata posterior direita. Após 2h da administração do agente hiperalgésico, foi administrado, no mesmo local, 50µL de sobrenadante da cultura de queratinócitos (grupos tratados, n=6) de diferentes dias (1 e 3 dias) ou 50µL de meio de cultura para queratinócitos (grupo controle, n=6) nos períodos já descritos. Para se estabelecer a curva tempo-resposta, após 0,5, 1, 2, 4 e 6h da administração do sobrenadante, foi avaliada a hiperalgesia mecânica através do teste de von Frey (Resultados item 2).

### Participação dos receptores opioides e suas subunidades no efeito anti-hiperalgésico do sobrenadante de cultura de queratinócitos frente à hiperalgesia inflamatória

Foi realizado teste eletrônico de hiperalgesia mecânica (von Frey) previamente ao estudo. Após 1h, foi administrado carragenina (100µg/50µL/pata) pela via i.p.l. da pata posterior direita. Após 2h da administração do agente hiperalgésico, foram administrados antagonistas seletivos das subunidades opioides µ (CTOP, 20µg/50µL/pata), kappa (Nor-BNI, 10µg/50 µL/pata) e delta (N115, 3µg/50µL/pata) pela via intraplantar da pata posterior direita. Após 2,50 horas da administração da carragenina, foi administrado o sobrenadante da cultura de queratinócitos (grupo tratado) (n=6/grupo). Após 30 minutos da administração do sobrenadante, foi avaliada a hiperalgesia mecânica através do teste de von Frey (Resultados item 3).

Os experimentos seguiram as diretrizes do Comitê de Ética para Pesquisas com Animais da Universidade vigente, sob número de protocolo 4654-1/2017, e os padrões estabelecidos pela Associação Internacional de dor (IASP).

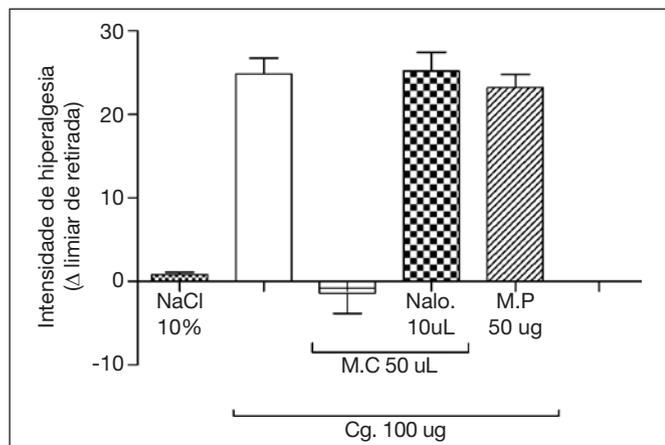
### Análise estatística

Os resultados foram expressos como média±erro padrão da média (e.p.m.). A análise dos dados obtidos foi feita pelo teste de análise de Variância ANOVA *One-way* ou *Two-way*, seguido de teste de Bonferroni para as comparações múltiplas. O nível de significância foi a partir de p<0,05.

**RESULTADOS**

**1. A administração local de naloxona no tecido periférico inibe o efeito anti-hiperalgésico do sobrenadante da cultura de queratinócitos**

A administração de carragenina (100µg/50µL/pata) i.p.l. induziu hiperalgisia inflamatória pelas 6h avaliadas. Após duas horas da administração do agente hiperalgésico, um antagonista opioide não seletivo (naloxona) foi administrado no mesmo local. Após 2,50 horas, 50µL de sobrenadante de cultura de queratinócitos (grupos tratados, n=6) de 3 dias ou 50µL de meio de cultura (M.C., 50µL) de queratinócitos (grupo controle, n=6) foram administrados no mesmo local. Como mostra a figura 1, sobrenadante da cultura de queratinócitos (M.C., 50µL) reverteu a hiperalgisia mecânica induzida pela carragenina. O efeito analgésico do M.C. foi revertido pelo pré-tratamento local com naloxona (Nalo, 10µg), um antagonista não seletivo de receptor opioide. A administração de M.C. (50µL) na pata contralateral não alterou o limiar hiperalgésico da carragenina, mostrando que o efeito de M.C. possui efeito local e não sistêmico. Administração do meio de cultura puro (M.P) não altera o limiar hiperalgésico da carragenina.

