

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA
LABORATORIO DE INMUNOLOGIA Y VIROLOGIA**



**EVALUACION DE NUEVOS OPIOIDES AGONISTAS
NO PEPTIDICOS DEL TIPO DELTA Y MU SOBRE LAS
LINFOCITOS DE HUMANO Y RATA, Y SUS EFECTOS
FUNCIONES INMUNOLOGICAS DE MACROFAGOS Y
ANTITUMORALES EN CONTRA DE LINEAS
MIELOIDES Y LINFOIDES.**

**TESIS QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL TITULO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA**

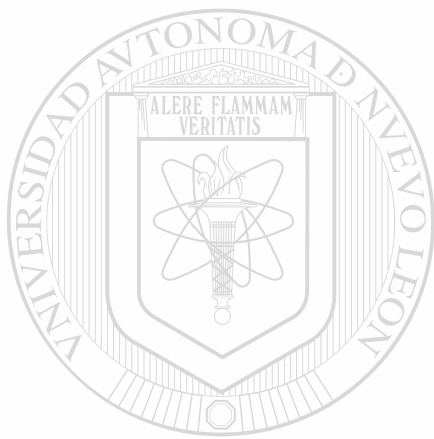
**PRESENTA
DIANA ELIA CABALLERO HERNANDEZ**

DICIEMBRE 2002

TM
QP921
.O2
C3
2002
c.1



1080124327



UANL

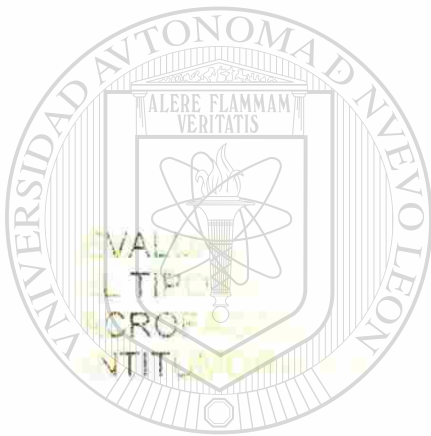
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEPARTAMENTO DE
LABORATORIO

Ciencias Biológicas
Grados de Postgrado
Citología e Inmunología
Embriología y Virología



AGONISTAS NO PEPTIDICOC
FUNCIONES INMUNOLÓGICAS
MURINO Y RATA, Y SUS EFECTOS
EN LAS MIELOIDES Y LINFOCITOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

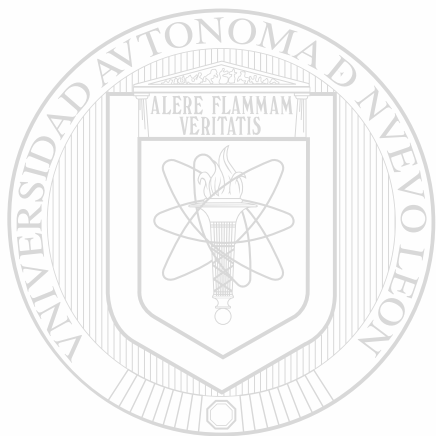
TESIS QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGÍA
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
PRESENTA:

®

DIANA ELIA CABALLERO HERNÁNDEZ

SEPTIEMBRE

TM
QP921
.O2
C3
2002

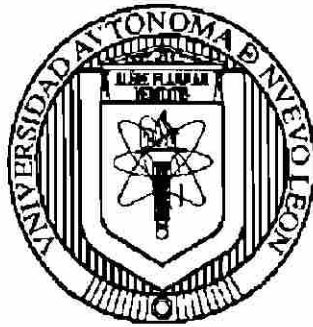


UANL


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



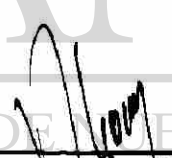
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



EVALUACIÓN DE NUEVOS OPIOIDES AGONISTAS NO PEPTIDICOS DEL TIPO DELTA Y MU SOBRE LAS FUNCIONES INMUNOLÓGICAS DE MACROFAGOS Y LINFOCITOS DE HUMANO Y RATA, Y SUS EFECTOS ANTITUMORALES EN CONTRA DE LINEAS MIELOIDES Y LINFOIDES.




Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Presidente



Dr. Ricardo A. Gómez Flores
Secretario



Dr. Patricia Tamez Guerra
Vocal



Dr. Juan Manuel Alcocer Gonzalez
Suplente

DICIEMBRE 2002



LOCALIZACIÓN

El presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT):

Por la beca otorgada para realizar estudios de postgrado (Maestría en Ciencias con especialidad en Inmunobiología) en la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (Número de registro 153978).

A la Universidad Autónoma de Nuevo León:

Por la beca de investigación otorgada por la Subdirección de estudios de Postgrado de esta Universidad para realizar esta tesis de investigación.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento para con todas las personas que de una forma u otra hicieron posible este trabajo y que con su apoyo me permitieron llegar hasta aquí, en especial al Dr. Ricardo Gómez por todas las oportunidades de aprendizaje que me ha brindado.

Asimismo al Dr. Richard J. Weber, Dr. Reyes Tamez Guerra, Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Dra. Patricia Tamez Guerra, M.C. José Luis Méndez Vázquez, Dra. Lydia Rodríguez, M.E.S. Martha Santoyo Stefano, Dr. José Antonio Heredia Rojas, M.V.Z. Ramón Belmontes. Al personal docente y no docente del Laboratorio de Inmunología y Virología y al Departamento de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	adrenocorticotropina
α -END	alfa-endorfina
AMPc	adenosin monofosfato cíclico
ATCC	American type culture collection
β -END	beta-endorfina
BNTX	bencilideno naltrexona
Células TH	células T cooperadoras
CMH	células mononucleares humanas
CON A	concanavalina A
CTL	linfocitos citotóxicos
DADLE	[D-Ala ² , D-Leu ⁵] encefalina;
DAG	diacilglicerol
DAGO	Tyr-D-Ala-Gly-mePhe-Gly-ol
DALCE	D-Ala ₂ , Leu ₅ , Cys ₆ encefalina
DAMEA	Met ₅ -encefalinamida
DAMGO	D-Ala ₂ -N-MePhe ₄ , Gly-ol ₅ -encefalina
DMF	dimetil formamida
DMSO	dimetil sulfoxido
DPDPE	D-Pen ₂ -D-Pen ₅ encefalina
DYN-A	dinorfina A
Gi	proteínas G inhibitorias
Gs	proteínas G estimuladoras
HPA	eje hipotalámico-pituitario-adrenal
IL-1	interleucina 1
IL-2	interleucina 2
IP	fosfatidil inositol
IP3	inositol trifosfato

IRN	intermediarios reactivos del nitrógeno
LENK	leu-encefalina
LPS	lipopolisacarido
MENK	met-encefalina
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio
NK	células asesinas naturales
NTI	naltrindol
PAG	material gris del acueducto del mesencéfalo
PBS	solución salina de fosfatos
PHA	fitohemaglutinina
POMC	proopiomelacorticona
SDS	dodecil sulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
SNA	sistema nervioso autónomo
SNC	sistema nervioso central
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
TNF-β	factor de necrosis tumoral beta
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana

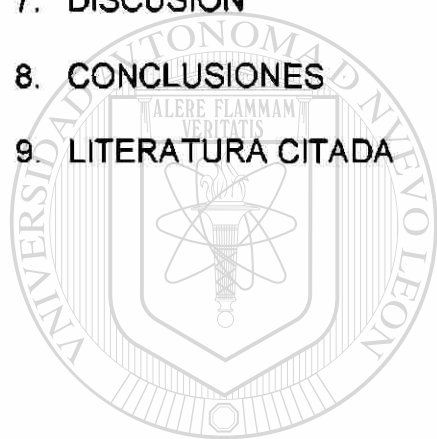
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ÍNDICE

<i>Localización</i>	<i>i</i>
<i>Agradecimientos</i>	<i>ii</i>
<i>Lista de abreviaturas</i>	<i>v</i>
<i>Resumen</i>	<i>vii</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Generalidades sobre opioides	4
2.1.1 Opioides alcaloides exógenos	5
2.1.2 Opioides endógenos	7
2.1.3 Opioides sintéticos no peptídicos	10
2.2 Mecanismos de modulación a nivel celular por opioides	11
2.3 Mecanismos de modulación del sistema inmune por opioides	19
2.3.1 Modulación indirecta	19
2.3.2 Modulación directa	25
2.4 Modulación opioide del sistema inmune	28
2.4.1 Modulación opioide de las funciones de linfocitos	31
2.4.2 Modulación opioide de las funciones de macrófagos	38
2.4.2.1 Modulación opioide de la producción de óxido nítrico	39
2.4.2.2 Modulación opioide de la producción de TNF- α	40
2.4.2.3 Modulación opioide de la fagocitosis por macrófagos	42
2.4.3 Actividad antitumoral de opioides	46

3. HIPÓTESIS	51
4. OBJETIVO	52
5. MATERIALES Y MÉTODOS	53
5.1 Material empleado	53
5.1.1 Equipo y reactivos	53
5.1.2 Animales de experimentación	53
5.1.3 Líneas celulares	53
5.1.4 Drogas empleadas	54
5.1.5 Preparación de las drogas	54
5.2 Metodologías empleadas	57
5.2.1 Obtención de linfocitos de timo de rata	57
5.2.2 Ensayo de reducción del MTT por linfocitos	57
5.2.3 Obtención de macrófagos peritoneales de rata	58
5.2.4 Producción de óxido nítrico por macrófagos	59
5.2.5 Producción de TNF- α por macrófagos	59
5.2.6 Fagocitosis de la levadura <i>Candida albicans</i> por macrófagos	60
5.2.7 Obtención de células mononucleares de sangre periférica mediante gradiente Ficoll-Hypaque	61
5.2.8 Ensayo de reducción de MTT por células mononucleares	61
5.2.9 Obtención de monocitos de sangre periférica	62
5.2.10 Producción de TNF- α por monocitos	62
5.2.11 Ensayo de crecimiento <i>in vitro</i> de líneas celulares	63
5.3 Análisis Estadístico	64
6. RESULTADOS	65
6.1 Efecto de opioides sobre las funciones de linfocitos y macrófagos de rata	65
6.1.1 Respuesta proliferativa de linfocitos de timo	65

6.1.2	Producción de óxido nítrico	79
6.1.3	Producción de TNF- α	89
6.1.4	Fagocitosis de <i>Candida albicans</i>	95
6.2	Efecto de opioides sobre las funciones de células mononucleares y monocitos humanos	101
6.2.1	Respuesta proliferativa de células mononucleares	101
6.2.2	Producción de TNF- α por monocitos	109
6.3	Efecto de opioides sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de líneas tumorales	118
7.	DISCUSIÓN	139
8.	CONCLUSIONES	151
9.	LITERATURA CITADA	153



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Los compuestos opioides tienen una amplia actividad farmacológica que ha sido explotada por siglos, sin embargo su empleo crónico tanto terapéutico como de abuso esta asociado a problemas de adicción y efectos que comprometen el estatus inmune de los individuos. Esta problemática estimula la búsqueda y desarrollo de compuestos opioides con actividad analgésica pero sin las desventajas mencionadas, o bien compuestos opioides con potencial terapéutico. Existen estudios iniciales dónde se reporta que ciertos opioides no peptídicos, con alta capacidad analgésica, y muy selectivos del tipo delta y kappa, pueden estimular al sistema inmune.

En este trabajo se evaluó el potencial inmunomodulador y antitumoral de un grupo de compuestos opioides sintéticos del tipo *mu* y *delta*. Encontramos que algunos de estos tienen potencial para emplearse de forma terapéutica. El SNC80 (tipo delta), con potente capacidad analgésica, no afectó la respuesta de linfocitos y macrófagos, y presentó también propiedades antitumorales *in vitro*. Mientras tanto los derivados del naltridol y la naltrexona tuvieron efectos variados, el 9336 (tipo *mu*) presentó actividad que sugiere potencial como inmunoestimulador. De los compuestos tipo *mu* restantes, el 9332 no solo inhibió en forma significativa el crecimiento tumoral *in vitro* sino también afectó a células normales. Los compuestos 9333 y 9334 presentaron una actividad menos definida y consistente, por lo que no poseen gran potencial de desarrollo.

1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento y desarrollo de sustancias modificadoras de las respuesta biológicas ha sido siempre de interés práctico. Entre estas sustancias se encuentran los compuestos conocidos como opioides, cuyo ejemplo más representativo es el opio o adormidera, conocido desde la antigüedad por sus propiedades analgésicas y adictivas, a través del tiempo su empleo ha evolucionado en forma importante con la síntesis de derivados con mayor potencia farmacológica.

Sin embargo, si bien sus propiedades analgésicas son sumamente apreciadas en la práctica clínica, numerosos estudios han demostrado que el uso de opioides afecta en forma significativa el estatus inmunológico de los individuos; esto ha llevado a concluir que el espectro de acción de estos compuestos no se limita al sistema nervioso, sino que abarca otros como el inmune y el endocrino. Así, se ha descubierto que los opioides son capaces de interactuar con el sistema inmune en forma indirecta a través del sistema nervioso, o en forma directa a través de su interacción con receptores específicos para opioides localizados en la membrana de las células inmunes, linfocitos y macrófagos, y de esa forma modificar la magnitud y naturaleza de las respuestas inmunes.

En la actualidad existe una importante problemática relacionada con este descubrimiento y que impacta directamente en la salud pública. Los adictos a drogas como la heroína, un derivado de la morfina, se consideran un

grupo inmunológicamente comprometido a consecuencia de la actividad inmunosupresora de esta droga, además de considerarse un grupo de alto riesgo epidemiológico, entre otras cosas por el uso de agujas compartidas. Esto establece circunstancias que facilitan la transmisión y adquisición de enfermedades infecciosas y cáncer en la población.

Sin embargo existe también un aspecto prometedor en la actividad inmunomoduladora de estos compuestos. Si bien algunos opioides son inmunosupresores también se ha observado que otros tienen la capacidad de producir el efecto contrario, es decir, estimulan la respuesta inmune de los individuos. Desafortunadamente, la mayoría de estos compuestos son de naturaleza peptídica, por lo tanto su manejo y administración es difícil y su producción costosa, por ello en la actualidad se trabaja en la obtención de compuestos sintéticos opioides más afines al empleo clínico (actividad analgésica, sin propiedades adictivas o inmunosupresoras). Esto último requiere de la evaluación del efecto de estos compuestos sintéticos sobre parámetros relevantes de inmunocompetencia que nos permitan definir su potencial inmunoterapéutico. El objetivo de este trabajo es precisamente la evaluación de la capacidad inmunomoduladora de una serie de opioides no peptídicos de reciente síntesis, el cual además de aportar la caracterización de los efectos de un grupo de estos nuevos opioides sobre las funciones de linfocitos y macrófagos de humano y rata, busca aportar información útil para el diseño de futuros compuestos opioides selectivos, potentes y sin efectos secundarios.

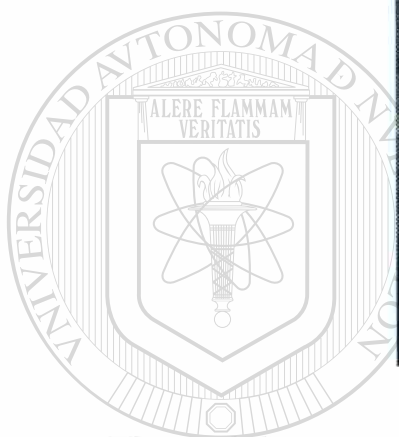


Figura 1. La amapola o adormidera *Papaver somniferum*. El opio es un extracto de esta planta y probablemente ha sido usado por sus efectos psicoactivos durante mas tiempo que cualquier otro agente, excepto quizás el alcohol. La investigación científica de la acción química de los opiáceos comenzó con el aislamiento del ingrediente activo. En 1805, el químico Friedrich Sertürner obtuvo morfina pura de la amapola, la cual comprendía alrededor del 10% del peso de la planta (Solomon, 1996).

2. ANTECEDENTES

2.1 Opioides: generalidades

Los opioides han estado entre los agentes medicinales mas importantes de diversas culturas. Han demostrado ser poderosos agentes en el alivio al dolor, pero al mismo tiempo presentan propiedades adictivas e inmunosupresoras, lo cual impacta en forma negativa sobre la salud pública. Estos problemas han estimulado la búsqueda de analgésicos potentes sin potencial inmunosupresor y adictivo.

Se sabe del empleo de extractos del opio desde hace unos 5,000 años; se han utilizado por sus propiedades analgésicas, antidiarreicas y antitusigénicas. El opio se obtiene de la planta solanácea *Papaver somniferum*, comúnmente conocida como amapola. La palabra "opio" por sí misma, deriva del nombre griego que significa "jugo", y el fármaco se obtiene del exudado lechoso que se extrae del tallo de la amapola. En 1806, el químico alemán Freiderich Sertuner aisló por primera vez el principio activo del opio dándole el nombre de morfina, en referencia a Morfeo, dios de los sueños en la literatura griega. Después del descubrimiento de la morfina sobrevino pronto el aislamiento de otros alcaloides del opio (El opio contiene mas de 20 alcaloides distintos) como la codeína por Robiquet en 1932 y la papaverina por Merck en 1948. Hacia mediados del siglo XIX empezó a diseminarse por todo el mundo médico el empleo de alcaloides puros, derivados del opio (Villarejo-Díaz y cols, 2000).

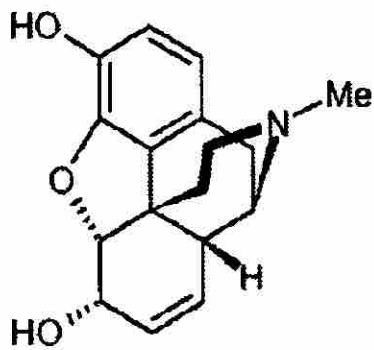
Antes de continuar, es importante establecer que el término *opioides* se aplica a todos los agonistas y antagonistas con actividad del tipo de la morfina, lo mismo que a los péptidos opioides naturales, y opioides sintéticos y semisintéticos (Cuadro 1) (Reisine y Pasternak, 1996).

La búsqueda de agentes más seguros y eficaces, con menos efectos indeseables y un reducido potencial de adicción llevó al desarrollo de nuevas generaciones de analgésicos opioides con propiedades agonistas, agonistas parciales, agonistas-antagonistas y antagonistas puros. Los antagonistas de los receptores de opioides, naloxona y naltrexona fueron desarrollados en el año de 1940.

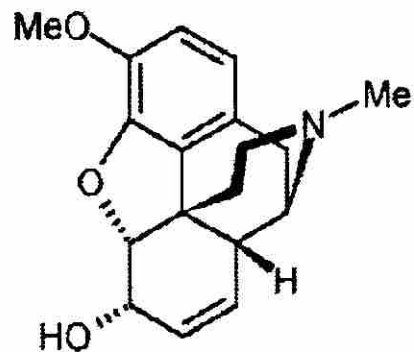
Para mediados de la década de 1960, se hizo claro que la acción de los agonistas y antagonistas opioides podía ser explicada por la acción de receptores opioides, lo cual llevó en forma lógica al razonamiento de que estos receptores debían ser el blanco de opioides endógenos.

2.1.1. Opioides alcaloides exógenos. El término *opiáceos* se emplea para distinguir a los fármacos derivados del opio, entre estos se encuentran la morfina, codeína y gran variedad de compuestos semisintéticos derivados de estos y de la tebaína, otro componente del opio. Los alcaloides obtenidos de *Papaver somniferum* (entre ellos la morfina) pueden clasificarse en dos clases químicas definidas: los fenantrenos y las benzilisoquinolinas. Los principales fenantrenos son morfina (10% del opio), codeína (0.5%) y tebaína (0.2%), las principales benzilisoquinolinas son papaverina (1.0%) (relajante del músculo liso), y noscapina (6.0%) (Reisine y Pasternak, 1996).

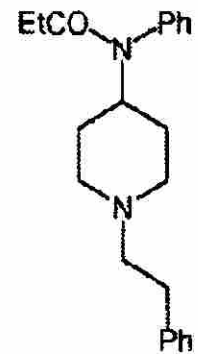
Cuadro 1. Compuestos opioides.



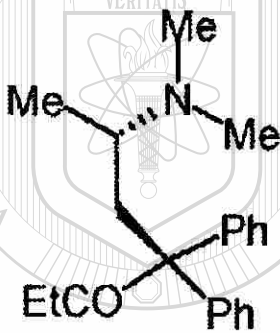
a) morfina



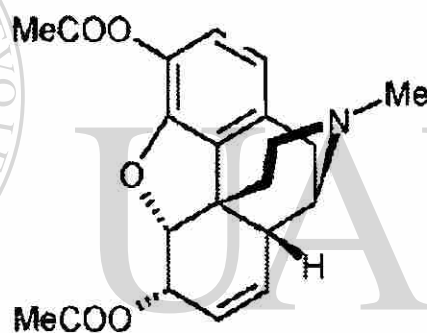
b) codeína



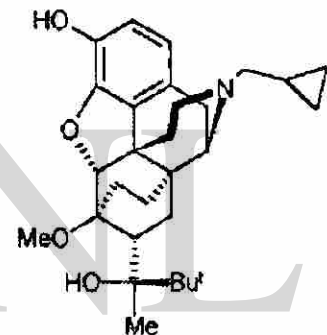
c) fentanil



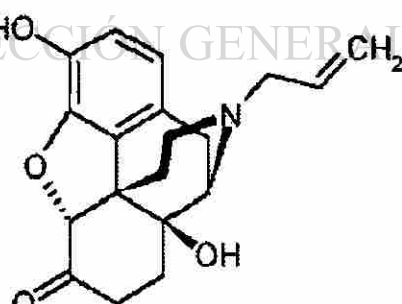
d) metadona



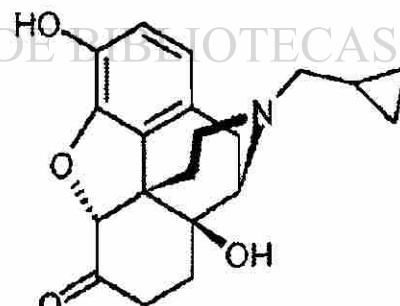
e) heroína



f) buprenorfina



g) naloxona



h) naltrexona

- a,b) alcaloides naturales del opio
 c,d) derivados semisintéticos de los alcaloides del opio
 e,f) opioides sintéticos
 g,h) opioides sintéticos antagonistas

2.1.2. *Opioides endógenos*. La palabra *endorfina* es un término genérico que se refiere a las tres familias de péptidos opioides endógenos: encéfalinas, endorfinas y dinorfinas. Cada familia deriva de un polipéptido precursor diferente y tiene una distribución anatómica característica (Cuadro 1).

De estos precursores, la proopiomelanocortina (POMC) fue aislada de la pituitaria por 3 grupos en 1979, la proencefalina fue caracterizada a partir de la médula adrenal en 1982, y la prodinorfina a partir de tejido hipotalámico en 1982. En el cuadro 2 se enlistan las secuencias de varios péptidos opioides que han sido identificados como derivados de cada prohormona (Brush y Nagase Shain, 1989).

Estos péptidos producen los mismo efectos que los químicos conocidos como alcaloides opiáceos clásicos. Los péptidos opioides endógenos funcionan como hormonas y neuromoduladores. Aquellos que funcionan como hormonas son secretadas en la circulación por las glándulas que las producen, y son liberadas a una variedad de tejidos blancos en sitios distantes en los cuales inducen una respuesta. Los péptidos opioides que sirven como neuromoduladores son producidos y secretados por células nerviosas (por ejemplo, neuronas) y actúan en el cerebro y la médula espinal para modular sus acciones sobre otros neurotransmisores (Froehlich, 1997).