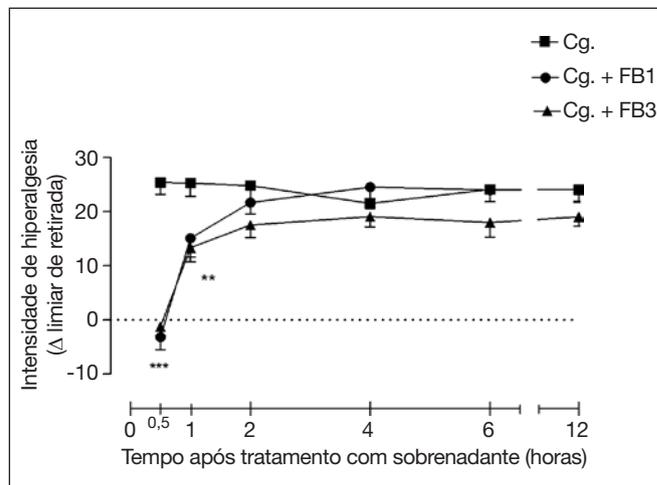


**Figura 1.** O meio de cultura de queratinócitos de 3 dias reverte a hiperalgisia mecânica induzida pela carragenina Sobrenadante de cultura de queratinócitos de 3 dias. M.C. = meio para cultura de queratinócitos; M.P. = meio puro para cultura de queratinócitos; NaCl = cloreto de sódio a 0,9%; Nalo = naloxona; Cg = carragenina.

**2. Sobrenadante de cultura de fibroblastos dos dias 1 e 3 reverte temporariamente a hiperalgisia inflamatória induzida por carragenina**

Uma vez que a cultura de queratinócitos para uso clínico possui uma proporção de 3:1 (queratinócitos: fibroblasto), foi analisado se a cultura isolada possui o mesmo efeito analgésico. Sobrenadante da cultura isolada de fibroblastos (FB1 e FB3, 50µL) dos dias 1 e 3 reverteu a hiperalgisia induzida por carragenina (Cg.) no tempo de 0,5 e 1h, como mostra a figura 2. Porém, esse efeito foi temporário, ocorrendo uma retomada da hiperalgisia após 2h. A administração de FB1 e FB3 (50µL) na pata contralateral não alterou o limiar hiperalgésico da carragenina, mostrando que o efeito de FB1 e FB2 é local e não sistêmico. Administração do meio de cultura puro (M199) não altera o limiar hiperalgésico da carragenina.

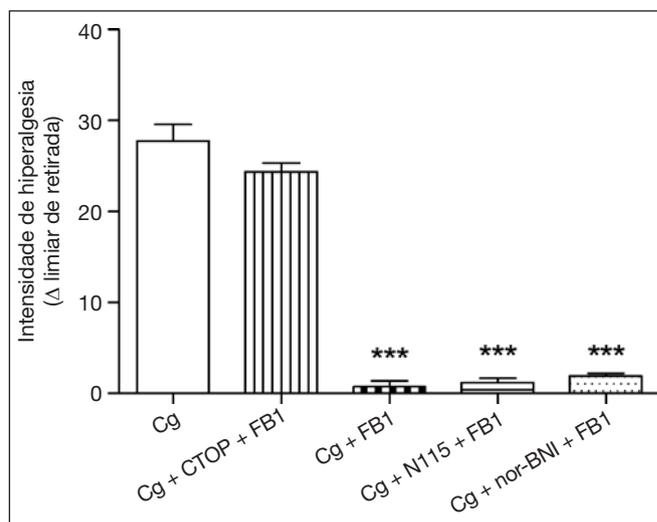
Comparando a curva tempo-resposta de FB1 e FB3 por 12h, observa-se não haver diferença no tempo e na duração da redução da hiperalgisia (Cg. + FB1 e Cg. + FB3) entre sobrenadante de 1 ou 3 dias de cultura isolada de fibroblastos.



**Figura 2.** A administração local de sobrenadante de cultura de fibroblastos em tecido periférico reduz temporariamente a hiperalgisia mecânica induzida por carragenina Cg = carragenina; FB1 = sobrenadante de cultura de fibroblastos de 1 dia; FB3 = sobrenadante de cultura de fibroblastos de 3 dias.

**3. O efeito anti-hiperalgésico do sobrenadante da cultura de fibroblastos é mediado por receptor µ opioide**

Uma vez que o efeito analgésico do sobrenadante da cultura de fibroblasto é medido por receptores opioide, foi analisado qual receptor opioide especificamente está envolvido nesse efeito analgésico. Antagonistas seletivos das subunidades opioides µ (CTOP, 20µg/50µL), kappa (Nor-BNI, 10µg/50µL) e delta (N115, 3µg/50µL) foram administrados pela via intraplantar, 30 minutos antes da administração do sobrenadante da cultura de fibroblasto. Como mostrado na figura 3, a carragenina induziu hiperalgisia que foi revertida por



**Figura 3.** Antagonista da subunidade µ opioide inibe o efeito analgésico de sobrenadante da cultura de fibroblastos Cg = carragenina; FB1 = sobrenadante de cultura de fibroblastos de 1 dia; CTOP = antagonista de subunidade µ; Nor-BNI = antagonista da subunidade kappa; N115 = antagonista da subunidade delta.

FB1 (Two-way ANOVA, teste de Bonferroni, \*\*\* $p < 0,001$ ). CTOP, mas não Nor-BNI ou N115, inibiu o efeito anti-hiperalgésico do sobrenadante da cultura de fibroblastos na hiperalgesia induzida por carragenina (Two-way ANOVA, teste de Bonferroni,  $p > 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Estudos mostraram que além de serem sintetizados por células imunes, outras células como queratinócitos e fibroblastos também desempenham importante papel na antinocicepção endógena periférica, uma vez que tais células expressam mRNA funcional de PENK, estando aptas a sintetizar e secretar peptídeos derivados de PENK, como as encefalinas. A liberação de fatores inflamatórios, notadamente IL-1 $\beta$ , induz a expressão e liberação de opioides por essas células, os quais, uma vez ligados aos receptores das fibras nervosas periféricas, inibem o disparo neuronal e a liberação do transmissor<sup>12-16</sup>.

O presente estudo demonstrou que sobrenadante da cultura de queratinócitos e fibroblastos promoveu analgesia durante a dor inflamatória induzida por carragenina em modelo de hiperalgesia mecânica, corroborando estudos prévios<sup>16-18,32-34</sup>. Os dados obtidos suscitaram que o receptor opioide parece estar envolvido no efeito analgésico da cultura de queratinócitos. A administração de um antagonista opioide não seletivo (naloxona) inibiu o efeito anti-hiperalgésico do sobrenadante da cultura de queratinócitos de 3 dias em modelo de hiperalgesia inflamatória, demonstrando que o efeito do sobrenadante da cultura de queratinócitos é mediado pela liberação de opioides (Figura 1).

Além disso, os resultados demonstraram que a hiperalgesia inflamatória induzida pela carragenina foi totalmente revertida ao se aplicar, 30 minutos antes do seu pico de ação, sobrenadante de cultura de fibroblastos de 1 e 3 dias. A reversão total ocorreu 30 minutos após a aplicação da cultura de fibroblastos, sendo que seu efeito redutor da hiperalgesia se manteve até 1h após, quando esta foi reestabelecida. Após 2 horas da aplicação da cultura de fibroblastos, não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados com cultura de fibroblastos e o grupo controle na reversão da hiperalgesia induzida por carragenina.