2.1.2.1 Endorfinas

La POMC (265 aminoácidos, Nakanishi, 1979) se rompe para formar la β -lipotropina (β -LPH, 91 aminoácidos) y la adrenocorticotropina (ACTH, 39

aminoácidos) el último, por supuesto, tiene efectos conductuales directos. La β -LPH, a su vez, se rompe para producir γ -lipotropina (58 aminoácidos) y la β -endorfina de 31 aminoácidos, el único péptido opioide derivado de la POMC.

2.1.2.2. Encéfalinas

La proencefalina (263 aminoácidos, Noda y cols, 1982) se rompe para producir cuatro copias de Met-encefalina, una copia de Leu-encefalina, y una de Met-encefalina-⁸ (Met-encefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸) y Met-encefalina-Arg⁶-Phe⁷. Un fragmento adicional más grande que tiene propiedades opioides, ha sido identificado. Se le conoce como péptido E, pero se encuentra principalmente en la médula adrenal y puede que no posea efectos conductuales.

2.1.2.3. Dinorfinas

La prodinorfina (256 aminoácidos, Kakidani y cols, 1982) se rompe en cinco péptidos que contienen Leu-encefalina, algunos de los cuales pueden posteriormente romperse para producir el pentapéptido Leu-encefalina. Los productos más importantes con actividad opioide son la α -neoendorfina, β -neoendorfina, dinorfina A (1-8), dinorfina A (1-7) y dinorfina B (1-13). Las dos neoendorfinas y las endorfina A (1-8) y endorfina B pueden romperse posteriormente para producir Leu-encefalina.

Cuadro 2. Péptidos opioides y sus precursores

Precusores	Péptidos	Estructuras
Proencefalina	Metionina-encefalina	Tir-Gli-Gli-Fen-Met
	Leucina-encefalina	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu
	Heptapéptido	Tir-Gli-Gli-Fen-Met-Arg-Fen
	Octapéptido	Tir-Gli-Gli-Fen-Met-Arg-Gli-Leu
Pro-opiomelanocortina (endorfinas)	Alfa-endorfina	Tir-Gli-Gli-Fen-Met-(1-16)
	Delta-endorfina	Tir-Gli-Gli-Fen-Met-(1-17)
	Beta-endorfina	Tir-Gli-Gli-Fen-Met-(1-31)
Pro-Dinorfina (Proencefalina B)	Alfa-Neo-Endorfina	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-(1-10)
	Beta-Neo-Endorfina	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-(1-9)
	Dinorfina A	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-(1-17)
	Dinorfina A	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-(1-8)
	Dinorfina B	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-(1-13)

Adaptado de Villarejo-Díaz, M., y cols., 2000.

2.1.3. Opioides sintéticos no peptídicos.

Aunque la morfina sigue siendo empleada clínicamente, la presencia de efectos indeseables (por ejemplo, depresión nerviosa, dependencia/tolerancia, efectos en el ánimo) proveen el estímulo necesario para buscar análogos que sean selectivos al producir analgesia.

Muchos derivados semisintéticos se elaboran mediante modificaciones relativamente simples de la morfina o la tebaína. Entre las propiedades importantes de los opioides que se pueden alterar mediante modificación estructural están su afinidad por las diversas especies de receptores de los opioides, su actividad como agonistas o como antagonistas, su solubilidad en lípidos y su resistencia a la desintegración metabólica. Además de morfina, codeína y derivados semisintéticos de los alcaloides naturales del opio, otras clases químicas estructuralmente diferentes poseen acciones farmacológicas semejantes a las de la morfina. Entre estos compuestos se encuentran los morfinaños, benzomorfanos, metadonas, fenilpiperidinas y propionanilidas. (Reisine y Pasternak, 1996).

Es posible concebir una evolución de estos análogos opioides, con una simplificación progresiva de su estructura química.

2.2. Opioides: Mecanismos de modulación a nivel celular por opioides

La actividad opioide se puede manifestar en forma endógena y exógena. Los opioides peptídicos endógenos (endorfinas, encefalinas y dinorfinas) y los opioides exógenos (como la morfina) ejercen sus efectos a través de la activación de receptores celulares de tres tipos principales, *mu*, *delta* y *kappa* (Martin, 1983; Reisine y Bell, 1993; Raynor y cols, 1994) (Cuadro 3).

Los receptores opioides en el sistema nervioso están ampliamente distribuidos central y periféricamente, por lo que no debe sorprender que tengan numerosos efectos farmacológicos (Cesselin, 1995) (cuadro 4). En el sistema inmune los opioides producen sus efectos por medio de interacciones con receptores opioides μ , δ , y κ distribuidos en la superficie de linfocitos y macrófagos.

La unión de opioides con sus receptores lleva a la activación de proteínas G de membrana que transmitirán la señal a través de dos importantes vías, los sistemas de la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C (este último también puede activar el sistema de la guanilato ciclasa). La activación de estas vías induce la fosforilación de proteínas lo que permite a las células responder rápidamente a diversas señales provenientes del medio extracelular. La fosforilación de proteínas es un evento crucial para diversos procesos celulares como el metabolismo intermedio, arquitectura del citoesqueleto, adhesión celular, y progresión del ciclo celular. La fosforilación de proteínas induce a los segundos mensajeros como

Cuadro 3. Tipos de receptores selectivos de opioides

Tipo de receptor opioide (aminoácidos)	Agonistas		Antagonistas	
	Endógenos	Exógenos	Reversible	Irreversible
μ (334-398)	β -endorfina β -neendorfina	Morfina DAMGO DAMEA, DALB Fentanil Metadona Buprenorfina ^a Sulfentanil	CTOP Naloxona	β -funaltrexona BIT ^c
δ (372)	Leu-encefalina Met-encefalina Deltorfina	SNC 80 ^b DPDPE DADLE	Naltrindol	SUPERFIT FIT ^d DALCE ^e UPHIT
κ (380)	Dinorfina-A	U50,488 U69,593 Bremazocina	Nor-binaltorfina	UPHIT

^a Opiode tipo agonista/antagonista

^b SNC80 (+)-4-((alfa R)-alfa-((2S, 5R)-4-allyl-2, 5-dimetil-1-piperazinil)-3-metoxibenzil)-N, N-dietil-benzamida

^c BIT=2-(4 -etoxibencil)-1-dietilaminoetil-5-isotiocianatobenzimidazol

^d FIT= N-fenyl-N-[1-(2-(4-isotiocianato)feniletil)4-piperidinil]pro-panamida

^e DALCE= [D-Ala₂, Leu₅, Cis₆]encefalina

Adaptado de Gómez-Flores y Weber (1999b)

Cuadro 4. Efectos farmacológicos de receptores opioides

Receptor	Agonista	Antagonista	Efecto(s) agonista(s)
μ	Morfeceptina DAGO Normorfina Sufentanil	Naloxona	Analgesia Depresión respiratoria Miosis Reducción de la motilidad gastrointestinal Náusea Vómito Euforia
δ	Deltorfina DPDPE DADLE	ICI 154,126 ICI 174,864	Analgesia supraespinal
κ	U 50, 488 Trifluadom	MR2266	Analgesia (nivel espinal) Miosis (débil) Depresión respiratoria (débil) Disforia

DAGO, Tyr-D-Ala-Gly-mePhe-Gly-ol;
 DPDPE, [D-Pen², D-Pen⁵]encefalina; Pen, penicil-lamina;
 DADLE, [D-Ala², D-Leu⁵] encefalina;
 Deltorfina II, Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH₂;
 Morfeceptin, β -casomorfina-(1-4)-amida o Tyr-Pro-Phe-Pro-NH₂.

Tomado de Brownstein, M.J. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5391-5393

Figuras 3-5. Receptores opioides *mu*, *delta* y *kappa*. La comparación de las secuencias de aminoácidos de los receptores δ y κ clonados del ratón y el receptor μ de la rata, revela que cerca de 65% de los residuos son idénticos o similares. los residuos aminoácidos que son idénticos o similares entre los receptores se muestran e color gris y los que no son similares están representados en blanco. Obsérvese que las asas intracelulares y las regiones de amplitud transmembranal I, II, III y VII son muy semejantes en sus secuencias de aminoácidos. en contraste, las terminaciones amino y carboxilo son muy diferentes, y lo son del mismo modo las asas extracelulares II y III, y la región de amplitud transmembranal IV. (Tomado de Reisine y Pasternak, 1999)

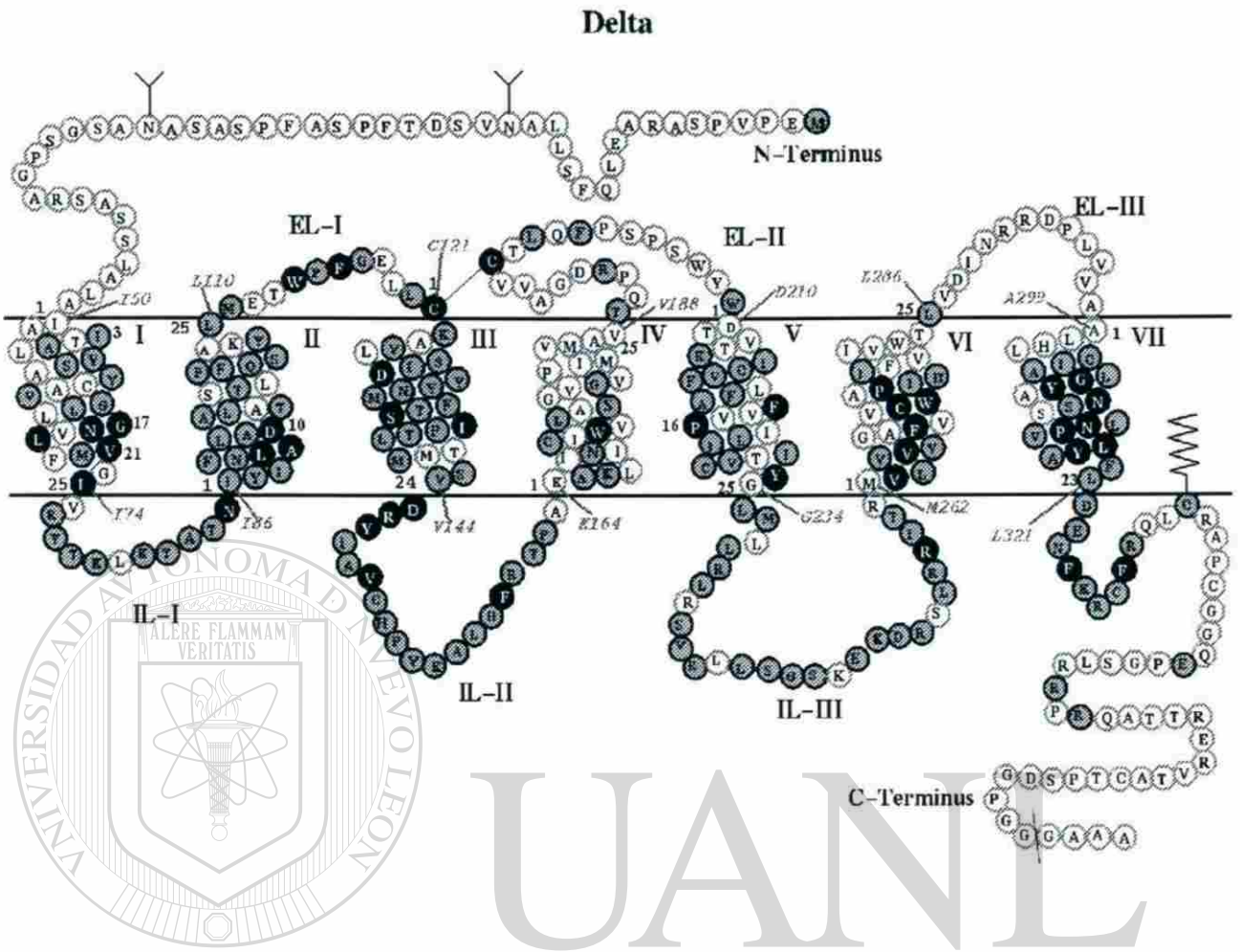
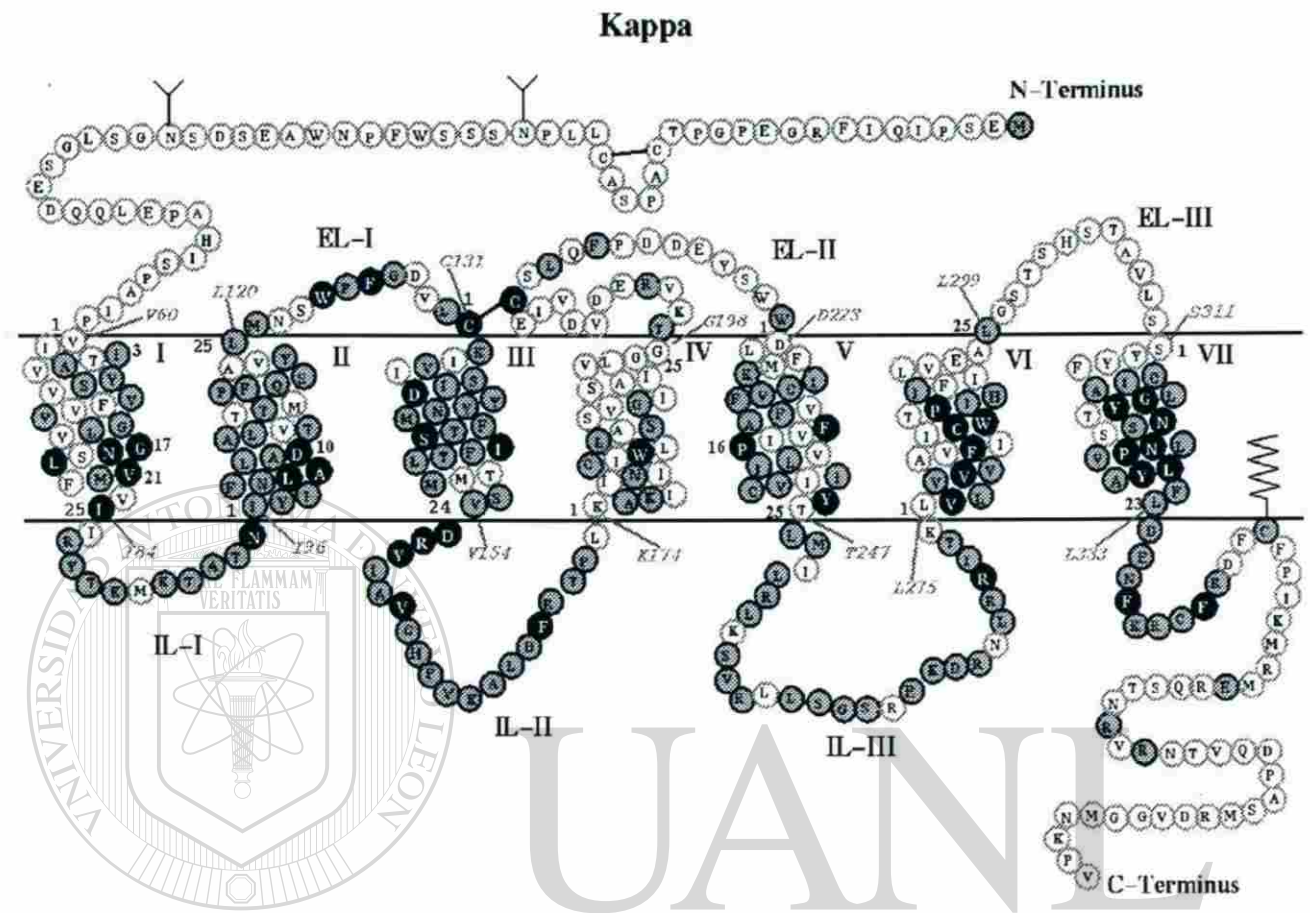


Figura 4. Receptor opioide *delta*. Las encefalinas resultan ser los ligandos endógenos de los receptores *delta*. La estimulación de los receptores *delta* produce analgesia y efectos de refuerzo positivo (potenciación) a nivel de los sitios suprarraquídeos, y antinocicepción para los estímulos térmicos a nivel de los sitios raquídeos. Adaptado de Villarejo-Díaz, M. y cols, 2000.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Figura 5. Receptor opioide *kappa*. Los receptores *kappa* producen analgesia a nivel raquídeo, y la dinorfina A es el ligando endógeno más selectivo del receptor *kappa*. Los fármacos que interactúan de manera selectiva con los receptores *kappa* actúan principalmente a nivel de la médula espinal, y producen miosis y depresión respiratoria similar a los agonistas *mu*. En vez de euforia, los agonistas *kappa* tienen efectos psicotomiméticos disfóricos (sensaciones de desorientación, miedo, ansiedad y despersonalización). Adaptado de Villarejo-Díaz, M. y cols, 2000.

2.3. Mecanismos de modulación del sistema inmune por opioides

2.3.1. *Modulación Indirecta.* Actualmente se reconoce ampliamente la relación existente entre el sistema nervioso central (SNC) y el sistema inmune. El sistema inmune recibe señales del cerebro y el sistema neuroendocrino vía el sistema nervioso autónomo y hormonas; a su vez el, el sistema inmune envía información al cerebro vía citocinas. Se sabe que la sensibilidad del sistema inmune esta regulada en parte por este sistema de retroalimentación (Figura 6) (Dantzer y Kelley, 1989). En forma general, durante el estrés el cerebro induce la liberación de hormonas tales como los glucocorticoides, que no sólo producen analgesia, sino también causan inmunosupresión (Carr y cols, 1996; Rouveix, 1992; Roy y Loh, 1996). A su vez, las células del sistema inmune liberan citocinas que afectan al SNC (Dafny, 1985). Se puede entonces inferir que una sustancia que afecte al SNC podría alterar también al sistema inmune y viceversa.

Los opioides tienen la capacidad de mimetizar el efecto del estrés en la función inmune, debido a que estos activan al sistema endocrino (Figuras 6 y 7). La modulación indirecta del sistema inmune por opioides ocurre con la activación de receptores opioides dentro del sistema nervioso central (Schurr y cols, 1981; Weber y Pert, 1989, Carr y cols, 1996; Fecho y cols, 1996, Dafny y cols, 1985, Dafny y cols, 1988, Suo y Weber, 1998). Esta ruta puede involucrar vías secundarias, incluyendo el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) (Fecho y cols, 1996) y el sistema nervioso autónomo (Brinkman y cols, 1998, Hall y cols, 1998, Fecho y cols, 1996, Carr y cols, 1994).

La vía HPA es responsable de la producción de glucocorticoides por la corteza adrenal. La liberación de glucocorticoides representa una de las principales respuestas adaptativas al estrés (Munck y cols., 1984). El incremento en la secreción de glucocorticoides que ocurre debido al estrés, es inducido por estímulos que llegan al hipotálamo provocando la liberación de la hormona liberadora de corticotropina en los vasos portales hipofisarios (Owens, 1991). Esta hormona activa la producción de corticotropina por la pituitaria. La corticotropina a su vez, estimula la secreción sanguínea de glucocorticoides (cortisol, corticosterona, aldosterona) por la corteza adrenal.

Los glucocorticoides son potentes agentes catabólicos que promueven el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos, y además movilizan las reservas de energía y sirven como antagonistas fisiológicos de la insulina. Además participan en la regulación de la respuesta inmune e inflamación y se requieren para procesos que se asocian con la respuesta del huésped. Los glucocorticoides afectan una amplia variedad de funciones de los leucocitos mononucleares y polimorfonucleares (Miller, 1998; Tanaka, 1997; Webster, 1990; Audhya, 1991; Norbiato y cols., 1997; Norbiato, 1998). En forma general, los glucocorticoides son inmunosupresores, particularmente en respuestas inmunes celulares; sin embargo, también se han asociado con incrementos en la producción de anticuerpos y sobrevivencia y diferenciación de células de timo (Vacchio y cols., 1998). Una producción excesiva de glucocorticoides (mal funcionamiento de la vía HPA, o tumores ectópicos productores de corticotropina, depresión, estrés, alcoholismo o anorexia) altera el metabolismo y la conducta, e

induce inmunosupresión, lo cual a su vez puede desencadenar una mayor susceptibilidad a infecciones o cáncer. Por el contrario, una producción deficiente de glucocorticoides (alteración primaria o secundaria de las glándulas adrenales, o resistencia esteroideal en los tejidos del huésped), hace al individuo más vulnerable al estrés e incrementa la patogénesis de enfermedades autoinmunes, inflamatorias, y alérgicas.

Además de la vía HPA, el sistema nervioso autónomo (SNA) también puede regular al sistema inmune. Se ha demostrado innervación simpática y parasimpática en los órganos linfoides. Los neuropéptidos que se liberan en los sitios de inflamación por los nervios periféricos, cumplen una función parácrina en la regulación de los procesos inflamatorios (Payan, 1987). El SNA innerva al corazón, los vasos sanguíneos, las vísceras, los músculos, las glándulas exócrinas, algunas glándulas endocrinas y los tejidos linfoides. Este sistema regula funciones que no están bajo el control de la conciencia, como la función cardiovascular, la respiración, la digestión, la excreción, la temperatura corporal, el metabolismo, la sudoración, y otras secreciones exócrinas y aspectos de las funciones inmune y endocrina.

Los tejidos más especializados en el sistema inmune los constituyen la médula ósea y el timo (tejidos linfoides primarios), el bazo y los ganglios linfáticos (tejido linfoide secundario), y los tejidos linfoides asociados a las mucosas incluyendo las amígdalas y las placas de Peyer. Existe evidencia de que los compartimientos parenquimatosos de los tejidos linfoides están innervados, lo que sugiere que el SNA regula las respuestas inmunes directamente a través de contactos celulares con células del sistema inmune, células del estroma, y células

accesorias. Estas conexiones permiten la regulación neural homeostática de las respuestas inmunes adaptativas (Valenta y cols., 1993; Downing y Kendall, 1996).

Se ha demostrado además la presencia de receptores específicos en los linfocitos para una variedad de neuropéptidos (incluyendo a la sustancia P, la somatostatina, el péptido intestinal vasoactivo inmunoreactivo, y opioides) y catecolaminas (adrenoceptores α_1 , α_2 , y β_2), mediante perfiles farmacológicos y estudios de unión de ligandos. También se ha descrito a la sustancia P, el péptido intestinal vasoactivo inmunoreactivo y la somatostatina como ligandos para las células T y B; mientras que el neuropéptido Y se une a los linfocitos de bazo. Además, se han descrito receptores para la dopamina y la acetilcolina (muscarínico y nicotínico) en los linfocitos.

Las respuesta del sistema inmune a la activación simpática (generalmente mediada a través de adrenoceptores- β_2), es de supresión con respecto a la respuesta inmune celular, y es potenciadora en relación a la producción de anticuerpos.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

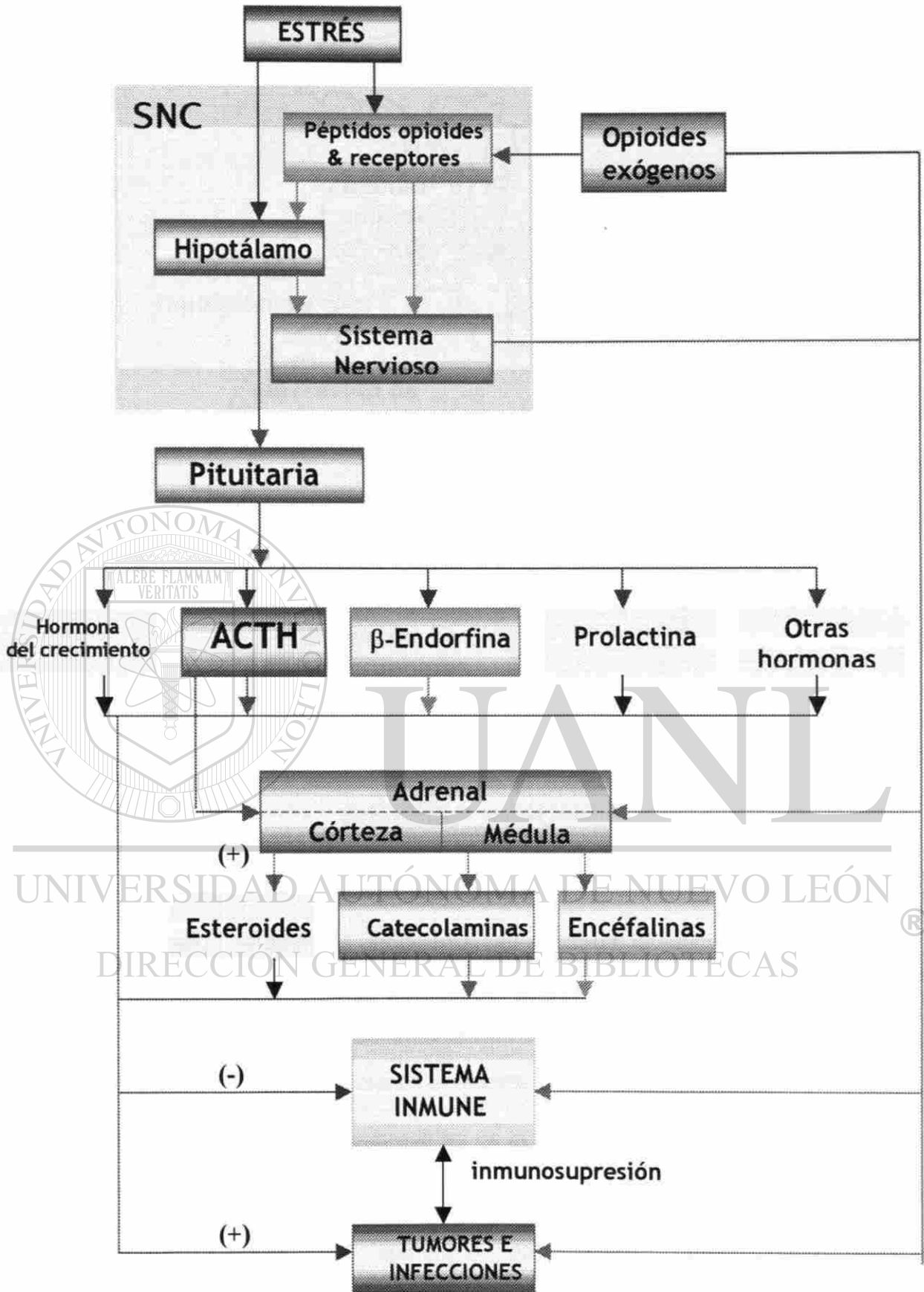
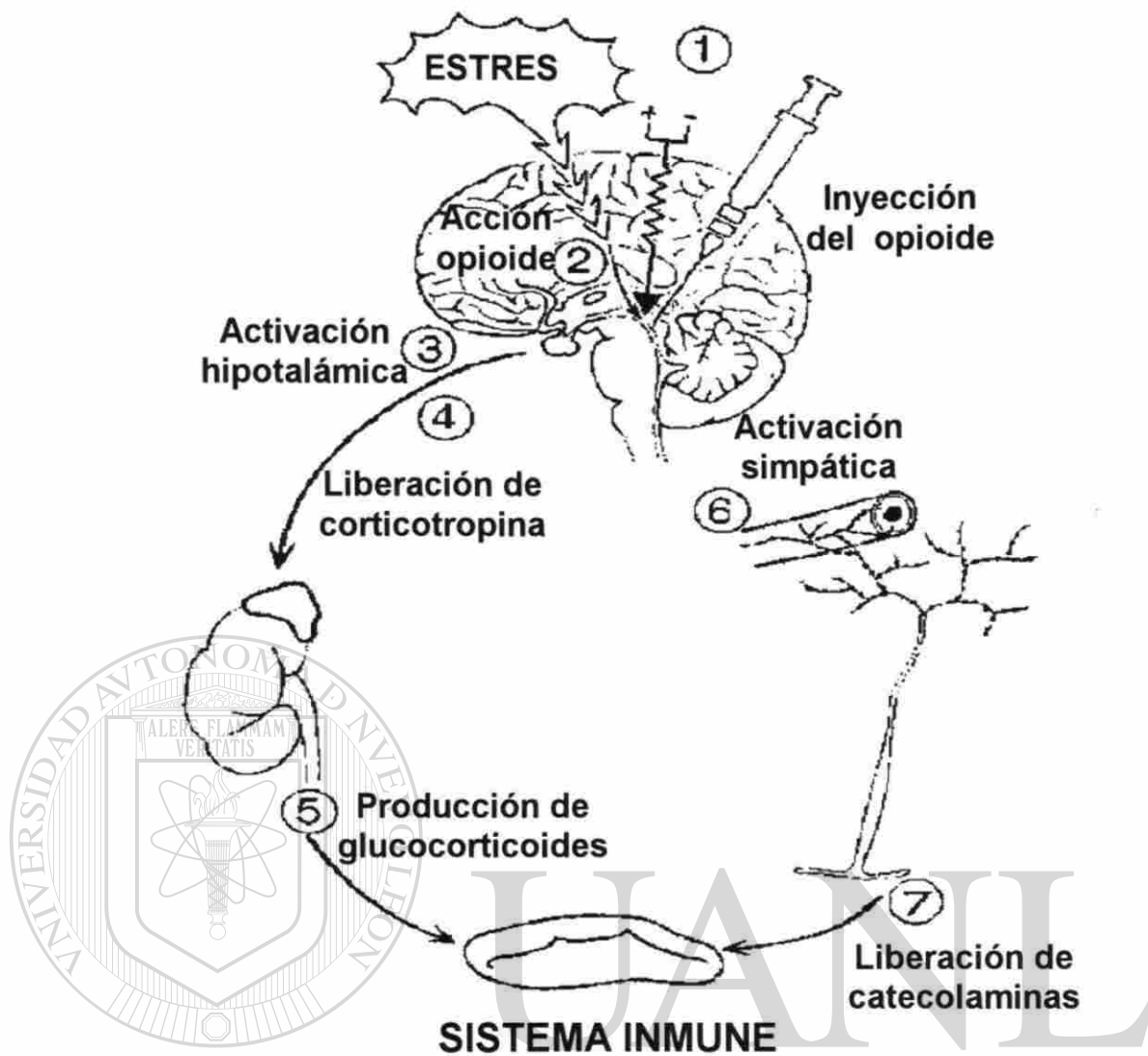


Figura 6. Sistema de retroalimentación entre los sistemas nervioso, endocrino e inmune. (Adaptado de Shavit y cols, 1985).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Figura 7. La liberación de opioides endógenos por el estrés, la estimulación eléctrica de la materia gris periférica al acueducto mesencefálico (PAG) mesencefálico, o la inyección de opioides exógenos puede resultar en la

- 2, activación de la vía hipotálamica-pituitaria-adrenal (HPA) con la
- 3, secreción de la hormona liberadora de corticotropina, seguido de la
- 4, liberación de corticotropina y la
- 5, producción de glucocorticoides supresores de la función inmunológica.

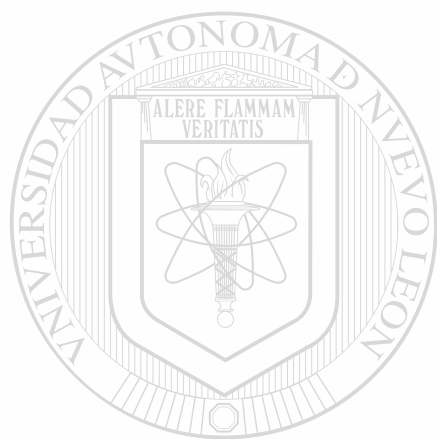
En forma alterna, las etapas 1 y 2 podrían activar 6, al sistema nervioso simpático y estimular a las terminaciones nerviosas del tejido linfóide, lo cual induce la 7, liberación de catecolaminas (epinefrina, dopamina) u otros neurotransmisores inmunomoduladores causantes de inmunosupresión.

La función fisiológica de estas vías podría ser el de ayudar a restaurar alteraciones en el sistema inmune, permitiendo al organismo a volver a su estado normal, antes de que ocurriera la activación.

2.3.2. *Modulación directa.* Los opioides inducen la mayoría de sus efectos farmacológicos en el sistema nervioso (Cuadro 4), sin embargo, también interactúan con el sistema inmune alterando la función de los macrófagos, linfocitos y células NK. La actividad opioide directa sobre el sistema inmune depende de su unión a receptores de alta afinidad llamados μ , κ , y δ presentes en la superficie de las células del sistema inmune. (Rouveix, 1992) (Figuras 3-5). Dichos receptores muestran diferentes patrones de selectividad de ligando, saturabilidad y afinidad nanomolar para los opioides (Sibinga y Goldstein, 1988). La presencia de receptores de opioides en las células del sistema inmune se han inferido en forma indirecta mediante el uso de antagonistas selectivos de receptores de opioides de las clases μ , κ , y δ . Sin embargo, los sitios de unión de opioides a linfocitos y macrófagos se han identificado con radioisótopos o fluorocromos, o mediante la identificación de los genes responsables de la expresión de receptores de opioides (Gómez-Flores y Weber, 1999b).

La utilización de pruebas de unión competitiva con ligandos radiomarcados tales como la naloxona, la U-69593, la cis-(+)-3-metilfentanilisotio-cianato (SUPERFIT) y la dihidromorfina tritadas, o fluorocromos como el isotiocianato de fluoresceína acoplado a naltrexona y el 1-(N).fluoresceinil tiosemicarbazona de naloxona (6-FN) (Bidlack y cols, 1996; Carr y cols, 1989), ha permitido la identificación de sitios de unión de opioides en la superficie de los linfocitos y monocitos humanos (Carr y cols, 1988), linfocitos y macrófagos murinos (Patrini y cols, 1996), linfocitos, macrófagos y neutrófilos de rata (Lang y cols, 1995) y en líneas celulares murinas linfoides y mieloides (Carr y cols, 1989).

Además, se ha demostrado la expresión de genes para receptores de opioides en linfocitos y monocitos humanos (Gaveriaux y cols, 1995), linfocitos de monos (Chuang y cols, 1994), líneas celulares linfoides humanas, linfocitos humanos y líneas celulares linfoides murinas (Gaveriaux y cols, 1995), linfocitos humanos (Gaveriaux-Ruff y cols, 1995) y macrófagos de rata (Sedqui y cols, 1995), mediante la amplificación del ARN utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa. (Cuadro 5).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro 5. Presencia de receptores opioides en células del sistema inmune

Células blanco	Ensayo	Ligando/RNAM	Tipo de receptor identificado	Referencia
Linfocitos humanos y plaquetas	Unión competitiva con naloxona [³ H]	morfina y naloxona	μ	Mehrishi y Mills, 1983
Monocitos humanos	Unión competitiva con dihidromorfina [³ H]	morfina dihidroximorfina naloxona naltrexona	μ	Stefano y cols, 1993
Linfocitos, monocitos y neutrofilos de rata	Unión competitiva con naltrexona - FITC	naltrexona DADLE DAMGO	μ,δ	Lang y cols, 1995
Linfocitos humanos y de mono	Transcriptasa Reversa - PCR	RNAM	δ	Chuang y cols, 1995
Linfocitos y monocitos humanos	Transcriptasa Reversa - PCR	RNAM	κ,δ (humano) δ (ratón)	Gaveriaux y cols, 1995
Células mononucleares de sangre periférica humana	Transcriptasa Reversa - PCR	RNAM	receptor opioide huérfano	Wick y cols, 1995 [®]
Macrófagos peritoneales de rata	Transcriptasa Reversa - PCR	RNAM	μ	Sedqi y cols, 1995

Adaptado de. Gomez-Flores y Weber (1999b).

2.4 Modulación opioide del sistema inmune

En los procesos de defensa inmune participan una serie de células originadas en la médula ósea. Estas células son los polimorfonucleares, los monocitos y los linfocitos. Todas ellas provienen de una célula pluripotencial (o célula madre) que se multiplica continuamente a nivel de médula ósea; ésta célula da origen a grupos de células que empiezan a desarrollarse en una sola línea, ya sea la monocítica, la mielocítica o la linfocítica (Figura 8). Los monocitos al entrar en circulación y, al pasar de los vasos sanguíneos a los tejidos se transforman en macrófagos. Los linfocitos al salir de la médula ósea, migran hacia los órganos linfoides para colonizarlos y allí se multiplican. (Rojas, 1986). Los compuestos opioides son capaces de modular la naturaleza y magnitud de la respuesta de estas células durante un reto antigénico.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

El caso ejemplar de esta interacción es la morfina, la cual administrada *in vivo*, suprime una variedad de respuestas inmunes en donde se afectan las funciones de las células asesinas naturales (NK), linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (Eisenstein y Hilburger, 1998; Weber y Pert, 1989, Gómez-Flores y cols, 1998a, 1999a, 2000). Figura 9.

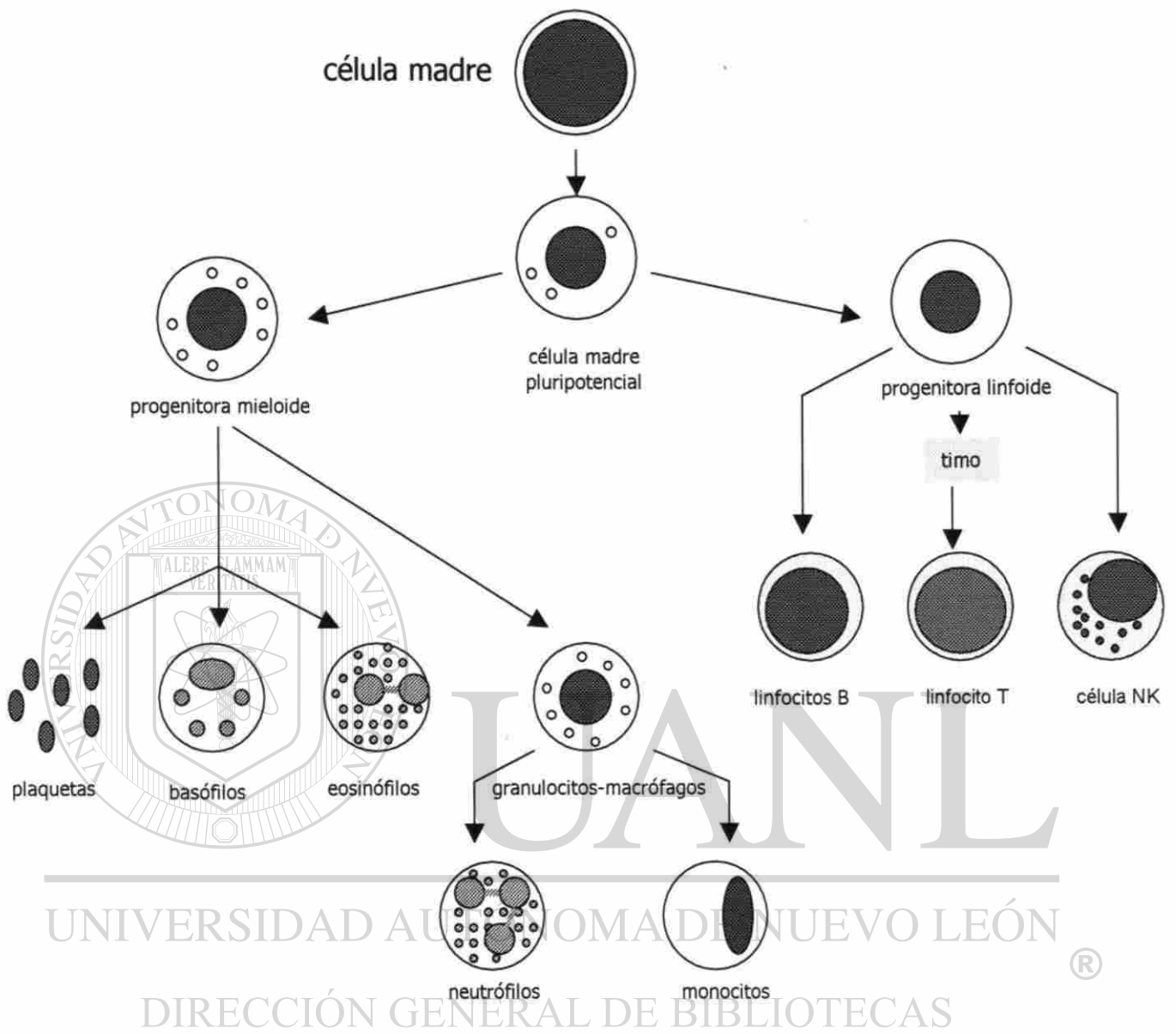


Figura 8. Generación de las estirpes celulares del sistema inmune. Adaptado de Abbas (1998).

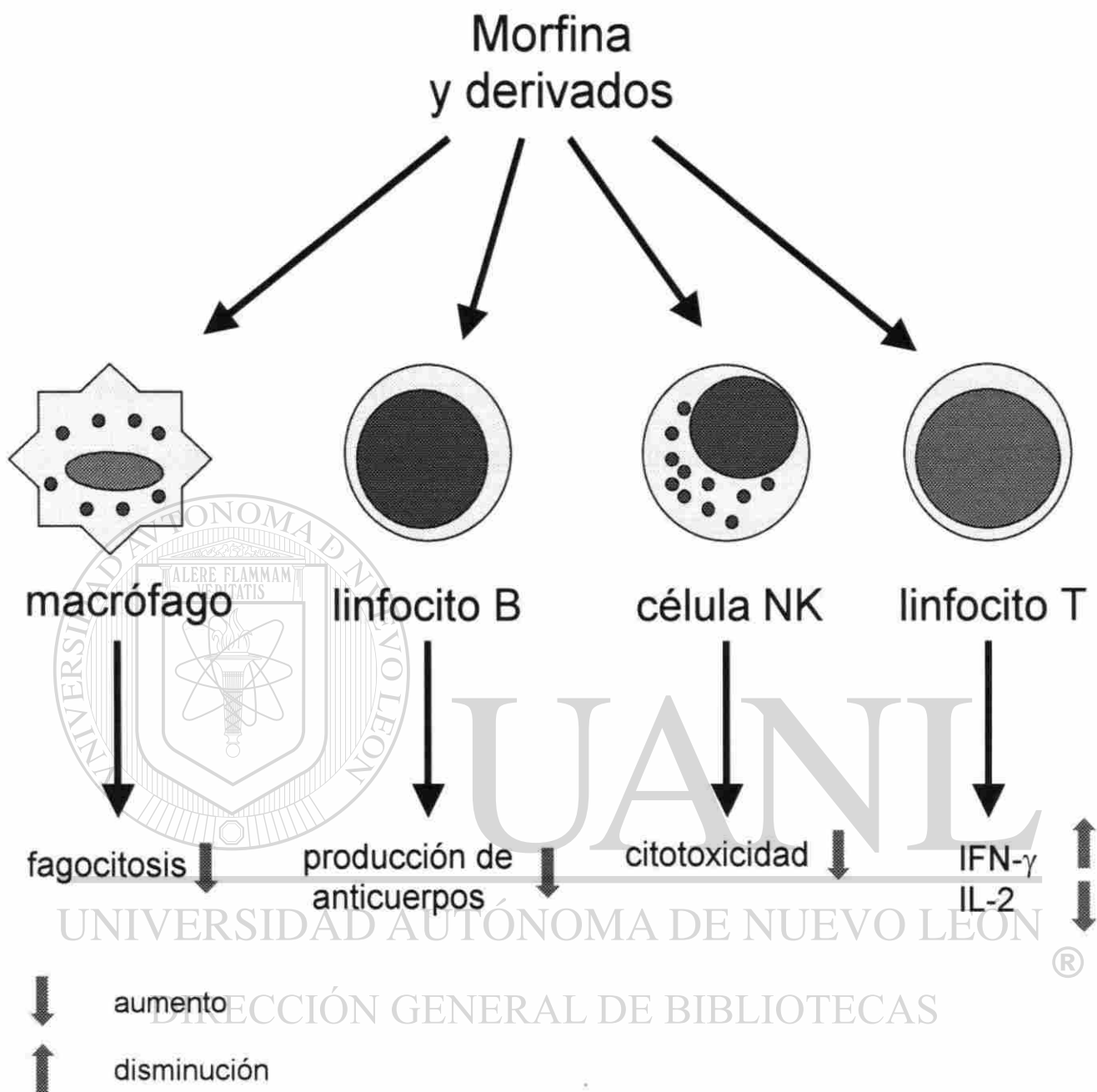


Figura 9. Modulación del sistema inmune por morfina.

2.4.1 Modulación opioide de las funciones de linfocitos

Los linfocitos son responsables por la presentación de antígeno, efectos citotóxicos, y producción de anticuerpos y citocinas (moléculas que modulan la respuesta inmune) (Rojas, 1986). Los linfocitos responden al reto antigénico proliferando y expandiendo las clonas específicas de antígeno para amplificar las respuestas inmunes (Figura 10) Cualquier atenuación de la función de células T puede llevar a una amplia supresión inmunológica incrementando así la probabilidad de sufrir de cáncer o enfermedades infecciosas tales, como las causadas por el VIH y tuberculosis.

Se cree que el efecto inmunosupresor de la morfina sobre linfocitos es mediado por mecanismos indirectos, la evidencia consiste en una serie de experimentos en los cuales se emplearon ratones tratados con morfina (implantación subcutánea), en los cultivos *ex-vivo* se pudo observar que los linfocitos de bazo se volvieron disfuncionales, así como también hubo una importante supresión de la producción de células formadoras de anticuerpos. En contraste la adición directa de morfina a cultivos de linfocitos de bazo no tuvo efecto en los parámetros mencionados. Aunado a esto, la adición a los cultivos *ex-vivo* del antagonista glucocorticoide RU 38486 bloqueó la supresión de la producción de células formadoras de anticuerpo, lo que sugiere que los glucocorticoides podrían formar parte de este mecanismo indirecto de inmunosupresión (Pruett y cols, 1992).

Otros efectos relacionados con la administración de morfina incluyen la supresión de la producción de IL-2 inducida por mitógenos en ratones transgénicos, también se ha observado reducción en la actividad de las células asesinas naturales de bazo y los linfocitos citotóxicos (CTL) (Garza y cols, 1994; Carpenter y cols, 1994; Scott y Carr, 1996). La morfina tiene también un efecto supresor en la función de los neutrófilos *in vivo*, al disminuir la quimiotaxis del neutrófilo, (Deitch y cols, 1988).

La aplicación diaria de morfina suprime la actividad de las células mononucleares de sangre periférica de monos rhesus (*Macaca mulata*), las células NK, así como el porcentaje de células CD⁸⁺CD¹⁶⁺ en comparación con los grupos no tratados (Carr y France, 1993). Estudios adicionales han mostrado que la morfina regula eventos moleculares que se manifiestan en la alteración de la función inmune, incluyendo la activación de linfocitos T y producción de IL-2 (Carr y cols, 1995).