Como forma de verificar a participação dos receptores opioides e suas subunidades na analgesia verificada pelo sobrenadante de cultura de fibroblastos, foram administrados antagonistas seletivos das subunidades opioides um (CTOP, 20 $\mu$ g/50 $\mu$ L/pata), kappa (Nor-BNI, 10 $\mu$ g/50 $\mu$ L/pata) e delta (N115, 3 $\mu$ g/50 $\mu$ L/pata) pela via intraplantar. Os presentes resultados demonstraram diferença significativa entre os grupos que receberam antagonistas seletivos das subunidades kappa e delta antes do tratamento com sobrenadante da cultura de fibroblastos e o grupo tratado apenas com carragenina. Não houve, porém, diferença significativa entre o grupo tratado com antagonista seletivo da subunidade mu com relação ao grupo controle tratado com carragenina. Isso sugere que apenas o antagonista seletivo da subunidade um (CTOP, 20 $\mu$ g/50 $\mu$ L/pata) foi capaz de inibir o efeito analgésico do sobrenadante da cultura de fibroblastos, demonstrando que os receptores kappa e delta não participam na mediação analgésica induzida pelos fibroblastos. Assim, pode-se perceber que o grupo de opioide envolvido na antinocicepção induzida pela cultura de fibroblastos parece ser  $\mu$  agonista.

Diante disso, pode-se notar que há uma relação direta entre sistema nervoso periférico, queratinócitos, fibroblastos e analgesia. Tal corre-

lação suscita ser um potencial e seguro alvo para o desenvolvimento de novas formas antinociceptivas que busquem a redução dos efeitos adversos conhecidos com o amplo uso de opioides exógenos.

## CONCLUSÃO

O presente estudo indicou que sobrenadante de cultura de fibroblastos e queratinócitos foi capaz de induzir antinocicepção em hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina, sendo esta mediada pela liberação de opioides endógenos. Além disso, foi observado que a redução da hiperalgesia por sobrenadante de cultura de fibroblastos é mediada especificamente por agonista  $\mu$  opioide.