La materia gris del acueducto del mesencéfalo (PAG) es un blanco importante de la acción de opioides y se ha sugerido la existencia de subpoblaciones de receptores opiáceos en esta área del cerebro Schurr y cols, (1981), Weber y Pert (1989), Suo y Weber (1998), y Gómez-Flores y Weber (1999a, 2000) han demostrado que la morfina inyectada en el PAG de ratas suprime las funciones de las células asesinas naturales de bazo y la respuesta proliferativa de los linfocitos T a varios mitógenos al reducir la capacidad de las células T de producir IL-2.

Sin embargo, la modulación de la respuesta inmune es un fenómeno complejo, como lo demuestran diversos estudios donde se ha observado que opioides endógenos o morfina son capaces de estimular la respuesta inmune, Kraut y Greenberg (1986) observaron que la administración intraperitoneal de morfina o (D-Ala₂-Met₅)-beta-endorfina, un análogo estable de la beta-endorfina, estimulan *in vivo* la actividad de las células NK de bazo.

En forma general se ha observado que los péptidos opioides pueden aumentar la generación de linfocitos CTLs (Carr y Klimpel, 1986), este efecto puede ser bloqueado por el antagonista opioide naloxona, lo cual confirma la actividad opioide. Otros efectos observados de péptidos opioides incluyen la regulación de la producción de IL-1 por β -endorfina, la supresión de la actividad de las células NK (Shavit y cols, 1984), la disminución en la capacidad de linfocitos para responder a estimulación mitogénica (Deitch y cols, 1988), el aumento en la generación de linfocitos CTLs por β -endorfina y met-enkefalina (Carr y Klimpel, 1986).

El diseño y desarrollo de opioides sintéticos con actividad analgésica y libres de las desventajas que representan la inmunosupresión y el potencial de adicción ha generado compuestos con actividad inmunomoduladora variada. El agonista opioide μ 4-tirosilamido-6-bencil-1,2,3,4, tetrahydroquinolina (CGPM-9), tiene un efecto dual sobre la función inmune *in vitro*, ya que produce un aumento en la respuesta proliferativa de linfocitos a la Con A y a su vez tiene un efecto supresor sobre la actividad de macrófagos peritoneales de ratas (Hicks y cols, 2001).

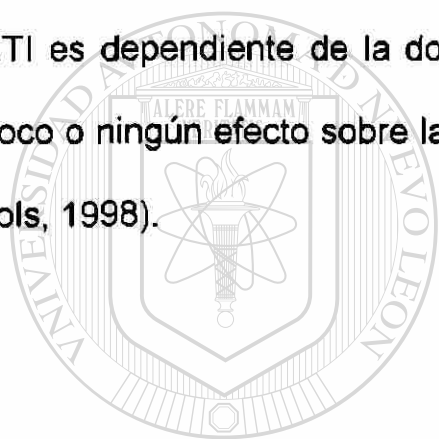
El fentanil (*N*-fenil-*N*-[1-2-feniletíl]-4-piperidinil] propanamida), un derivado semisintético de la morfina, al ser administrado en forma subcutánea induce supresión de la actividad de las células NK, mientras que uno de sus derivados, el OHM3295, la aumenta, ambos resultados fueron reversibles por la naltrexona (Carr y cols, 1994).

Mientras que el agonista opioide selectivo para receptores delta BW373U86 tiene un muy escaso potencial para el empleo terapéutico debido a su escasa capacidad analgésica, actividad convulsiva pronunciada y poca selectividad por los receptores *delta* y *mu* (Chang y cols, 1993, Wild y cols, 1993). Sin embargo, uno de sus derivados, el SNC80 (figura 11), sintetizado por Calderón y cols (1994), ha mostrado un gran potencial clínico ya que presenta una selectividad mucho mayor por los receptores opioides *delta* y *mu* que el compuesto original (hasta 500 veces mayor), esta selectividad además es muy parecida a la de los agonistas opioides más selectivos. Los hallazgos obtenidos de los estudios *in vivo* sugieren que el SNC80 puede ser más selectivo, eficaz y seguro que BW373U86 y puede representar un avance prometedor en el desarrollo de analgésicos (Negus y cols, 1998). Nowak y cols. (1998) encontraron que la inyección intracerebroventricular de SNC80 no tiene efecto sobre las poblaciones de linfocitos T de bazo.

Ciertos opioides sintéticos selectivos para receptor opioide delta han mostrado acción moduladora de la proliferación *in vitro* de células T estimuladas con mitógeno. Se ha demostrado que el naltrindol (NTI) suprime la respuesta inmune en la reacción mixta de linfocitos en rata (Arakawa y cols, 1993).

In vitro, el benzilideno-naltrexona (BNTX) (Cuadro 8, en la sección Materiales y métodos), suprime la proliferación de células B, la producción de citocinas por células T cooperadoras y la actividad de las células NK (Portoghese, 1993; House y cols, 1995)

Los estudios realizados con compuestos derivados del NTI y BNTX, muestran que los derivados del NTI inducen una mayor potenciación de la proliferación de linfocitos estimulados con mitógeno que la obtenida en las mismas condiciones con BNTX. la potenciación inducida por los derivados del NTI es dependiente de la dosis, mientras que los derivados del BNTX tienen poco o ningún efecto sobre la proliferación de linfocitos tímicos de rata (Riley y cols, 1998).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

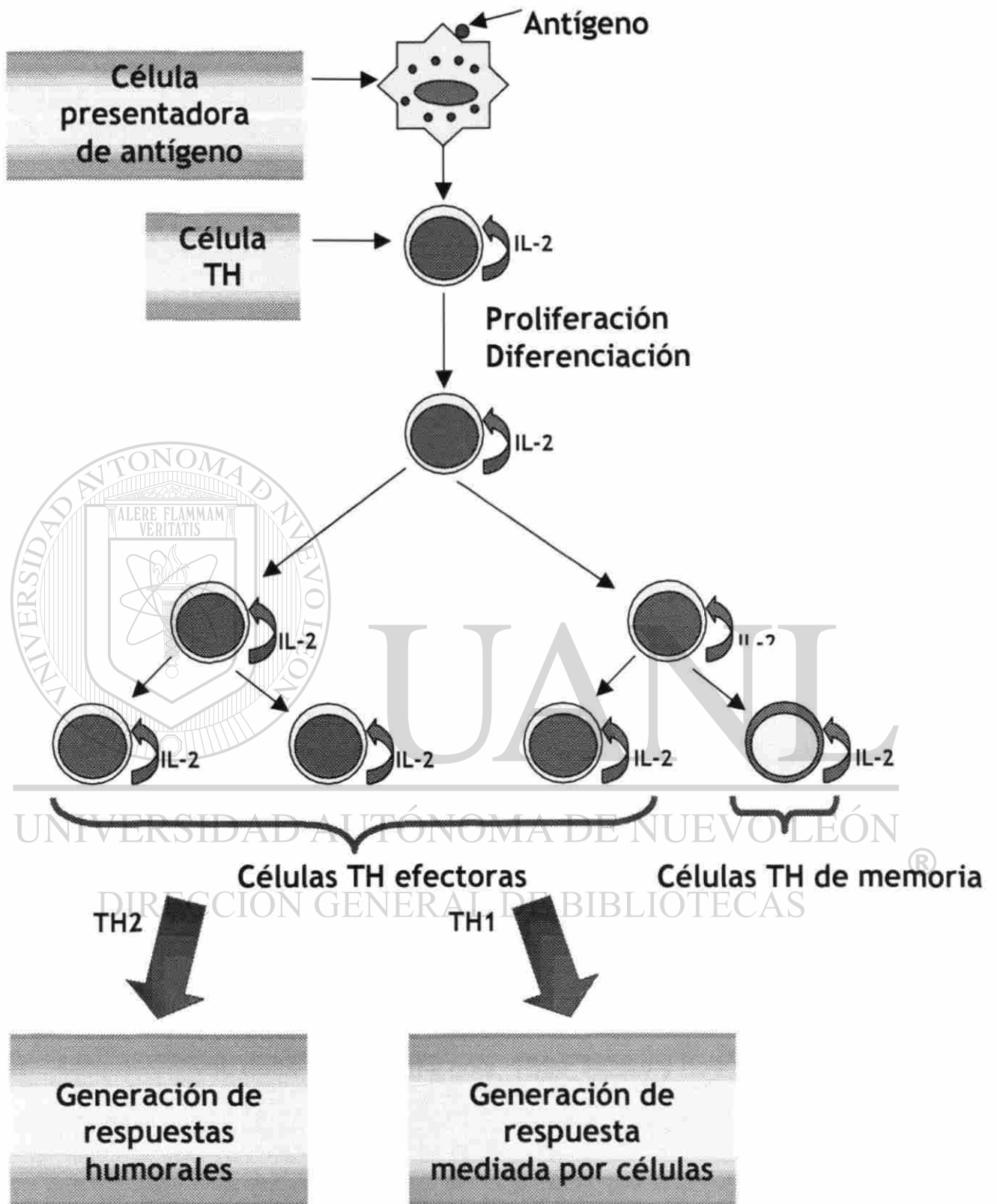


Figura 10. Proliferación clonal de linfocitos. La determinación de la proliferación de linfocitos como consecuencia de la estimulación (exposición a agentes mitogénicos, estímulos policlonales o antígenos específicos) es una técnica fundamental para estudiar las respuestas de linfocitos T.

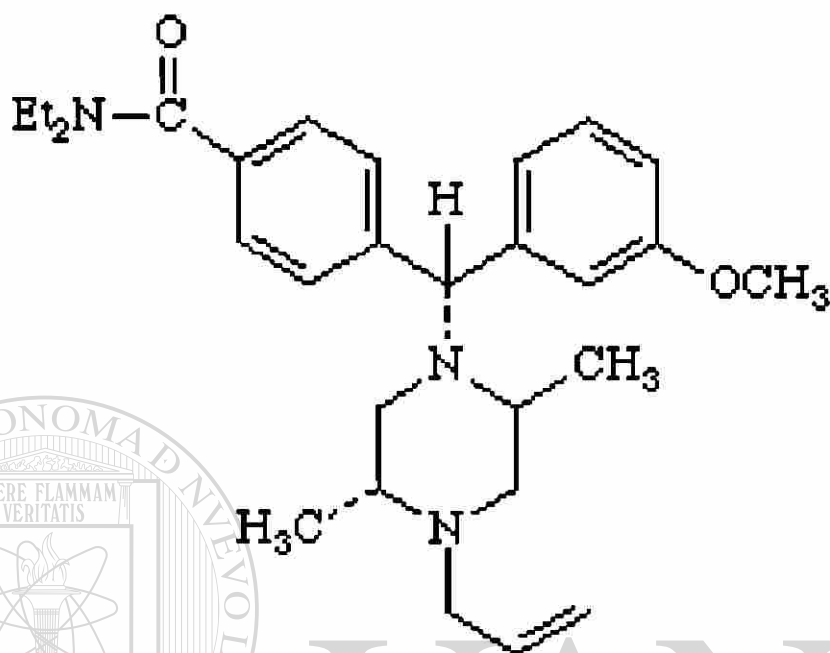


Figura 11. El SNC80 es el derivado O-metilado del compuesto (+)-BW373U86, tiene una afinidad de ~ 1 nM por los receptores opioides delta. Además, el SNC80 tiene una selectividad 500 veces mayor por los receptores *delta* vs *mu*, la cual es mucho mayor que la selectividad de receptor exhibida por el compuesto BW373U86 y es similar a la de la mayoría de los agonistas peptídicos selectivos delta (Calderon y cols, 1994; Bilsky y cols, 1995)

2.4.2 Modulación opioide de las funciones de macrófagos

Los macrófagos pertenecen al sistema de fagocitos mononucleares, el cual incluye células que tienen un origen común y que comparten características morfológicas, bioquímicas y funcionales. Todos los macrófagos presentes en las cavidades serosas (por ejemplo, los macrófagos peritoneales) y tejidos derivan de los monocitos de la sangre que a su vez se originan de una célula precursora de la médula ósea.

Los macrófagos tienen como función esencial impedir el establecimiento y la diseminación de enfermedades microbianas (Mackaness, 1962; Steigbigel y cols, 1974) y neoplásicas (Adams y Snyderman, 1979; Adams y cols, 1982). Además, los macrófagos actúan como células accesorias en la inducción y expresión de las respuestas inmunes humoral y celular. Los macrófagos con actividad inespecífica microbiana y/o tumorícida son definidos como macrófagos "activados". La activación de macrófagos es por etapas. Los macrófagos se sensibilizan o preactivan después de un estímulo inicial (linfocinas, por ejemplo), y finalmente se estimulan por una segunda señal (por ejemplo, endotoxina). La activación de la función antimicrobiana del macrófago es esencial para la sobrevivencia de las especies en contra de patógenos intracelulares que causan algunas de las enfermedades infecciosas de mayor prevalencia e importancia en el mundo (Nathan y Gabay, 1992) (Figura 12).

2.4.2.1. Modulación opioide de la producción de óxido nítrico

Uno de los principales factores antimicrobianos producidos por macrófagos murinos que son estimulados por citocinas, son los intermediarios reactivos del nitrógeno (IRN) (Bermudez y Young, 1989; Stuehr y Marletta, 1985) (Figura 13). De estos el óxido nítrico es el más estudiado de aquellos relevantes en la actividad antimicrobiana de macrófagos murinos en contra de infecciones causadas por patógenos como *Listeria*, *Mycobacterium* y *Toxoplasma* (Nathan y Hibbs Jr, 1991; Becjerman y cols, 1993; Gómez-Flores y cols, 1997a). Estudios más recientes sugieren que el óxido nítrico tiene también actividad antitumoral (Hibbs Jr y cols, 1988).

Se ha observado que la morfina y el DAMGO alteran la producción de óxido nítrico (inhibición y estimulación, respectivamente), por cultivos primarios de macrófagos de diferentes orígenes (Gómez-Flores y cols, 1998 a y b; Fecho y cols, 1996; Schneider y Lyle, 1996).

La producción de óxido nítrico por macrófagos murinos activados con LPS es inhibida por la morfina, mientras que el DPEF y la deltorfina (agonistas delta) no afectan la generación del mismo (Iuvone y cols. 1995), también se ha observado que la habilidad de la morfina para afectar la producción de óxido nítrico depende del período de activación con LPS, cuando la morfina es aplicada después de la activación con LPS no existe inhibición de la producción de óxido nítrico. Esto sugiere que la morfina podría actuar inhibiendo la inducción, mas no la actividad de la sintasa inducible de óxido nítrico, estas observaciones han encontrado apoyo en estudios posteriores.

Por ejemplo, se ha encontrado que la met-enkefalina es capaz de modular la respuesta inmune al controlar la producción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales activados con LPS, (Kowalski, 1998), estimulándola, mientras que la enkefalina U-504,88 la disminuye, los hallazgos de este trabajo sugieren que el efecto de los opioides sobre la síntesis de óxido nítrico sucede a un nivel transcripcional, ya que en los cultivos con al menos 8 horas de activación no se observaron efectos a consecuencia del tratamiento opioide, por lo que se presume que los opioides no actúan sobre la forma activa de sintasa inducible de óxido nítrico, sino durante su transcripción.

Recientemente, Nowak y cols. (1998) observaron que la administración intracerebroventricular del SNC80 no afecta la producción de óxido nítrico inducido por interferón- γ (IFN- γ) o LPS, por macrófagos de bazo de rata.

En contraste en los experimentos *in vitro* el SNC80 es capaz de estimular la producción de óxido nítrico producido por macrófagos peritoneales residentes de rata, estimulados con LPS. La administración intravenosa de SNC80 también activa la producción de óxido nítrico por macrófagos residentes de bazo (Gómez-Flores y cols, 2001)

2.4.2.2. Modulación opioide de la producción de TNF- α

El TNF- α es una de las citocinas más pleiotrópicas conocidas, y comparte varias propiedades con otras citocinas. Se pueden distinguir dos clases de TNF: el TNF- α y el TNF- β . El TNF- α es producido principalmente por

macrófagos activados, sin embargo, las células NK, ciertas células linfoblastoides-B, los linfocitos T, las células cebadas, los astrocitos, las células de Kupffer, las células de granulosa y las células de músculo liso también tienen la capacidad de producirlo. El TNF- β es producido por linfocitos activados.

El TNF- α participa en la respuesta inmune en contra de neoplasias y enfermedades infecciosas, en remodelaje y reparación tisular y en angiogénesis además es capaz de causar hemorragia y necrosis de tumores sólidos (Rege y cols, 1992), y puede causar caquexia, que es un estado patológico que se observa durante infecciones por bacterias gram negativas, o que puede ser inducido por inyección parenteral de endotoxina. En su papel como agente antimicrobiano, el TNF- α promueve la resistencia inespecífica de ratones en contra de bacterias, parásitos y hongos (Rege y cols, 1992; Prant y cols, 1987; Freudenberg y Galanos, 1991; Gómez-Flores y cols, 1997a).

Se ha reportado que la morfina, la MENK y el U50, 488 inhiben la producción del TNF- α por macrófagos (Gómez-Flores y cols, 1998). Sin embargo otros han demostrado que la morfina y la DYN-A activan la producción del TNF- α por las células de microglia (Chao y cols, 1994) y macrófagos murinos (Peng y cols, 2000)

Nowak y cols. (1998) observaron que la administración intracerebroventricular del SNC80 no afectó la producción de TNF- α inducido por LPS por macrófagos de bazo de rata. Mientras que en los experimentos *in vitro* el SNC 80 es capaz de estimular la producción de TNF- α producidos por macrófagos peritoneales residentes de rata, estimulados con LPS. Además, la

administración intravenosa de SNC80 también activa la producción de TNF- α por macrófagos de bazo residentes y aumenta la producción de TNF- α por macrófagos de bazo también estimulados con LPS.

2.4.2.3. Modulación opioide de la fagocitosis por macrófagos

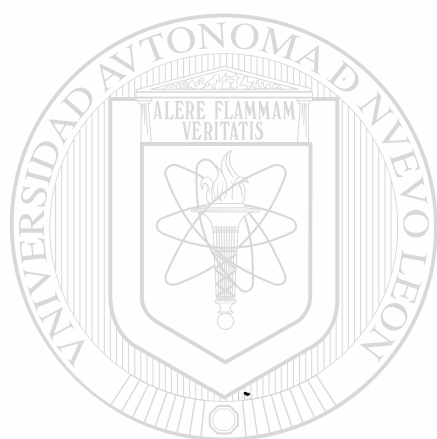
La fagocitosis o endocitosis de parásitos por los macrófagos es la primera etapa de una serie de eventos que inducen la muerte intracelular de parásitos. Una vez que han sido ingeridos los patógenos, los macrófagos los matan mediante la generación de intermediarios reactivos del oxígeno y nitrógeno, o bien TNF- α .

La DAMEA, la LENK, la encefalinamida, la MENK, el DAMGO, el DPDPE y el alfentanil inhiben la fagocitosis eritrocitos de cordero y *Candida albicans* por macrófagos de diferentes orígenes (Casellas y cols, 1991, Szabo y cols, 1993, Carrera y cols, 1992, Gómez-Flores y cols, 1998).

La morfina *in vivo* también puede inhibir la capacidad de los macrófagos peritoneales para fagocitar la levadura patógena *Candida albicans*, de acuerdo a las observaciones de Tubaro y cols (1983), Rojavin y cols. (1993), Pacifici y cols. (1993)

Los resultados obtenidos en los estudios con macrófagos junto con las observaciones en linfocitos, indican que el SNC80 puede ser útil en el tratamiento del dolor en pacientes inmunocomprometidos, ya que posee

propiedades analgésicas, y tiene capacidad de potenciar las respuestas inmunológicas (Gómez-Flores y cols., 1999).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

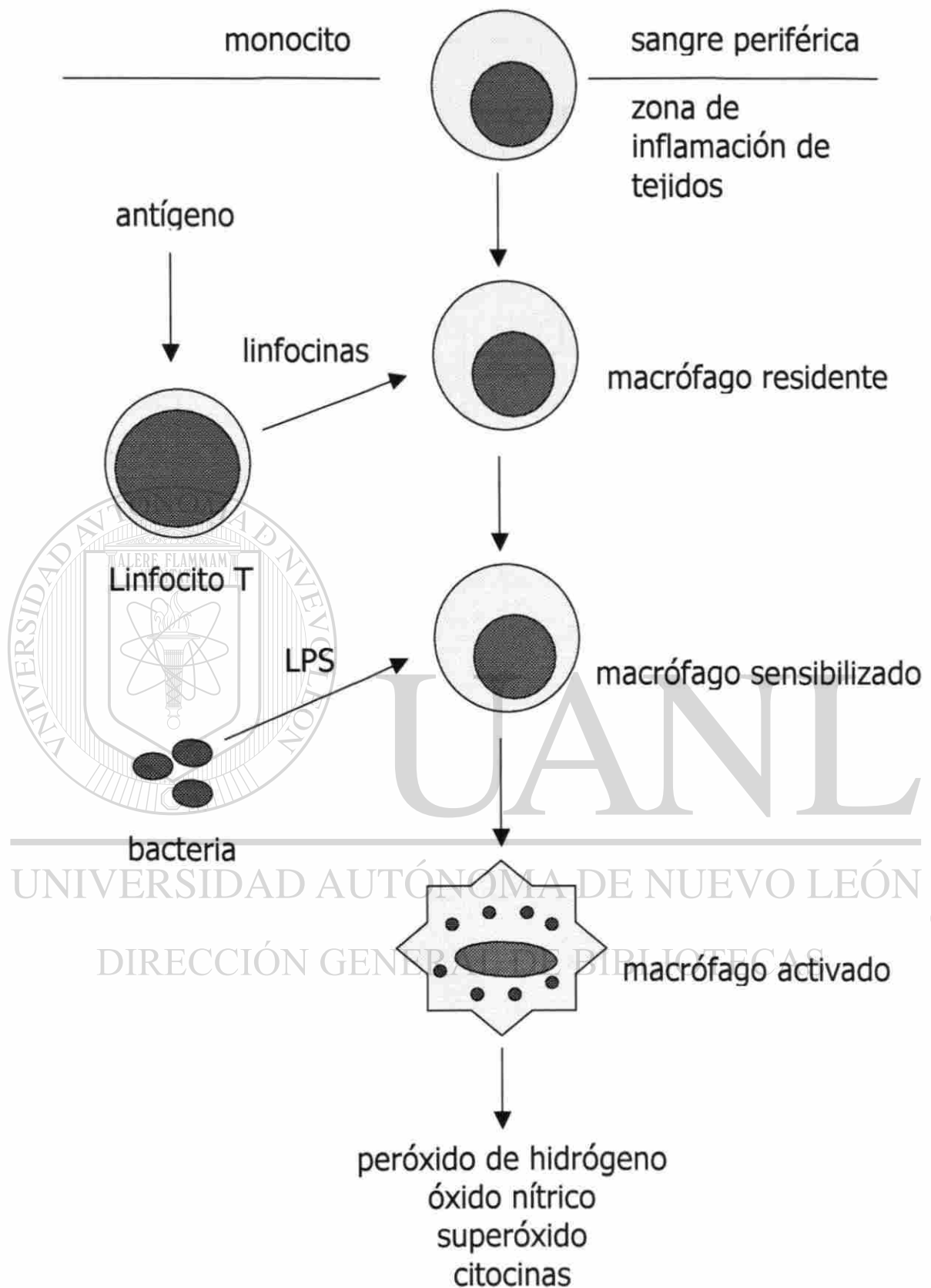


Figura 12. Activación de macrófagos. (Adaptado de Meltzer, J. Reticuloendothel. Soc. 26:403-415, 1979)

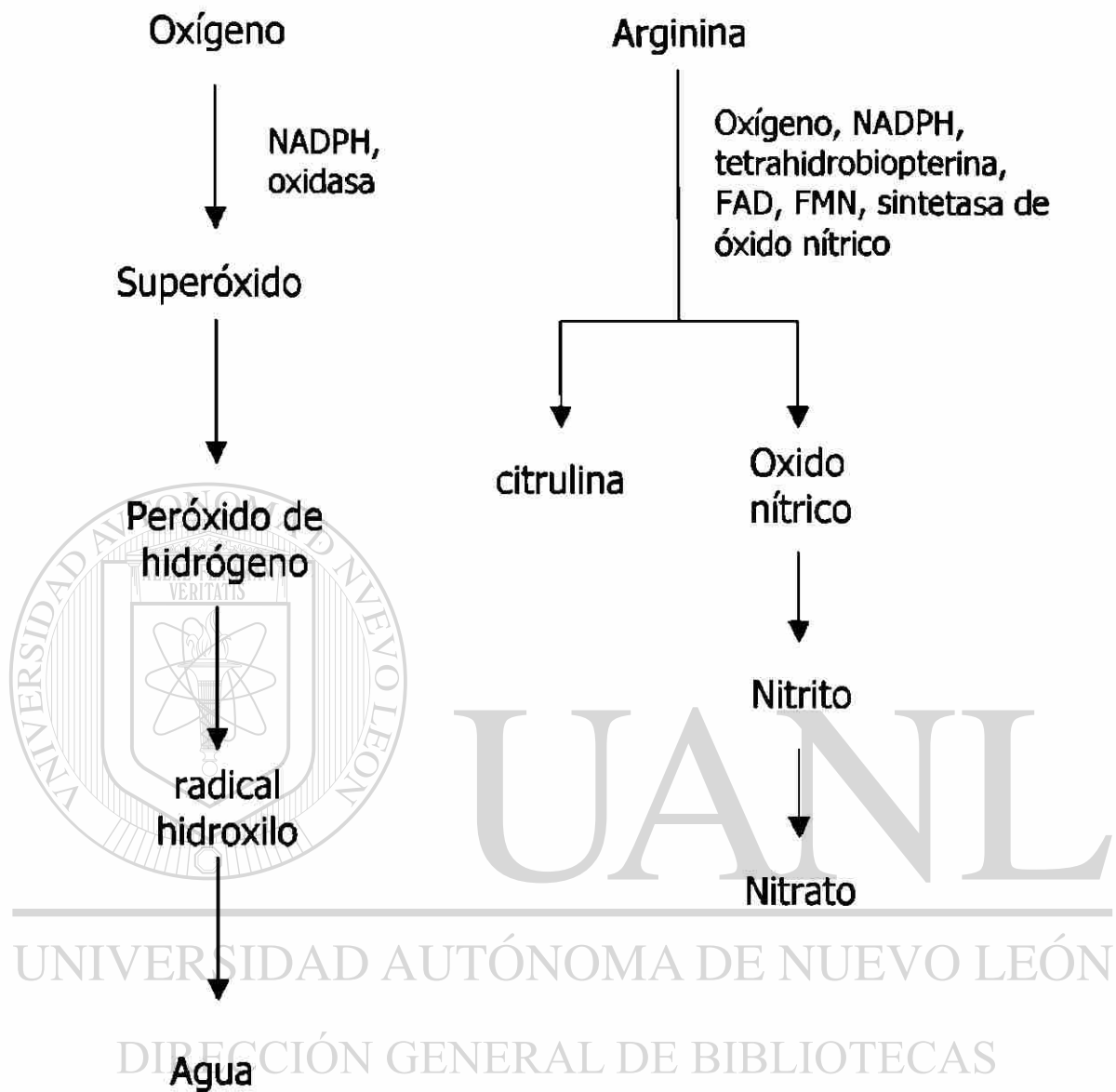


Figura 13. Vías para la producción de oxidantes inorgánicos por macrófagos activados (Adaptada de R. van Furth, Mononuclear Phagocytes, 1992).

2.4.3 Actividad antitumoral de opioides

El estudio del papel de los opioides en la regulación de diversos sistemas biológicos es un área que abarca numerosas disciplinas, como la neurobiología, inmunología, endocrinología y la oncología en aspectos como el papel de los opioides en la terapia del dolor crónico debido a cáncer, la conexión estrés-sistema inmune- progresión del cáncer etc. (Conti, 2000).

Existe evidencia de que el sistema de opioides endógenos puede influir sobre el crecimiento y desarrollo tumoral, y en forma general se han propuesto dos mecanismos mediante los cuales puede ocurrir esto: 1) los opioides pueden modular la respuesta inmune antitumoral del hospedero o bien 2) los opioides pueden interactuar directamente con las células tumorales para causar citotoxicidad o inhibir proliferación (Murgo y cols, 1999) (Figura 14). Esta última posibilidad involucraría la presencia de receptores opioides en la superficie de células tumorales (Cuadro 6), por lo que opioides exógenos alcaloides, o sintéticos no peptídicos podrían presentar también esta actividad.

Un ejemplo claro de la regulación opioide de la respuesta antitumoral del hospedero es la observación de que la morfina, la α -END, la MENK, la LENK, la DYN-A y la β -END potencian la actividad antitumoral del macrófago (Pacifci y cols, 1994; Cameron, 1987; Hagi y cols, 1994). Además de esto, como ya se había mencionado previamente, los opioides mimetizan el efecto del estrés y este influye en el crecimiento y desarrollo de los tumores. El estrés, la ansiedad y estados depresivos están relacionados con la inmunosupresión y un aumento

en la frecuencia de tumores. Los opioides al igual que el estrés son capaces de activar al sistema nervioso simpático, y de esta forma modular diversos aspectos de la reactividad inmune, entre ellos el rechazo de tumores (Conti, 2000).

Se ha encontrado que analgésicos opioides empleados en la terapia del cáncer, específicamente el uso de la morfina en el tratamiento del dolor crónico, pueden influir negativamente en la efectividad de la inmunoterapia aplicada en los hospitales. Por ejemplo, la IL-2 ha resultado ser un tratamiento eficaz para el cáncer metastático renal, sin embargo, la morfina puede bloquear la eficacia de este tratamiento (Lissoni y cols, 2000).

También se ha observado que la morfina puede estimular, inhibir o no tener efecto sobre el crecimiento tumoral *in vitro* o *in vivo* dependiendo de la dosis y ruta de administración (Reubi, 1985; Ishikawa y cols, 1993). Sin embargo, existe evidencia que apoya los efectos benéficos de la morfina en la calidad de vida del paciente al reducir el estrés asociado con las consecuencias de la neoplasia, como el dolor crónico (Carr y cols, 1995) o cirugía (Page y cols, 1993).

Sin embargo, el potencial clínico de los compuestos opioides no se limita a la inmunoterapia; se han descrito receptores opioides o sitios de unión en una amplia variedad de células tumorales humanas (Cuadro 6), esto sugiere que los compuestos opioides tienen la capacidad de interactuar directamente con células transformadas e influir en su proliferación; por ejemplo, la morfina presenta actividad inhibitoria del crecimiento celular de líneas tumorales (Aggarwal y Glasel., 1999; Hatzoglou y cols, 2000; Panagiotou y cols, 1999;

Sergeeva y cols, 1993; Singhal y cols, 1999; Sueoka y cols, 1998; Yoshida y cols, 2000).

Esta actividad incluye a formas tumorales de origen inmune (linfomas y mielomas), pero también otros tipos como el cáncer de mama, próstata, pulmón, riñón e intestino (Panagiotou, 1999); la interacción entre el tumor y drogas opioides es posible debido a la presencia de receptores opioides en la superficie de las células tumorales (Maneckjee y cols, 1990 a y b). A la fecha se han identificado receptores tipo kappa en el linfoma murino R1.1 (Bidlack y cols, 1992); y receptores mu y kappa en la superficie de la línea tumoral MCF-7 (Maneckjee y cols, 1990a).

Aunque aún no se han definido los mecanismos asociados a esta actividad, se ha sugerido que la actividad antiproliferativa de opioides pudiera ser dependiente de la vía de las caspasas (Yoshida y cols, 2000), modificación de elementos del citoesqueleto celular (Sueoka y cols, 1998), e incluso la generación de intermediarios reactivos del oxígeno (Panagiotou y cols, 1999).

También se ha sugerido que la actividad antiproliferativa de opioides pudiera no ser mediada por su unión a receptores opioides, sino por su interacción con otros sistemas receptores de membrana de las células, en particular el sistema somatostatinérgico (Hatzoglou y cols, 1995 a, y c).

Cuadro 6. Receptores opioides en tumores humanos.

Tipo celular u origen del tumor	Receptor	Referencia
Astrocitoma	κ	Thomas y cols, 1990
Glioblastoma	κ	Thomas y cols, 1990
Mama	δ, κ, μ	Kampa y cols, 1996; Maneckjee y cols, 1990.
Colon	δ	Singh y cols, 1996
Endometrio	δ, κ	Hatzoglou y cols, 1995b
Adenocarcinoma gástrico	δ	Ueki y cols, 1995
Pulmón	δ, κ, μ	Campa y cols, 1996, Maneckjee y cols, 1990b
Neuroblastoma	δ	Campa y cols, 1996, Maneckjee y cols, 1990b

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Actividad Antitumoral de opioides

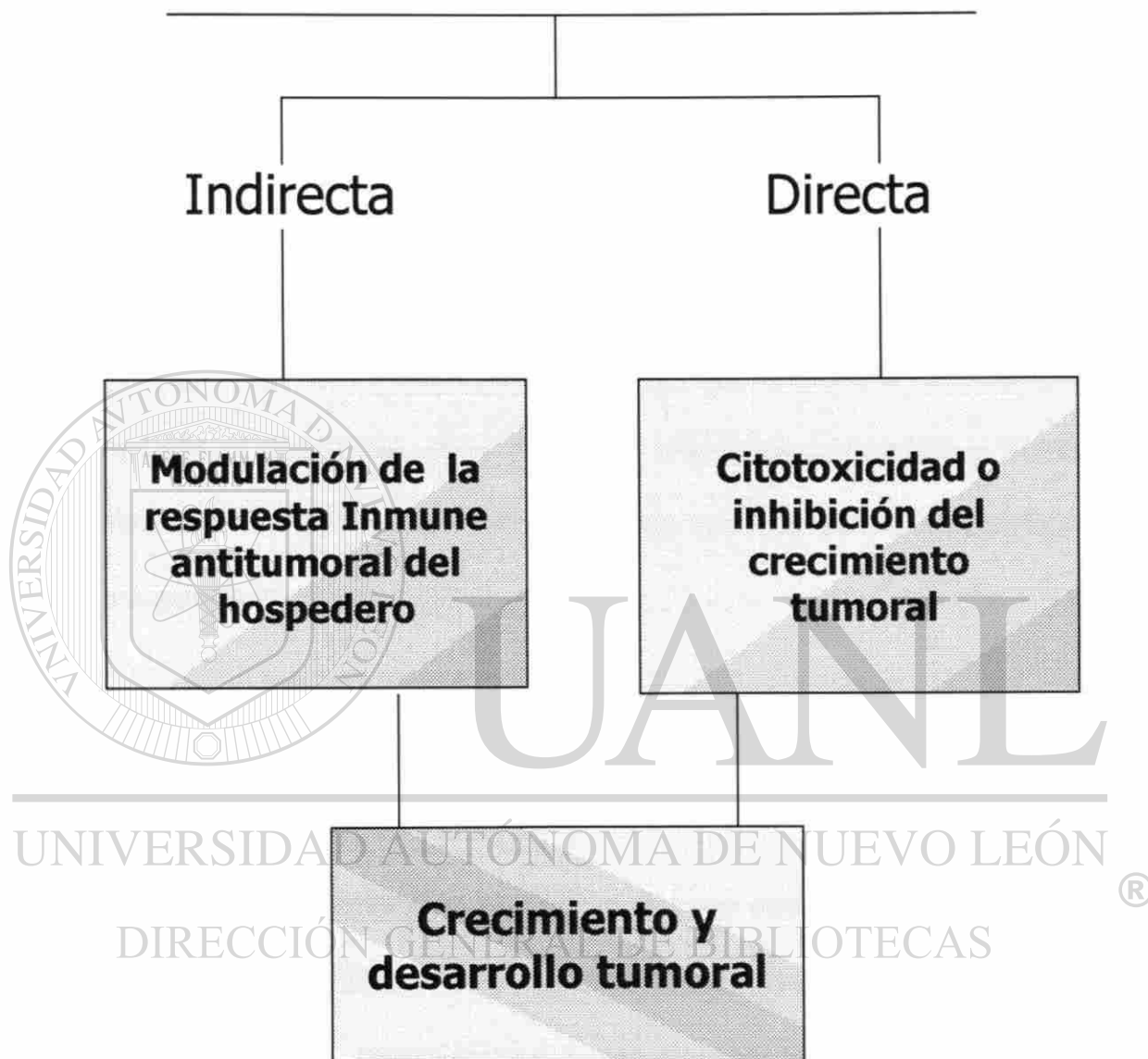
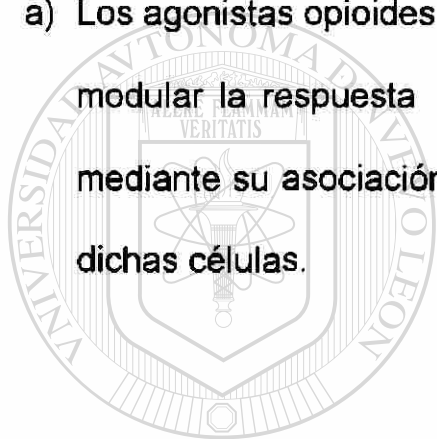


Figura 14. Mecanismos propuestos para la actividad antitumoral de opioides.

3. HIPÓTESIS

a) Los agonistas opioides no peptídicos del tipo *delta* y *mu* son capaces de modular la respuesta de linfocitos y macrófagos, murinos y humanos mediante su asociación a receptores de opioides sobre la superficie de dichas células.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

b) Los agonistas opioides no peptídicos del tipo *delta* y *mu* son capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de líneas celulares mieloides, linfoides y fibroblastoides mediante su asociación a receptores de opioides sobre la superficie de dichas células.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de nuevos opioides agonistas no peptídicos del tipo *delta* y *mu* sobre la función *in vitro* de macrófagos y linfocitos de rata y humanos y el crecimiento *in vitro* de líneas tumorales linfoides y mieloides.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar los compuestos opioides: (+)-4-((alfa R)9-alfa-((2S, 5R)-4-allyl-2, 5-dimetil-1-piperazinil)-3-metoxibenzil)-N, N-dietil-benzamida, SNC80(+); opioides derivados del naltrindol: fenoxinaltrindola (9332); y 6'-Hidroxinaltrindola, (9333); y los compuestos derivados del bencilideno-naltrexona: el 6,7-5'.6'-Piridomorfinano ciabi-4'-fenil, (9334); y 6, 7-2',3'-quinolinomorfinano, (9336); sobre los siguientes parámetros:

- A) Proliferación de células mononucleares humanas y linfocitos de rata
- B) Activación de monocitos humanos y macrófagos de rata
- C) Efecto directo de opioides no peptídicos de los tipos *delta* y *mu* sobre el crecimiento de las líneas celulares L-5178Y-R, J774A-1, U937, H9, Jurkat y L929.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material

5.1.1 Equipo y reactivos

Las soluciones penicilina-estreptomicina, L-glutamina, y medios RPMI 1640 y AIM-V se obtuvieron de Life Technologies (Grand Island, NY). El LPS de *Escherichia coli* serotipo 026:B6, Suero fetal bovino (SFB), DMSO, metanol, buffer de lisis para células eritrocíticas, PBS, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio (MTT), Concanavalina A (Con A), dimetilformamida (DMF), dodecil sulfato de sodio (SDS), Ficoll-Hypaque, fitohemaglutinina (PHA), EDTA, tripsina y tinción de Giemsa fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

5.1.2 Animales de experimentación

Se emplearon ratas macho Sprague Dawley (200-220 g), de 6 a 8 semanas[®] de edad, las cuales se obtuvieron en Harlan México S.A. Se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos y de estrés a 24 °C, bajo un ciclo luz-oscuridad (fase lumínica, 06:00-18:00 horas), y se les proporcionó agua purificada y alimento (Purina, México) *ad libitum*.

5.1.3 Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas, L-5178Y-R (linfoma murino DBA/2), U937 (clona CRL 1593; linfoma humano histiocítico tipo monocito), H-9 (clona HTB-176,

linfoma humano de células T), Jurkat (clona E6-1 TIB-152; leucemia aguda humana de células T), L929 (clona CCL1; fibrosarcoma murino de tejido conectivo) y J774A-1 (línea tumoral murina monocito/macrófago) fueron adquiridas en American Type Culture Collection (Rockville, MD).

5.1.4 Drogas empleadas

Los compuestos opioides: (+)-4-((alfa R)9-alfa-((2S, 5R)-4-alil-2, 5-dimetil-1-piperazinil)-3-metoxibenzil)-N, N-dietil-benzamida, SNC80(+); opioides derivados del naltrindol: fenoxinaltrindola (9332); y 6'-Hidroxinaltrindola, (9333); y los compuestos derivados del bencilideno-naltrexona: el 6,7-5'.6'-Piridomorfinano ciabi-4'-fenil, (9334); y 6, 7-2',3'-quinolinomorfinano, (9336); (Figura 15), fueron proporcionados por el Dr. K.C. Rice del Laboratorio de Química Medicinal en Bethesda, MD.

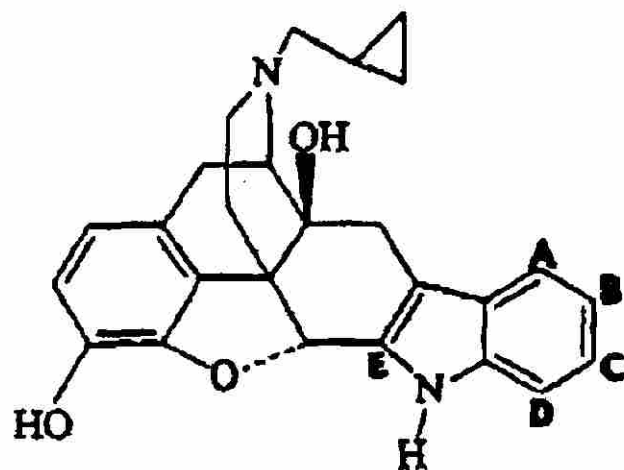
5.1.5 Preparación de las drogas

La preparación de las drogas empleadas en este trabajo se realizó en la forma descrita en el cuadro 5. Para llevar a cabo los experimentos se prepararon diluciones en medio de cultivo RPMI completo o bien medio AIM-V, se emplearon concentraciones de 10^{-5} a 10^{-11} M para los estudios *in vitro*.

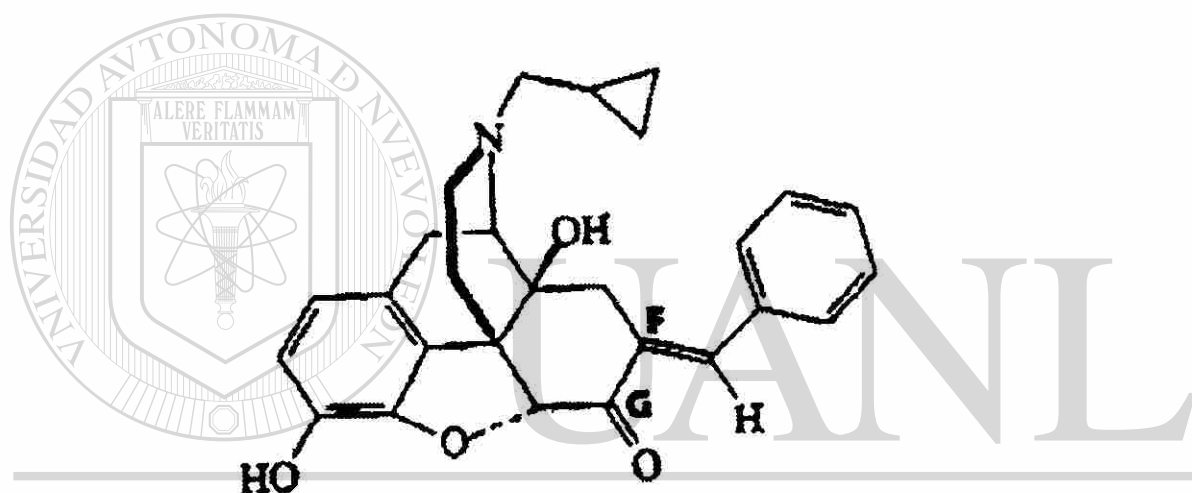
Cuadro 8. Preparación de las drogas empleadas en este trabajo.

Compuesto	Peso molecular	Solución vehículo	Molaridad
SNC80(+)	450g/mol	1.7ml H ₂ O 0.2ml DMSO 0.1 M(0.1N HCl)	1X10 ⁻³ M
9332	589.14g/mol	0.4 ml EtOH 2.1 ml H ₂ O	2x10 ⁻³ M
9334	511.58g/mol	0.7 ml EtOH 1.5 ml H ₂ O	2x10 ⁻³ M
9336	507.12 g/mol	1.7 ml EtOH 1.45ml H ₂ O	2x10 ⁻³ M
9333	448.52 g/mol	1.8 ml EtOH 2.0 ml H ₂ O	1.76X10 ⁻³ M [®]

EtOH, alcohol etílico
DMSO, dimetil sulfoxido
HCl, Ácido clorhídrico



a



b

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro 7. Ligandos opioides selectivos para receptor delta.

a Naltrindolol. Los compuestos, 9332 y 9333 fueron derivados de esta molécula, y presentan alteraciones químicas localizadas en la posición C. En el caso del 9332, la modificación consistió en la adición de un grupo fenoxi, y en el caso del 9333 en la adición de un grupo hidroxilo.

b Bencilideno naltrexona. Los compuestos derivados de esta molécula, 9334 y 9336, presentan alteraciones químicas localizadas en F y G, ambos. En el caso del 9334 la modificación consistió en la adición de un grupo piridina y en el caso del 9336 en la adición de un grupo quinol.

5.2 Metodologías empleadas

5.2.1 Obtención de linfocitos de timo de rata

Una vez que se sacrificó al animal por asfixia con CO₂, se procedió a remover el timo inmediatamente. Se preparó una suspensión unicelular al disgregar el timo en medio RPMI 1640 suplementado con una solución 0.5% de penicilina-estreptomicina (RPMI completo). Esta suspensión se lavó tres veces en este mismo medio, y las células finales se resuspendieron y ajustaron a una densidad de 10⁷ células/ml en medio AIM-V

5.2.2 Ensayo de reducción del MTT a linfocitos

Para esto se determinó la intensidad de reducción del MTT o formazán por las células en cultivo. Como se describió previamente, se preparó una suspensión celular del timo en medio AIM-V, y se ajustó a 10⁷ células/ml. Alícuotas de 100 µl/pozo de esta suspensión se depositaron en placas de 96 pozos de fondo plano (Becton Dickinson) las cuales contenían cultivos por triplicado (100 µl/pozo) de medio AIM-V el cual sirvió como control no estimulado, o bien cultivos por triplicado de Con A a concentraciones óptimas y subóptimas (0.6, 1.2 y 2.4 µg/ml), para estimular la proliferación de linfocitos, todo esto en presencia o ausencia de opioides en un rango de concentraciones de 10⁻¹¹-10⁻⁵. Las concentraciones óptimas y subóptimas de Con A empleadas se determinaron en un ensayo previo (Ver Apéndice III)

Después de incubar por 44 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire, se añadió el MTT (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo) a una concentración final de 0.5 mg/ml, y los cultivos se incubaron por cuatro horas adicionales. Se añadieron 100 µl de buffer para lisis celular (50% de DMF + 50% SDS al 20%) a cada pozo, y se incubaron durante toda la noche. Al terminar esta incubación, se leyeron las densidades ópticas a 540nm en un lector de microplacas.

5.2.3 Obtención de macrófagos peritoneales de rata

Los animales se sacrificaron con CO₂ e inmediatamente se procedió a coleccionar las células residentes en la cavidad peritoneal con medio RPMI 1640 frío. Las suspensiones celulares se lavaron una vez con este medio, se resuspendieron y ajustaron en medio AIM-V a una concentración de 2x10⁶ células/ml. Dado que el suero se ha reportado como un activador de los macrófagos (Chen y cols, 1994), el medio de cultivo se cambió en esta etapa por el medio AIM-V libre de suero, el cual se ha reportado como un medio que permite el cultivo celular (Kaldjian, 1992). Alícuotas de 100µl/pozo de ésta suspensión celular se incubaron durante 2 horas en placas de 96 pozos con fondo plano (Becton Dickinson, Cockeysville, MD). Las células no adherentes se removieron, y las células adherentes (aproximadamente 70% de las células sembradas o casi 1.4 x 10⁶ células/ml) se incubaron durante la noche en 100 µl/pozo de medio AIM-V en la presencia o ausencia de los opioides y/o antagonistas opioides.

5.2.4 Producción de óxido nítrico por macrófagos

Se empleó la acumulación de nitritos en el sobrenadante de los cultivos de macrófagos como un indicador de la producción de óxido nítrico por células residentes o activadas. Los cultivos de macrófagos tratados con o sin opioides durante la noche anterior se lavaron dos veces con medio RPMI a 37 °C, una vez hecho esto, se ajustó el volumen de los macrófagos a 200 μ l/pozo con medio AIM-V. Los macrófagos se activaron con LPS 0.02 μ g/ml en un volumen final de 200 μ l/pozo en medio AIM-V (Ver apéndice III para la curva dosis-respuesta a LPS). Las placas se incubaron por 72 horas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire. Al final del periodo se transfirieron 50 μ l/pozo (controles y tratamientos) a una placa nueva. A estas alícuotas se les agrego 50 μ l/pozo del reactivo de Griess (Gómez-Flores y cols, 1997), se empleó NaNO₂ como estándar. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos y se midieron las absorbancias a 540 nm en un lector de microplacas (Molecular Devices Corporation).

5.2.5 Producción de TNF- α por macrófagos

Según la metodología ya descrita, se prepararon cultivos de macrófagos residentes de rata, se incubaron durante una noche (aproximadamente 16h) en la presencia o ausencia de opioides en concentraciones de 10⁻¹¹, 10⁻⁹ y 10⁻⁷ M. Al día siguiente los cultivos se lavaron para eliminar los opioides, y los macrófagos se activaron con LPS (20 ng/ml). Estos se incubaron a 37°C durante 5 horas, al final

de lo cual se colectaron 150 μ l/pozo de sobrenadantes de los cultivos y se almacenaron a 72°C para su posterior análisis. Se empleó una prueba ELISA comercial para la cuantificación de TNF- α en los sobrenadantes de los cultivos.

5.2.6 Fagocitosis de la levadura *Candida albicans* por macrófagos

Macrófagos peritoneales de rata se ajustaron a una concentración de 2×10^6 células/ml respectivamente. Posteriormente se colocaron en cubreobjetos de vidrio de 24x60 mm (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) en el interior de cajas Petri de poliestireno de 100x15 mm (Fisher Scientific), en condiciones de esterilidad.

Después de 2 horas de incubación a 37 °C las células no adherentes se removieron, y las células adherentes se incubaron durante toda la noche en presencia y ausencia de opioides a concentraciones de 10^{-10} , 10^{-8} y 10^{-6} , y se incubaron durante 16h. Al día siguiente los macrófagos se activaron con LPS (20 ng/ml) y se incubaron a 37°C durante 4 horas al final de lo cual los macrófagos se lavaron una vez con PBS, y el medio se reemplazó con una suspensión de *Candida albicans*, cepa ATCC 32354, para lograr una proporción de levaduras-macrófagos de 4:1, en medio AIM-V en un volumen final de 3 ml de medio AIM-V. Después de 1 hora de incubación a 37 °C, la suspensión de levaduras se removió y las monocapas de macrófagos se lavaron intensamente con PBS, y se secaron al aire.

Las células se fijaron con metanol, y se tiñeron con Giemsa (Gómez-Flores y Weber, 2000). Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio (Fisher Scientific). El porcentaje de macrófagos que se encontró ingiriendo una o más levaduras se determinó al contar 100 células por preparación en objetivo de inmersión (Rojavin et al, 1993).

5.2.7 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMH) mediante gradiente Ficoll-Hypaque

Se empleó sangre completa obtenida de donadores sanos, las CMH se aislaron mediante gradiente de centrifugación por Ficoll-Hypaque (3000 r.p.m. durante 20 minutos). La interfase que contiene las CMH se colectó y lavó dos veces en medio RPMI 1640 a 1600 r.p.m. por 5 minutos. Se realizó un conteo total de la suspensión final ya lavada, y se ajustó a 10^6 cels/ml para la prueba de proliferación.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

5.2.8 Ensayo de reducción del MTT por células mononucleares

Como en el caso de los linfocitos de rata, se determinó la intensidad de reducción del MTT o formazán por las células en cultivo. Se preparó una suspensión de CMH a una densidad de 10^6 células/ml. Alícuotas de esta suspensión celular (100 μ l/pozo) se depositaron en placas de 96 pozos de fondo plano (Becton Dickinson) las cuales contenían cultivos por triplicado (100 μ l/pozo) de medio AIM-V, como control no estimulado, o bien cultivos por triplicado de PHA a la concentración de 20 μ g/ml, para estimular la proliferación de CMH, en la

presencia o ausencia de opioides en un rango de concentraciones de 10^{-11} - 10^{-5} . La concentración empleada de PHA se determinó en un ensayo previo (Ver Apéndice III)

Después de incubar por 44 horas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire, se añadió el MTT a una concentración final de 0.5 mg/ml, y los cultivos se incubaron por cuatro horas adicionales. Se añadieron 100 µl de buffer para lisis celular a cada pozo, y se incubaron durante toda la noche. Al terminar esta incubación, se leyeron las densidades ópticas a 540nm en un lector de microplacas.

5.2.9 *Obtención de monocitos de sangre periférica*

Por el método ya descrito, se obtuvieron CMH de sangre periférica, se ajustaron a una densidad de 2.5×10^6 células/ml y se sembraron 100µl/pozo en una placa de 96 pozos de fondo plano y se incubaron por 2 horas a 37 °C. Las células no adherentes se removieron, y las células adherentes (aproximadamente 10% de las células sembradas) se incubaron durante la noche en 100 µl/pozo de medio AIM-V en la presencia o ausencia de los opioides en concentraciones de 10^{-12} , 10^{-9} y 10^{-6} M.

5.2.10 *Producción de TNF-α por monocitos*

Los monocitos obtenidos se cultivaron en presencia de opioides durante 16h, después de lo cual se decantó la placa, se lavó dos veces con medio AIM-V a 37°C y posteriormente se ajustó el volumen en cada pozo con medio AIM-V o bien

medio AIM-V con LPS (0.01 µg/ml) en un volumen final de 200 µl/pozo, las placas se incubaron durante 4 horas después de lo cual se colectaron 150µl/pozo de los sobrenadantes y se almacenaron en congelación (-20°C). Los niveles de TNF-α presentes en los sobrenadantes se determinaron con una prueba ELISA comercial (Ver apéndice II).

5.2.11 Mantenimiento de líneas celulares murinas y humanas

Para el mantenimiento *in vitro* de las líneas tumorales se empleó medio de cultivo RPMI-1640 completo. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂. La densidad celular debió mantenerse entre 3x10⁴ y 7x10⁵ céls/ml para las líneas que crecen en suspensión y confluencia del 100% para las líneas adherentes.

5.2.12 Determinación del crecimiento *in vitro* de líneas celulares

Las células en cultivo se colectaron en tubos cónicos de 15mL, se lavaron en medio RPMI centrifugando a 1500 rpm durante 10 minutos para luego resuspender en medio RPMI 1640 completo. Las células se ajustaron a una concentración de 5x10⁴ cels/ml en medio RPMI completo. Se colocaron 100 µl/pozo de esta suspensión celular en una placa de 96 pozos de fondo plano. Se añadieron 100 µl/pozo de opioides en un rango de concentraciones de 10⁻⁵M a 10⁻¹¹ M. Posteriormente, las células se incubaron durante 44 horas a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación del crecimiento *in vitro* se añadieron 20 µl/pozo de MTT (5 mg/ml) a cada placa, y se incubaron 4 horas adicionales. Se agregaron

100 μ l/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (aproximadamente 16 horas) a 37°C y 5% de CO₂. Al día siguiente se leyeron las densidades ópticas (resultantes de la disolución del formazán) se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas.

5.3 Análisis Estadístico

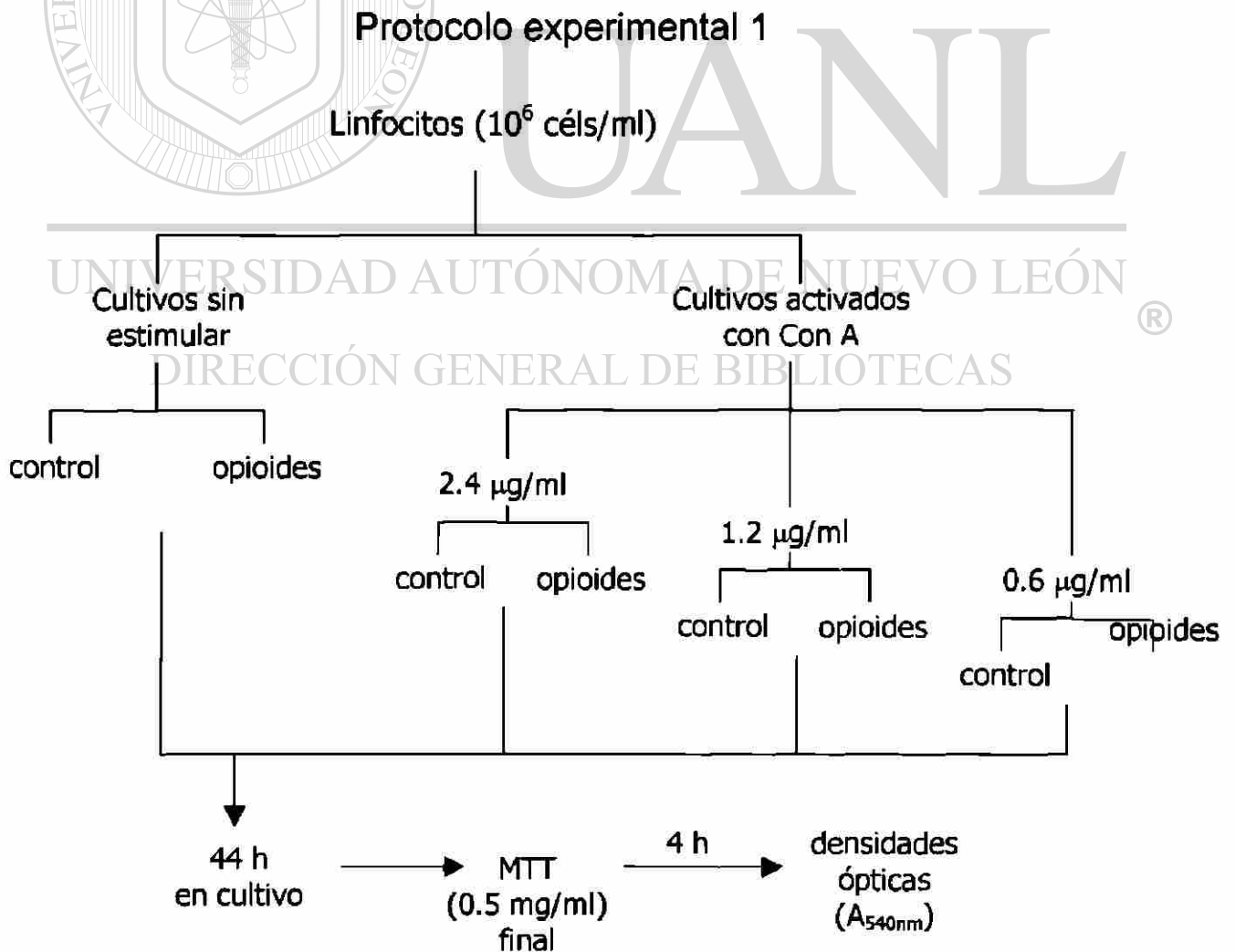
El análisis estadístico consistió de dos pasos, el primero la determinación de la distribución de los datos obtenidos para cada variable estudiada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En el segundo paso, para los datos con una distribución normal predominante se empleó la prueba ANOVA de una vía para evaluar el nivel de significancia de la diferencia entre la media de los grupos de los que constaba el experimento (control y tratamientos). En los casos en que se encontró diferencia entre los grupos, se empleó la prueba *t* de Dunnet para evaluar el nivel de significancia de la diferencia entre la media del grupo control y la media de cada una de las concentraciones del tratamiento opioide.

6. RESULTADOS

6.1 Efecto de opioides sobre las funciones de linfocitos y macrófagos de rata.

6.1.1 Respuesta proliferativa de linfocitos de rata.

Para la evaluación del efecto de opioides sobre la proliferación de linfocitos se empleó el diseño experimental que se esquematiza abajo (Protocolo experimental 1), utilizando este protocolo experimental obtuvimos la respuesta de linfocitos residentes y linfocitos activados (Con A) a un amplio rango de concentraciones de opioides.



Los resultados obtenidos muestran que el SNC80 estimuló la proliferación de linfocitos preactivados con el mitógeno Con A a la concentración subóptima de 2.4 µg/ml, este efecto no se observó en linfocitos residentes o activados con Con A a concentraciones de 1.2 y 0.6 µg/ml (óptima y subóptima, ver el apéndice para curvas dosis-respuesta) (Tabla 1.1 y Figura 15).

En el caso donde encontramos un efecto significativo, los índices de proliferación observados fueron de 2.230, 2.708 y 2.378, en respuesta a las concentraciones de SNC80 10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} M, respectivamente ($p < 0.05$ en los tres casos).

Con el compuesto 9332 se observó inhibición a la concentración de 10^{-5} M y estimulación de la linfoproliferación a dosis mayores a 10^{-5} M. A la concentración de 10^{-5} M el 9332 tiene un efecto inhibitor de la proliferación, en linfocitos residentes la inhibición fue mayor del 50% con una alta significancia (índice de proliferación = 0.483, $p < 0.001$). Estos niveles de inhibición también se observaron en linfocitos preactivados con Con A a las dosis de 2.4 (Figura 16) 1.2 y 0.6 µg/ml (Tabla 1.2); los índices de proliferación en estos casos fueron de 0.456, 0.421 y 0.412 respectivamente, todos con alta significancia ($p < 0.001$).

El 9332, sin embargo, a concentraciones menores de 10^{-5} M es capaz de estimular la proliferación de linfocitos, si bien esto solo sucede en linfocitos preactivados. En linfocitos preactivados con una concentración de 2.4 µg/ml del mitógeno es en donde se observa un rango más amplio de acción del opioide,

ya que las concentraciones de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} estimulan la proliferación de los linfocitos con índices de 1.445, 1.447, 1.404 y 1.327, respectivamente y con una alta significancia en la mayoría de los casos ($p \leq 0.001$) con excepción de la concentración 10^{-9} ($p < 0.005$). En linfocitos preactivados con la concentración 1.2 $\mu\text{g/ml}$ de Con A, se observó estimulación solamente con la concentración 10^{-6} del opioide, con un índice de proliferación de 1.353 y una alta significancia ($p < 0.001$).

El compuesto 9333 no mostró gran actividad con la sola excepción de los linfocitos preactivados con 2.4 $\mu\text{g/ml}$ de Con A, en estas condiciones el 9333 es capaz de estimular la proliferación de los linfocitos, el índice encontrado fue de 1.426 ($p < 0.005$) (Tabla 1.3).

El compuesto 9334 estimuló la proliferación de linfocitos preactivados con 2.4 y 1.2 $\mu\text{g/ml}$ de Con A. En el primer caso el efecto se observó en el rango de concentraciones de 10^{-10} a 10^{-5} M del opioide, la mayor estimulación se observó en la concentración de 10^{-7} M donde se encontró un índice de proliferación de 1.399 con una alta significancia ($p < 0.001$); este valor disminuye tanto en las concentraciones menores (10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10} M) y en las mayores (10^{-6} y 10^{-5} M), pero en todos los casos el índice de estimulación estuvo por encima de 1.2 (Tabla 1.4).

En linfocitos preactivados con una dosis de 1.2 $\mu\text{g/ml}$ de Con A se observa también que un amplio rango de concentraciones del opioide estimulan la proliferación. De nuevo, la concentración opioide de 10^{-7} M induce la mayor estimulación (Índice de proliferación = 1.380) y presenta las mismas

características que el caso anterior, es decir, disminuye en concentraciones menores y mayores a 10^{-7} M y el índice de proliferación se encuentra sobre 1.2 (Tabla 1.4).

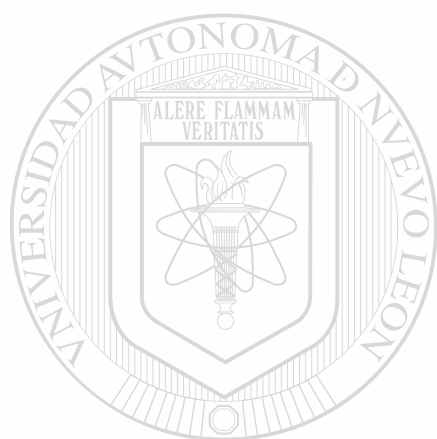
En linfocitos preactivados con 0.6 μ g/ml de Con A encontramos que se reduce el rango de acción opioide, ya que sólo las concentraciones de 10^{-6} y 10^{-5} M tienen un efecto significativo con índices de proliferación de 1.167 y 1.241 respectivamente ($p < 0.005$ y $p < 0.001$) (Tabla 1.4).

De los opioides evaluados el compuesto 9336 fue el único capaz de estimular la proliferación de linfocitos residentes y activados con cualquier concentración de Con A.

En linfocitos residentes observamos que las concentraciones de 9336 en el rango de 10^{-9} y 10^{-6} estimularon la proliferación de los linfocitos con índices de 1.252, 1.236, 1.241 y 1.251 respectivamente ($p < 0.05$) (Tabla 1.5).

En linfocitos previamente activados con Con A a una concentración de 2.4 μ g/ml se amplía el rango de concentraciones del opioide que tienen actividad estimuladora de 10^{-10} a 10^{-6} M, además que se observaron índices mas altos en comparación con el caso anterior. La mayor estimulación se observó en la concentración de 10^{-6} M del opioide con un índice de proliferación de 1.686 ($p < 0.001$) y este índice es mayor a 1.4 en el resto de las concentraciones (Ver tabla de resultados) y con una alta significancia ($p < 0.001$) (Tabla 1.5).

En linfocitos preactivados con mitógeno a concentraciones óptima y subóptima (1.2 y 0.6 $\mu\text{g/ml}$) la acción estimuladora de este opioide se reduce a dos concentraciones, 10^{-6} y 10^{-5} M, siendo esta última la que induce la mayor estimulación con índices de proliferación de 1.6, con una alta significancia (Tabla 1.5).

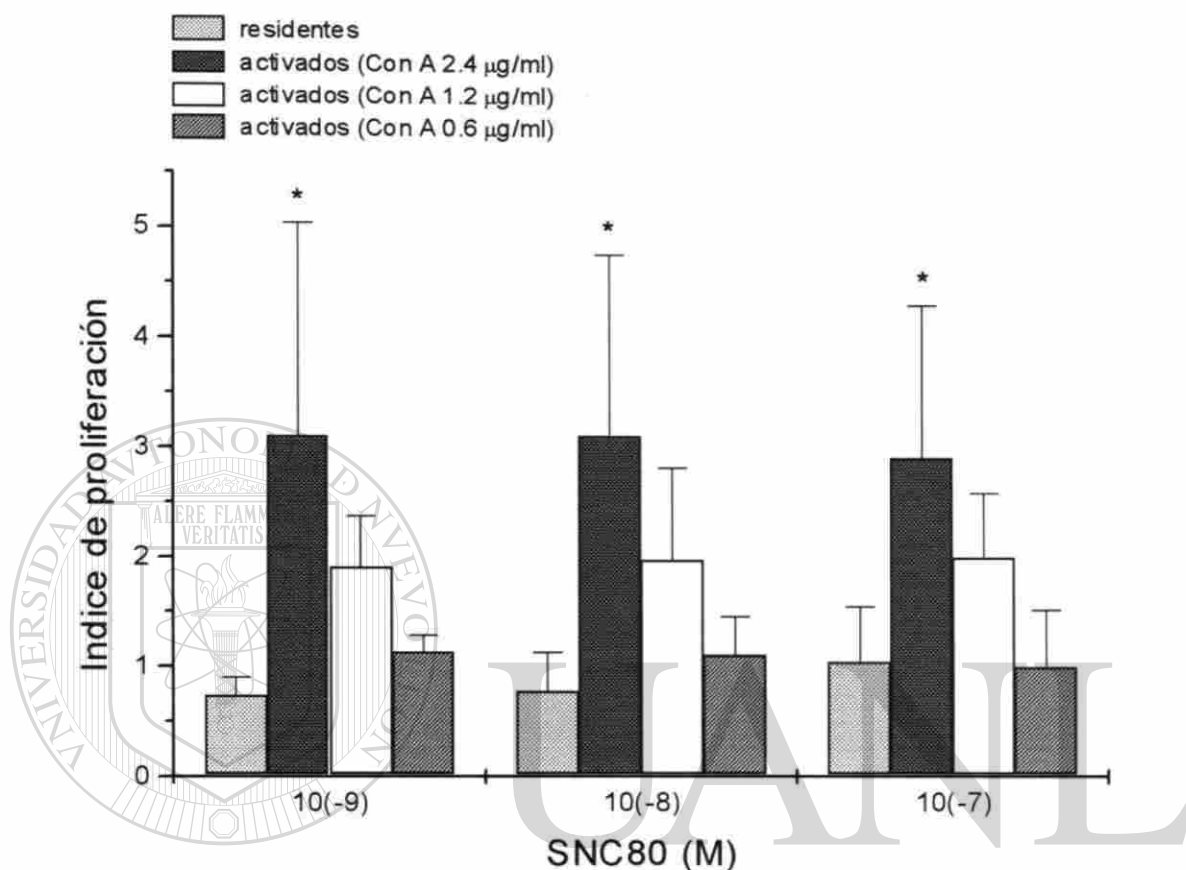


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Figura 15. Efecto del SNC80 sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos de timo de rata.

Después de matar al animal por asfixia con CO₂, el timo se removió inmediatamente. Se prepararon suspensiones unicelulares al disgregar el timo en medio RPMI 1640, las células finales se resuspendieron y ajustaron a una densidad de 10⁷ células/ml con medio AIM-V. De esta suspensión celular se depositaron 100 µl/pozo en placas de 96 pozos, las cuales contenían cultivos por triplicado (100 µl/pozo) de AIM-V (control), o bien cultivos de Con A (2.4, 1.2, 0.6 µg/ml), en la presencia o ausencia de SNC80. Después de incubar por 44 horas a 37°C, se añadió el MTT (0.5 mg/ml), y los cultivos se incubaron por cuatro horas adicionales. Se añadieron 100 µl/pozo de buffer para lisis celular, y se incubaron durante toda la noche. Se leyeron las densidades ópticas a 540nm en un lector de microplacas.

La D.O. del control sin tratar fue de 0.134±0.122

Los datos representan la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

* p < 0.05 comparado con el control no tratado

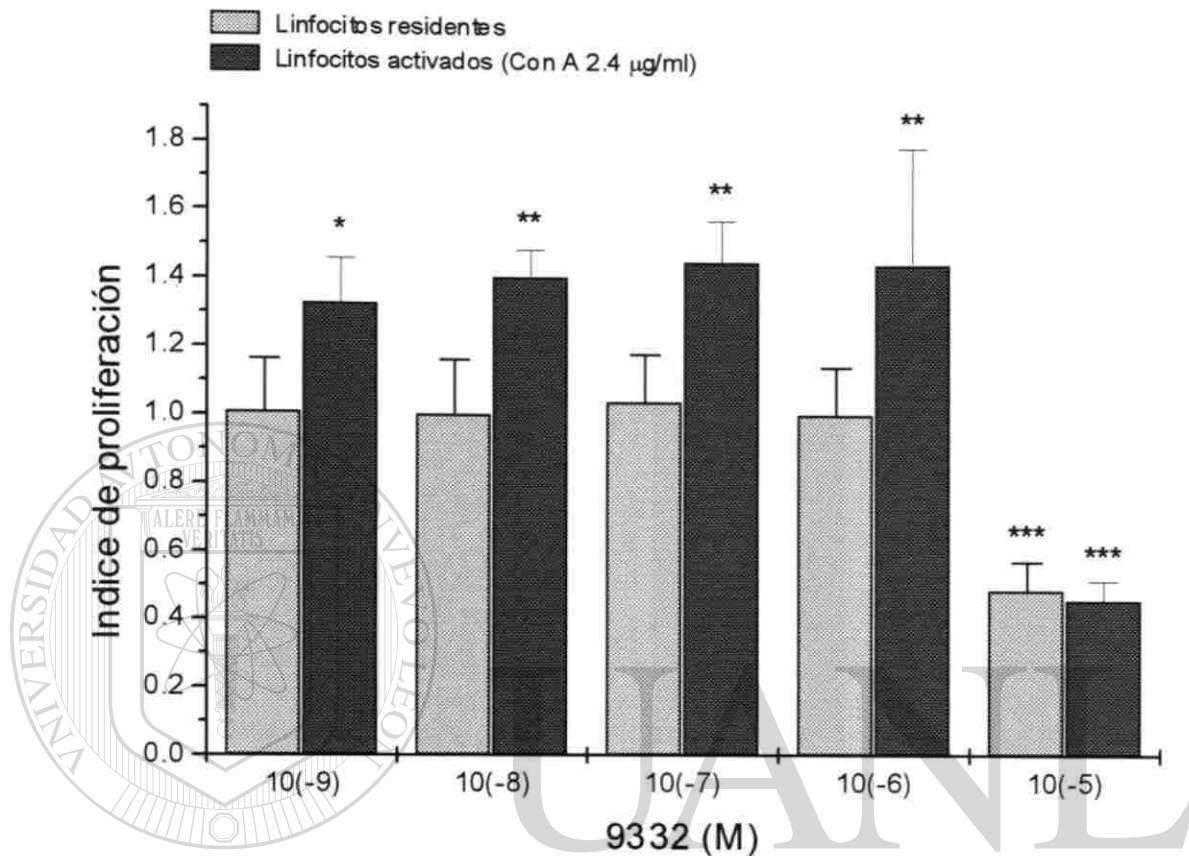


Figura 16. Efecto del 9332 sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos de timo de rata. Después de matar al animal por asfixia con CO₂ el timo se removió inmediatamente. Se prepararon suspensiones unicelulares al disgregar el timo en medio RPMI 1640, las células finales se resuspendieron y ajustaron a una densidad de 10⁷ células/ml con medio AIM-V. De esta suspensión celular se depositaron 100 µl/pozo en placas de 96 pozos, las cuales contenían cultivos por triplicado (100 µl/pozo) de AIM-V (control) , o bien cultivos de Con A (2.4, 1.2, 0.6 µg/ml), en la presencia o ausencia de 9332. Después de incubar por 44 horas a 37°C, se añadió el MTT (0.5 mg/ml), y los cultivos se incubaron por cuatro horas adicionales. Se añadieron 100 µl/pozo de buffer para lisis celular, y se incubaron durante toda la noche. Se leyeron las densidades ópticas a 540nm en un lector de microplacas.

La D.O. del control sin tratar fue de 0.403±0.095

Los datos representan la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

* p < 0.05 comparado con el control no tratado

** p < 0.01 comparado con el control no tratado

*** p < 0.001 comparado con el control no tratado

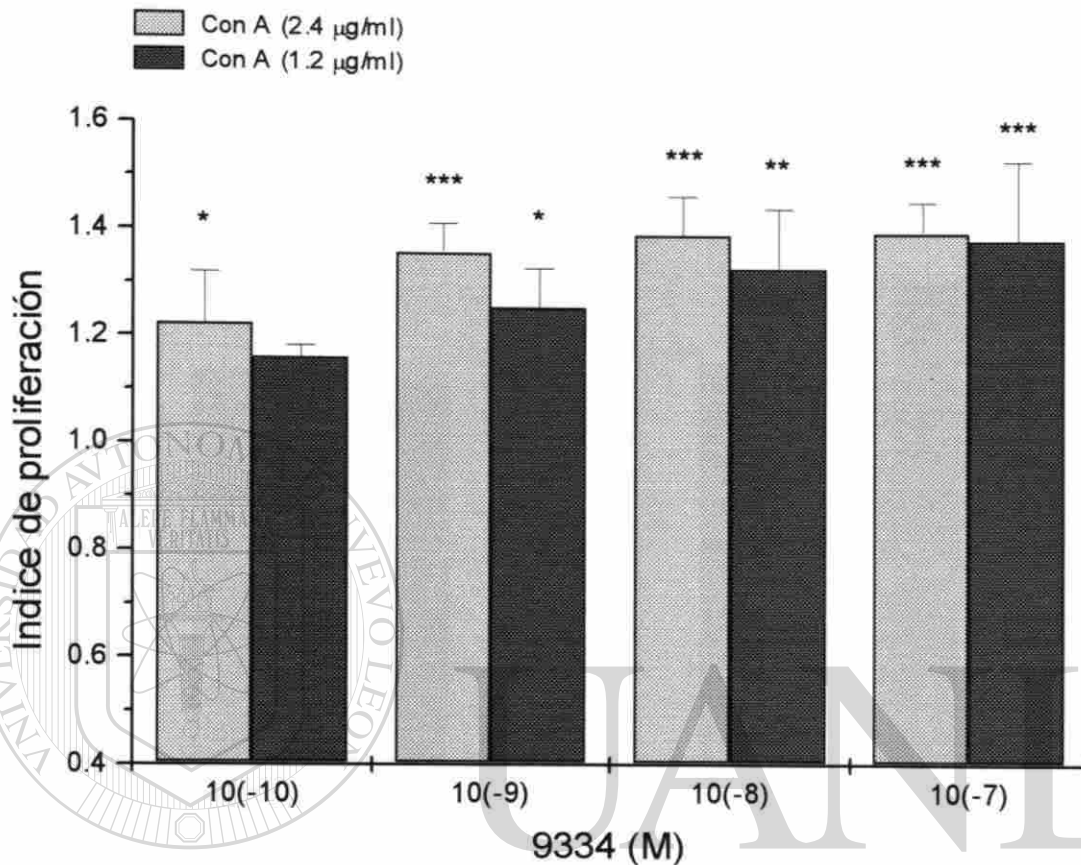


Figura 17. Efecto del 9334 sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos de timo de rata.

Después de matar al animal por asfixia con CO₂, el timo se removió inmediatamente. Se prepararon suspensiones unicelulares al disgregar el timo en medio RPMI 1640, las células finales se resuspendieron y ajustaron a una densidad de 10⁷ células/ml con medio AIM-V. De esta suspensión celular se depositaron 100 µl/pozo en placas de 96 pozos, las cuales contenían cultivos por triplicado (100 µl/pozo) de AIM-V (control), o bien cultivos de Con A (2.4, 1.2, 0.6 µg/ml), en la presencia o ausencia de 9334. Después de incubar por 44 horas a 37°C, se añadió el MTT (0.5 mg/ml), y los cultivos se incubaron por cuatro horas adicionales. Se añadieron 100 µl/pozo de buffer para lisis celular, y se incubaron durante toda la noche. Se leyeron las densidades ópticas a 540nm en un lector de microplacas.

La D.O. del control sin tratar fue de 0.351±0.019

Los datos representan la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

* p < 0.05 comparado con el control no tratado

** p < 0.01 comparado con el control no tratado

*** p < 0.001 comparado con el control no tratado

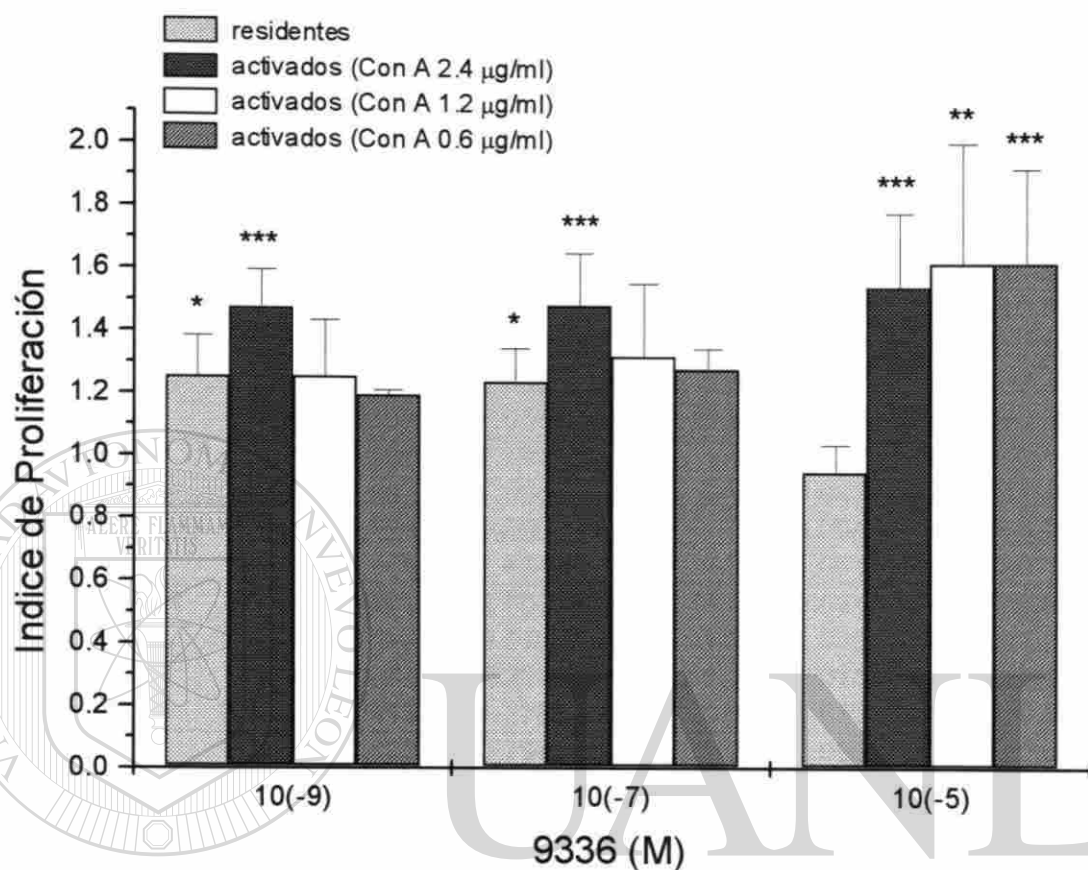


Figura 18. Efecto del 9336 sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos de timo de rata.

Después de matar al animal por asfixia con CO₂, el timo se removió inmediatamente. Se prepararon suspensiones unicelulares al disgregar el timo en medio RPMI 1640, las células finales se resuspendieron y ajustaron a una densidad de 10⁷ células/ml con medio AIM-V. De esta suspensión celular se depositaron 100 µl/pozo en placas de 96 pozos, las cuales contenían cultivos por triplicado (100 µl/pozo) de AIM-V (control), o bien Con A (2.4, 1.2 y 0.6 µg/ml), en la presencia o ausencia de 9336. Después de incubar por 44 horas a 37°C, se añadió el MTT (0.5 mg/ml), y los cultivos se incubaron por cuatro horas adicionales. Se añadieron 100 µl/pozo de buffer para lisis celular, y se incubaron durante toda la noche. Se leyeron las densidades ópticas a 540nm en un lector de microplacas.

La D.O. del control sin tratar fue de 0.459±0.098

Los datos representan la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

* p < 0.05 comparado con el control no tratado

** p < 0.01 comparado con el control no tratado

*** p < 0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 1.1. Efecto del opioide SNC80 sobre el índice de proliferación de linfocitos de timo de rata

Dosis (Molar)	CON A (µg/ml)	E1 ^b	E2 ^b	E3 ^b	Índice de proliferación ^c
control (D.O.) ^d	---	0.010±0.004	0.013±0.010	0.380±0.001	
	2.4	0.091±0.008	0.042±0.021	0.451±0.001	
	1.2	0.088±0.022	0.435±0.153	0.855±0.006	
	0.6	0.023±0.008	0.117±0.015	0.739±0.011	
10 ⁻¹¹	---	0.258±0.140	1.256±0.067	1.207±0.010	1.271±0.303
	2.4	0.695±0.079	5.070±4.438	1.638±0.018	2.186±1.442
	1.2	0.366±0.125	1.201±0.489	0.913±0.018	0.844±0.248
	0.6	0.281±0.134	0.872±0.076	1.013±0.012	0.705±0.213
10 ⁻¹⁰	---	1.225±0.741	1.179±0.402	1.259±0.048	1.133±0.070
	2.4	0.915±0.259	2.023±0.737	1.925±0.153	1.263±0.380
	1.2	0.864±0.139	1.882±0.105	0.852±0.008	1.222±0.330
	0.6	1.295±0.332	1.056±0.206	0.871±0.062	1.110±0.095
10 ⁻⁹	---	1.322±0.264	0.794±0.067	1.174±0.029	1.034±0.154
	2.4	1.219±0.363	4.554±1.107	2.182±0.042	2.230±1.165 *
	1.2	1.641±0.128	1.866±0.328	1.060±0.004	1.466±0.294
	0.6	1.126±0.348	1.434±0.178	1.020±0.061	1.177±0.135
10 ⁻⁸	---	1.903±0.161	2.307±2.00	1.121±0.031	1.734±0.388
	2.4	1.963±0.123	5.273±0.481	1.343±0.039	2.708±1.319 *
	1.2	1.169±0.084	2.224±0.045	1.122±0.011	1.432±0.403
	0.6	0.957±0.418	1.278±0.300	0.987±0.033	1.080±0.099
10 ⁻⁷	---	2.838±2.135	0.794±0.168	1.257±0.056	1.555±0.645
	2.4	1.714±0.253	4.601±0.082	1.881±0.106	2.378±1.140 *
	1.2	1.520±0.445	2.068±0.128	1.202±0.019	1.505±0.329
	0.6	0.535±0.134	1.559±0.851	1.027±0.046	1.009±0.298
10 ⁻⁶	---	1.806±1.246	1.743±0.487	1.195±0.008	1.556±0.218
	2.4	1.194±0.457	2.179±0.529	1.632±0.019	1.333±0.453
	1.2	1.000±0.203	0.704±0.279	0.624±0.134	0.809±0.095
	0.6	0.478±0.149	0.491±0.194	0.870±0.002	0.606±0.121
10 ⁻⁵	---	1.225±0.987	0.717±0.295	1.112±0.007	1.556±0.146
	2.4	0.311±0.268	1.476±0.169	1.659±0.030	0.798±0.349
	1.2	0.381±0.111	0.153±0.071	0.806±0.005	0.338±0.097
	0.6	0.521±0.092	0.369±0.113	0.873±0.027	0.555±0.118

^a El Índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1.

^b Representa la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones.

^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores de absorbancia (540nm) del grupo control, se emplea como una referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

* p<0.05 comparado con el control no tratado

Tabla 1.2. Efecto del opioide 9332 sobre el Índice de proliferación^a de linfocitos de timo de rata

Dosis (Molar)	CON A (µg/ml)	E1 ^b	E2 ^b	E3 ^b	Índice de proliferación ^c
control (D.O.) ^d	---	0.274±0.005	0.590±0.112	0.345±0.001	
	2.4	0.438±0.006	0.365±0.009	0.442±0.014	
	1.2	0.488±0.018	0.388±0.028	0.371±0.010	
	0.6	0.477±0.010	0.419±0.015	0.342±0.025	
10 ⁻¹¹	---	1.104±0.045	0.713±0.010	1.097±0.014	0.971±0.129
	2.4	0.973±0.021	1.018±0.030	1.201±0.045	1.064±0.069
	1.2	0.940±0.014	0.961±0.061	1.028±0.016	0.976±0.026
	0.6	1.041±0.073	1.025±0.036	0.917±0.015	0.994±0.038
10 ⁻¹⁰	---	1.145±0.026	0.728±0.018	1.085±0.053	0.986±0.130
	2.4	1.192±0.041	1.011±0.019	1.542±0.046	1.248±0.155
	1.2	1.133±0.034	0.957±0.022	1.324±0.070	1.138±0.105
	0.6	1.166±0.066	0.998±0.030	0.961±0.006	1.042±0.062
10 ⁻⁹	---	1.206±0.032	0.696±0.004	1.117±0.074	1.006±0.157
	2.4	1.386±0.091	1.077±0.036	1.517±0.008	1.327±0.130 *
	1.2	1.321±0.014	0.932±0.014	1.259±0.027	1.171±0.120
	0.6	1.173±0.055	0.996±0.012	0.943±0.030	1.037±0.069
10 ⁻⁸	---	1.221±0.071	0.703±0.009	1.090±0.085	1.005±0.155
	2.4	1.519±0.043	1.253±0.030	1.441±0.049	1.404±0.078 **
	1.2	1.506±0.010	1.106±0.053	1.221±0.021	1.278±0.118
	0.6	1.199±0.077	0.996±0.017	1.054±0.043	1.083±0.060
10 ⁻⁷	---	1.193±0.033	0.771±0.014	1.161±0.071	1.042±0.135
	2.4	1.537±0.019	1.205±0.030	1.600±0.106	1.447±0.122 ***
	1.2	1.456±0.041	1.040±0.049	1.274±0.024	1.257±0.120
	0.6	1.314±0.026	0.954±0.022	0.961±0.058	1.076±0.118
10 ⁻⁶	---	1.189±0.049	0.739±0.006	1.084±0.022	1.004±0.136
	2.4	2.120±0.037	1.067±0.027	1.149±0.039	1.445±0.338 ***
	1.2	2.017±0.044	0.965±0.021	1.078±0.027	1.353±0.333 **
	0.6	1.772±0.036	1.008±0.031	0.920±0.009	1.233±0.270
10 ⁻⁵	---	0.654±0.006	0.359±0.007	0.434±0.005	0.483±0.088 ***
	2.4	0.391±0.003	0.569±0.007	0.409±0.100	0.456±0.056 ***
	1.2	0.336±0.000	0.569±0.046	0.358±0.009	0.421±0.074 ***
	0.6	0.359±0.002	0.501±0.001	0.377±0.007	0.412±0.044 ***

^a El Índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1.

^b Representa la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones.

^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores de absorbancia (540nm) del grupo control, se emplea como una referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

* p<0.05 comparado con el control no tratado

** p<0.01 comparado con el control no tratado

*** p<0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 1.3. Efecto del opioide 9333 sobre el Índice de proliferación^a de linfocitos de timo de rata

Dosis (Molar)	CON A (µg/ml)	E1 ^b	E2 ^b	E3 ^b	Índice de proliferación ^c
control (D.O.) ^d	---	0.699±0.016	0.295±0.024	0.409±0.004	
	2.4	0.715±0.022	0.488±0.014	0.358±0.003	
	1.2	0.193±0.001	0.548±0.012	0.37±0.003	
	0.6	0.621±0.012	0.551±0.052	0.435±0.015	
10 ⁻¹¹	---	1.017±0.023	1.055±0.049	1.084±0.023	1.052±0.019
	2.4	0.999±0.027	1.062±0.034	1.039±0.019	1.034±0.018
	1.2	0.987±0.012	0.888±0.018	0.961±0.014	0.945±0.029
	0.6	1.016±0.018	0.909±0.045	0.906±0.017	0.944±0.036
10 ⁻¹⁰	---	1.010±0.013	1.120±0.045	1.020±0.023	1.050±0.035
	2.4	1.152±0.011	1.218±0.020	1.029±0.022	1.133±0.055
	1.2	0.946±0.006	1.121±0.012	0.954±0.018	1.007±0.056
	0.6	1.117±0.047	0.967±0.067	0.926±0.012	1.003±0.057
10 ⁻⁹	---	1.048±0.056	1.159±0.045	1.036±0.015	1.081±0.039
	2.4	1.218±0.018	1.481±0.027	1.023±0.030	1.240±0.132
	1.2	0.936±0.011	1.382±0.003	0.950±0.030	1.089±0.146
	0.6	1.209±0.063	0.957±0.086	0.915±0.002	1.027±0.092
10 ⁻⁸	---	1.035±0.038	1.203±0.062	1.017±0.006	1.085±0.059
	2.4	1.263±0.030	1.615±0.065	1.171±0.016	1.350±0.135
	1.2	0.939±0.001	1.462±0.028	1.079±0.014	1.160±0.156
	0.6	1.137±0.068	0.982±0.013	0.931±0.035	1.016±0.062
10 ⁻⁷	---	1.066±0.022	1.155±0.043	1.012±0.008	1.078±0.041
	2.4	1.251±0.016	1.667±0.058	1.193±0.028	1.370±0.149
	1.2	0.934±0.023	1.505±0.024	1.103±0.024	1.181±0.169
	0.6	1.182±0.036	0.980±0.034	0.909±0.014	1.024±0.081
10 ⁻⁶	---	1.104±0.042	1.109±0.034	1.010±0.022	1.074±0.032
	2.4	1.200±0.041	2.097±0.030	0.980±0.013	1.426±0.341 *
	1.2	0.949±0.008	1.993±0.016	0.992±0.008	1.312±0.341
	0.6	1.218±0.088	1.569±0.033	0.934±0.020	1.241±0.183
10 ⁻⁵	---	1.125±0.049	1.097±0.030	0.935±0.018	1.052±0.059
	2.4	0.971±0.022	2.077±0.019	0.792±0.004	1.280±0.401
	1.2	0.936±0.006	1.841±0.079	0.847±0.103	1.208±0.317
	0.6	1.023±0.076	1.600±0.033	0.736±0.010	1.120±0.253

^a El Índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1.

^b Representa la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones.

^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores de absorbancia (540nm) del grupo control, se emplea como una referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

* p<0.05 comparado con el control no tratado

Tabla 1.4. Efecto del opioide 9334 sobre el Índice de proliferación^a de linfocitos de tino de rata

Dosis (Molar)	CON A (µg/ml)	E1 ^b	E2 ^b	E3 ^b	Índice de proliferación ^c
control (D.O.) ^d	---	0.392±0.070	0.325±0.020	0.367±0.004	
	2.4	0.620±0.004	0.446±0.019	0.480±0.014	
	1.2	0.538±0.014	0.495±0.016	0.428±0.019	
	0.6	0.505±0.001	0.454±0.013	0.322±0.008	
10 ⁻¹¹	---	1.185±0.078	0.975±0.030	1.038±0.035	1.066±0.062
	2.4	0.971±0.007	0.974±0.006	1.057±0.046	1.001±0.028
	1.2	1.003±0.046	0.907±0.023	0.922±0.044	0.944±0.029
	0.6	0.999±0.032	1.020±0.042	1.038±0.026	1.019±0.011
10 ⁻¹⁰	---	1.385±0.060	1.034±0.033	1.048±0.019	1.156±0.114
	2.4	1.052±0.031	1.235±0.019	1.382±0.061	1.223±0.095 *
	1.2	1.164±0.003	1.196±0.042	1.110±0.012	1.157±0.025
	0.6	1.078±0.024	1.069±0.033	1.111±0.043	1.086±0.012
10 ⁻⁹	---	1.553±0.279	1.055±0.038	1.033±0.031	1.214±0.169
	2.4	1.270±0.055	1.449±0.087	1.359±0.018	1.359±0.051 ***
	1.2	1.363±0.037	1.288±0.012	1.116±0.010	1.256±0.073 *
	0.6	1.139±0.105	1.063±0.033	1.084±0.070	1.095±0.022
10 ⁻⁸	---	1.359±0.234	1.080±0.019	1.058±0.036	1.166±0.096
	2.4	1.259±0.007	1.511±0.012	1.401±0.050	1.390±0.073 ***
	1.2	1.366±0.027	1.500±0.033	1.124±0.008	1.330±0.110 **
	0.6	1.111±0.101	1.127±0.033	1.085±0.043	1.108±0.012
10 ⁻⁷	---	1.564±0.163	1.033±0.038	1.064±0.034	1.220±0.172
	2.4	1.339±0.026	1.509±0.012	1.349±0.074	1.399±0.055 ***
	1.2	1.353±0.036	1.650±0.078	1.124±0.008	1.380±0.149 ***
	0.6	1.150±0.080	1.058±0.040	1.137±0.055	1.115±0.028
10 ⁻⁶	---	1.503±0.249	1.038±0.031	1.038±0.010	1.193±0.155
	2.4	1.400±0.030	1.522±0.031	1.113±0.001	1.345±0.121 ***
	1.2	1.277±0.049	1.600±0.079	1.018±0.011	1.298±0.168 ***
	0.6	1.222±0.042	1.230±0.020	1.048±0.016	1.167±0.059 **
10 ⁻⁵	---	1.326±0.123	1.006±0.047	1.085±0.026	1.139±0.096
	2.4	1.285±0.075	1.693±0.041	1.052±0.012	1.344±0.187 ***
	1.2	1.430±0.056	1.547±0.040	0.975±0.021	1.317±0.174 ***
	0.6	1.193±0.019	1.446±0.052	1.082±0.017	1.241±0.107 ***

^a El Índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1.

^b Representa la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones.

^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores de absorbancia (540nm) del grupo control, se emplea como una referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

* p<0.05 comparado con el control no tratado

** p<0.01 comparado con el control no tratado

*** p<0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 1.5. Efecto del opioide 9336 sobre el Índice de proliferación^a de linfocitos de timo de rata

Dosis (Molar)	CON A (µg/ml)	E1 ^b	E2 ^b	E3 ^b	Índice de proliferación ^c
control (D.O.) ^d	---	0.641±0.021	0.432±0.041	0.303±0.011	
	2.4	0.663±0.009	0.493±0.023	0.500±0.015	
	1.2	0.223±0.015	0.487±0.028	0.458±0.033	
	0.6	0.544±0.022	0.433±0.005	0.418±0.014	
10 ⁻¹¹	---	1.107±0.030	1.013±0.077	1.019±0.030	1.047±0.030
	2.4	0.991±0.058	0.956±0.013	0.988±0.009	0.978±0.011
	1.2	0.871±0.010	0.900±0.039	0.910±0.046	0.894±0.011
	0.6	1.105±0.025	0.950±0.020	1.101±0.022	1.052±0.050
10 ⁻¹⁰	---	1.114±0.039	1.288±0.067	1.061±0.007	1.154±0.068
	2.4	1.154±0.014	1.199±0.017	1.284±0.033	1.212±0.038
	1.2	0.890±0.030	1.052±0.007	1.286±0.010	1.076±0.114
	0.6	1.275±0.073	0.979±0.046	1.330±0.056	1.194±0.109
10 ⁻⁹	---	1.113±0.066	1.515±0.179	1.128±0.022	1.252±0.131 *
	2.4	1.253±0.005	1.511±0.003	1.662±0.054	1.475±0.119 ***
	1.2	0.895±0.007	1.372±0.044	1.489±0.061	1.252±0.181
	0.6	1.185±0.238	1.167±0.123	1.226±0.049	1.193±0.017
10 ⁻⁸	---	1.034±0.097	1.577±0.161	1.097±0.069	1.236±0.171 *
	2.4	1.237±0.018	1.566±0.031	1.738±0.044	1.514±0.146 ***
	1.2	0.863±0.010	1.337±0.016	1.740±0.102	1.314±0.253
	0.6	1.191±0.152	1.230±0.127	1.295±0.055	1.239±0.030
10 ⁻⁷	---	1.145±0.041	1.449±0.182	1.129±0.051	1.241±0.104 *
	2.4	1.173±0.016	1.511±0.036	1.761±0.039	1.481±0.170 ***
	1.2	0.898±0.014	1.358±0.075	1.705±0.077	1.320±0.233
	0.6	1.348±0.102	1.159±0.097	1.339±0.082	1.282±0.061
10 ⁻⁶	---	1.221±0.074	1.400±0.195	1.130±0.037	1.251±0.079 *
	2.4	1.383±0.020	1.601±0.010	2.074±0.085	1.686±0.203 ***
	1.2	0.895±0.008	1.546±0.035	2.087±0.023	1.509±0.344 *
	0.6	1.450±0.090	1.283±0.099	1.607±0.065	1.447±0.093 **
10 ⁻⁵	---	1.120±0.086	0.853±0.096	0.880±0.020	0.951±0.084
	2.4	1.165±0.007	1.484±0.026	1.978±0.017	1.542±0.236 ***
	1.2	0.884±0.001	1.768±0.090	2.195±0.047	1.616±0.385 **
	0.6	1.029±0.013	1.900±0.083	1.935±0.057	1.621±0.296 ***

^a El Índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1.

^b Representa la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones.

^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores de absorbancia (540nm) del grupo control, se emplea como una referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

* p<0.05 comparado con el control no tratado

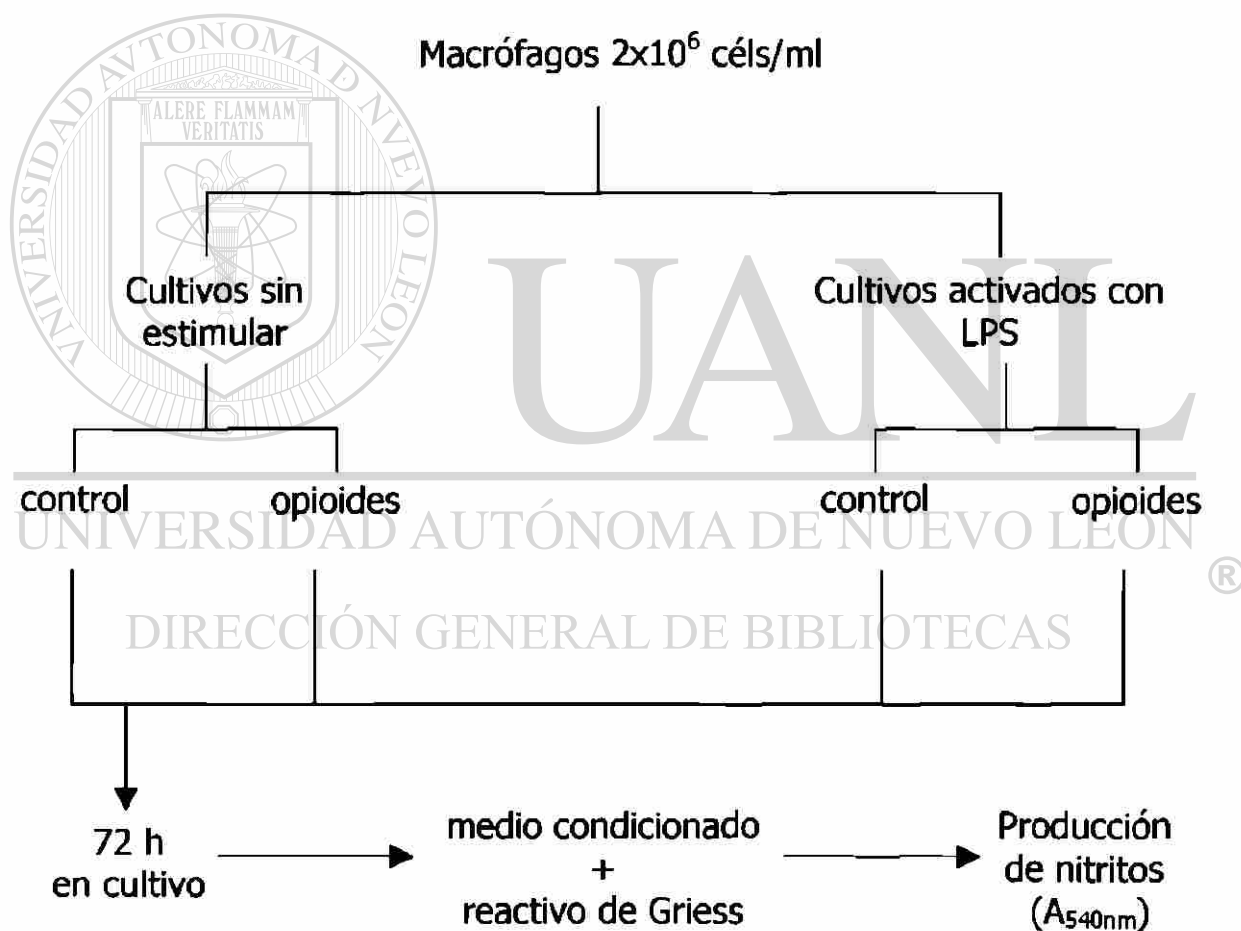
** p<0.01 comparado con el control no tratado

*** p<0.001 comparado con el control no tratado

6.1.2 - Producción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales de rata.

Para determinar el efecto de opioides no peptídicos sobre la producción *in vitro* de óxido nítrico, se utilizó el diseño experimental descrito (Protocolo experimental 2) Este nos permitió evaluar el efecto de opioides sobre macrófagos residentes y activados con LPS.

Protocolo experimental 2

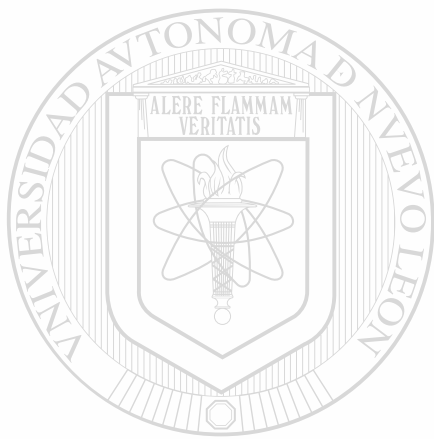


Los resultados se expresan en tres formas, *producción de nitritos*, *índice de producción de nitritos* y *viabilidad de macrófagos*. El primero es una medida directa de los nitritos producidos por oxidación del óxido nítrico liberado en el medio en cultivos de macrófagos tratados con opioides. Es una cantidad neta expresada en nanomoles/pozo. El índice de producción expresa la relación entre los nitritos producidos en los cultivos tratados y la cantidad de nitritos producido en el cultivo control; esta medida tiene la intención de corregir las diferencias entre experimentos en la producción basal de nitritos, y es por lo tanto una forma de normalizar los datos (*Current Protocols in Immunology*, 1994), se presentan también las lecturas en densidades ópticas de los controles para mostrar las variaciones observadas en los experimentos. Para finalizar se presentan los porcentajes de viabilidad observados en los cultivos control y tratados.

Los compuestos opioides que tuvieron efecto sobre la producción de óxido nítrico fueron el SNC80, 9332, y 9334, en los tres casos el efecto fue de inhibición. El SNC80 tiene efecto inhibitorio sobre macrófagos activados con LPS, en las concentraciones 10^{-9} y 10^{-6} M, con índices de producción de óxido nítrico de 0.846 y 0.840 respectivamente ($p < 0.001$), estos resultados están asociados con porcentajes de viabilidad de 80.723 y 90.534 (Tabla 2.1). Mientras que el opioide 9332 es capaz de inhibir la producción de óxido nítrico tanto de macrófagos residentes como activados, ambos en la concentración de 10^{-5} M, los índices de producción de óxido nítrico fueron de 0.406 y 0.605 respectivamente ($p < 0.001$), los porcentajes de viabilidad de los cultivos asociados con estos resultados fueron de 67.56 y 78.363 también en forma

respectiva (Tabla 2.2.). Se observó inhibición de la producción de óxido nítrico debida al compuesto 9334, con un índice de producción de 0.775 en la concentración 10^{-9} M del opioide ($p < 0.05$), y un porcentaje de viabilidad de las células igual a 88.930.

El 9333 (Tabla 2.3) y el 9336 (Tabla 2.5) no alteraron la producción de óxido nítrico.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

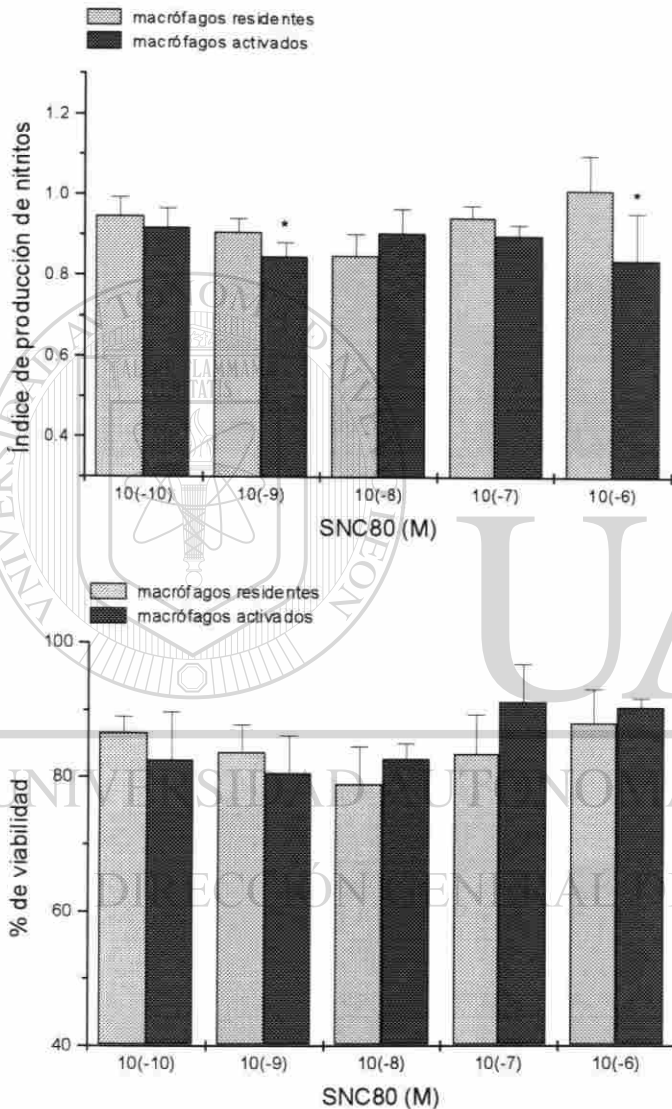


Figura 19. Efecto del SNC80 sobre la activación de macrófagos de rata.

Los cultivos de macrófagos fueron tratados con o sin SNC80 una noche previa. Las placas se incubaron por 72 horas a 37 °C. Al final del periodo de incubación se mezclaron alícuotas de 50 μl del medio condicionado de los cultivos de macrófagos con 50 μl del reactivo de Griess, las placas se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos y se midieron las densidades ópticas a 540 nm en un lector de microplacas.

Los macrófagos se activaron con LPS 0.02 μg/ml en un volumen final de 200 μl/pozo en medio AIM-V.

Para determinar la viabilidad de los cultivos de macrófagos tratados con SNC80 se empleó la prueba de viabilidad con MTT (5 mg/ml).

El índice de producción de nitritos se calcula con relación a la producción de nitritos observada en el grupo control, no tratado con SNC80.

Los datos representan la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

* p<0.05 comparado con el control no tratado

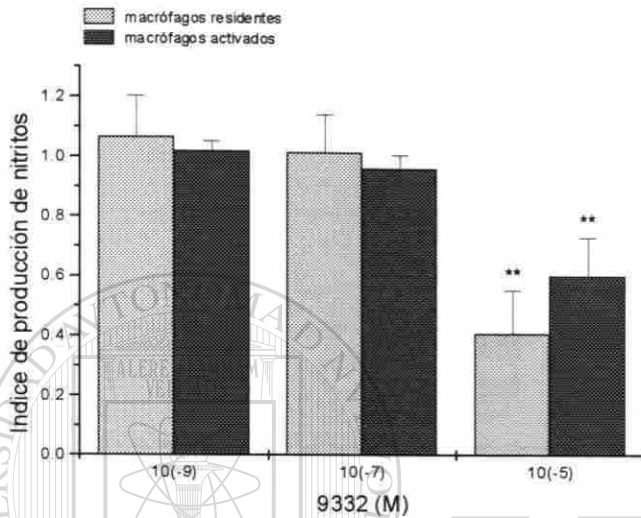


Figura 20. Efecto del opioide 9332 sobre la activación de macrófagos peritoneales de rata.

Los cultivos de macrófagos fueron tratados con o sin 9332 una noche previa. Las placas se incubaron por 72 horas a 37 °C. Al final del periodo de incubación se mezclaron alícuotas de 50 µl del medio condicionado de los cultivos de macrófagos con 50 µl del reactivo de Griess, las placas se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos y se midieron las densidades ópticas a 540 nm en un lector de microplacas.

Los macrófagos se activaron con LPS 0.02 µg/ml en un volumen final de 200 µl/pozo en medio AIM-V.

Para determinar la viabilidad de los cultivos de macrófagos tratados con 9332 se empleó la prueba de viabilidad con MTT (5 mg/ml).

El índice de producción de nitritos se calcula con relación a la producción de nitritos observada en el grupo control, no tratado con 9332.

Los datos representan la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

** p < 0.01 comparado con el control no tratado

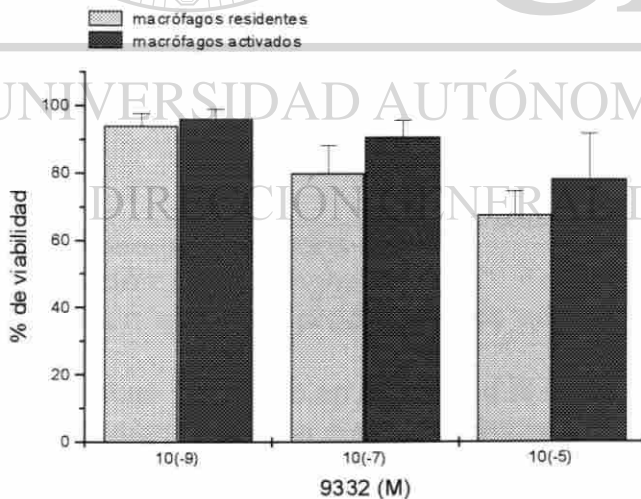


Tabla 2.1. Efecto del opioide SNC80 sobre la producción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales^a

Dosis (Molar)	Activación ^b	Nitritos nmol/pozo ^b	Índice de producción de nitritos ^c	% de viabilidad de macrófagos ^d
control	----	3.269 ± 1.080		
	LPS	8.860 ± 0.718		
10 ⁻¹¹	----	3.172 ± 0.905	0.996 ± 0.100	95.364 ± 5.283
	LPS	8.299 ± 0.541	0.942 ± 0.051	90.639 ± 7.503
10 ⁻¹⁰	----	3.018 ± 0.866	0.946 ± 0.044	86.813 ± 2.224
	LPS	8.062 ± 0.472	0.915 ± 0.049	82.630 ± 7.074
10 ⁻⁹	----	2.906 ± 0.876	0.907 ± 0.033	83.811 ± 4.024
	LPS	7.539 ± 0.884	0.846 ± 0.034 **	80.723 ± 5.504
10 ⁻⁸	----	2.669 ± 0.704	0.849 ± 0.054	79.041 ± 5.580
	LPS	7.980 ± 0.725	0.904 ± 0.062	82.778 ± 2.293
10 ⁻⁷	----	3.056 ± 0.967	0.945 ± 0.030	83.533 ± 5.876
	LPS	7.955 ± 0.448	0.901 ± 0.026	91.232 ± 5.696
10 ⁻⁶	----	3.501 ± 1.478	1.014 ± 0.088	88.045 ± 5.104
	LPS	7.298 ± 0.650	0.840 ± 0.117 **	90.534 ± 1.396
10 ⁻⁵	----	3.670 ± 1.180	1.126 ± 0.074	93.931 ± 4.756
	LPS	8.865 ± 0.683	1.002 ± 0.036	95.738 ± 1.790

^a Ver. Material y Métodos

^b Activación: LPS 20 ng/ml

^c Relación entre la producción de nitritos en los grupos tratados y el grupo control

^d Porcentaje calculado en relación a la viabilidad del grupo control.

^{b,c,d} Expresan la media ± error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas cada uno.

* p<0.05 comparado con el control no tratado

** p<0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 2.2. Efecto del opioide 9332 sobre la producción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales^a

Dosis (Molar)	Activación ^b	Nitritos nmol/pozo ^b	Índice de producción de nitritos ^c	% de viabilidad de macrófagos ^d
control	---	3.472 ± 1.759		
	LPS	8.163 ± 0.614		
10 ⁻¹¹	---	3.371 ± 1.635	0.997 ± 0.075	93.649 ± 10.446
	LPS	7.873 ± 0.412	0.969 ± 0.051	94.522 ± 5.369
10 ⁻¹⁰	---	3.467 ± 1.557	1.060 ± 0.072	87.206 ± 6.778
	LPS	8.299 ± 0.747	1.015 ± 0.036	92.123 ± 1.230
10 ⁻⁹	---	3.433 ± 1.505	1.067 ± 0.134	93.564 ± 4.175
	LPS	8.299 ± 0.630	1.017 ± 0.032	95.809 ± 3.221
10 ⁻⁸	---	3.361 ± 1.486	1.048 ± 0.181	86.453 ± 6.713
	LPS	8.396 