## REFERÊNCIAS

1. Abbas AK, Janeway CA Jr. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell*. 2000;100(1):129-38.
2. Dawes JM, Anderson DA, Bennett DL, Bevan S, McMahon SB. Inflammatory mediators and modulators of pain. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 2013;6:48-67.
3. Levine JD, Taiwo Y. Inflammatory Pain. In: Wall PD, Melzack R, Bonica JJ. *Textbook of Pain*. 3<sup>rd</sup> ed. Edinburgh, Scotland, Churchill Livingstone; 1994. 45-56p.
4. Carvalho MMMJ. O Sofrimento da dor em câncer. In: Carvalho MMMJ. *Introdução à psiconcologia*. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo; 2003. 103-18p.
5. Messlinger K. What is a nociceptor? *Anaesthesist*. 1997;46(2):142-53.
6. Besson JM. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. *Drugs*. 1997;53(Suppl.2):1-9.
7. Webster KE. Somaesthetic pathways. *Br Med Bull*. 1977;33(2):113-20.
8. Woolf CJ. Recent advances in the pathophysiology of acute pain. *Br J Anaesth*. 1989;63(2):139-46.
9. Stein C, Pflüger M, Yassouridis A, Hoelzl J, Lehrberger K, Welte C, et al. No tolerance to peripheral morphine analgesia in presence of opioid expression in inflamed synovia. *J Clin Invest*. 1996;98(3):793-9.
10. Stein C, Gramsch C, Herz A. Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local opioid receptors and beta-endorphin. *J Neurosci*. 1990;10(4):1292-8.
11. Garcia JB, Cardoso MG, Dos-Santos MC. Opioids and the immune system: clinical relevance. *Rev Bras Anesthesiol*. 2012;62(5):709-18.
12. Slominski AT, Zmijewski MA, Skobowiat C, Zbytek B, Slominski RM, Steketee JD. Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2012;212:v, vii, 1-155.
13. Vetter I, Kapitza D, Hermansuss S, Monteith GR, Cabot PJ. The effects of pH on beta-endorphin and morphine inhibition of calcium transients in dorsal root ganglion neurons. *J Pain*. 2006;7(7):488-99.
14. Holt V. Opioid peptide processing and receptor selectivity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1986;26(1):59-77.
15. Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang AC, Cohen SN, et al. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature*. 1979;278(5703):423-7.
16. Sibinga NE, Goldstein A. Opioids peptides and opioid receptors in cell of the immune system. *Annu Rev Immunol*. 1988;6:219-49.
17. Wintzen M, Yaar M, Avila E, Vermeer BJ, Gilchrist BA. Keratinocytes produce  $\beta$ -endorphin and  $\beta$ -lipotropic hormone after stimulation by UV, IL-1 $\alpha$  or phorbol esters. *J Invest Dermatol*. 1995;104:641. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0000723419&origin=inward&txGid=7b951b39c5d52e89782d-718c1d65b2be>.
18. Schauer E, Trautinger F, Köck A, Schwarz A, Bhardwaj R, Simon M, et al. Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J Clin Invest*. 1994;93(5):2258-62.
19. Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M, Buechner S, Ruffi T. Expression of  $\mu$ -opioid receptor in human epidermis and keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 1998;111(2):297-301.
20. Lo HH, Tseng LF, Wei E, Li CH. Endorphin is a potent analgesic agent. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976;73(8):2895-8.
21. Slominski AT, Zmijewski MA, Zbytek B, Brozyna AA, Granese J, Pisarchik A, et al. Regulated proenkephalin expression in human skin and cultured skin cells. *J Invest Dermatol*. 2011;131(3):613-22.
22. Bigliardi-Qi M, Sumanovski LT, Büchner S, Ruffi T, Bigliardi PL. Mu-opiate receptor and beta-endorphin expression in nerve endings and keratinocytes in human skin. *Dermatology*. 2004;209(3):183-9.
23. Schaible HG. Pathophysiology of pain. *Orthopade*. 2006;36(1):8-16.
24. Schaible HG. Peripheral and central mechanisms of pain generation. *Hand Exp Pharmacol*. 2007;(177):3-28.
25. Siderov J, Zalberg JR. Prescribing opioids—a painful experience. *Med J Aust*. 1994;161(9):515-6.
26. Benyamin R, Trescot AM, Datta S, Buenaventura R, Adlaka R, Sehgal N, et al. Opioid complications and side effects. *Pain Physician*. 2008;11(2 Suppl):S105-20.

27. Chou R, Turner JA, Devine EB, Hansen RN, Sullivan SD, Blazina I, et al. The effectiveness and risks of long-term opioid therapy for chronic pain: a systematic review for a National Institutes of Health Pathways to Prevention Workshop. *Ann Intern Med.* 2015;162(14):276-86.
28. Eriksen J, Sjogren P, Bruera E, Ekholm O, Rasmussen NK. Critical issues on opioids in chronic non-cancer pain: an epidemiological study. *Pain.* 2006;125(1-2):172-9.
29. Vivancos GG, Verri WA Jr, Cunha TM, Schivo IR, Parada CA, Cunha FQ, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(3):391-9.
30. Rosland JH. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. *Pain.* 1991;45(2):211-6.
31. Henriques MG, Silva PM, Martins MA, Flores CA, Cunha FQ, Assrey-Filho J, et al. Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Braz J Med Biol Res.* 1987;20(2):243-9.
32. Bodnar RJ. Endogenous opiates and behavior: 2017. *Peptides.* 2020;124:170223.
33. Leong C, Neumann C, Ramasamy S, Rout B, Wee LY, Bigliardi-Qi M, et al. Investigating endogenous  $\mu$ -opioid receptors in human keratinocytes as pharmacological targets using novel fluorescent ligand. *PLoS one.* 2017;12(12):e0188607.
34. Li X, Zhu J, Tao Y, Tao K. Elevated endogenous opioids in obstructive jaundice: the possible skin mechanisms. *Med Hypotheses.* 2018;116:119-21.

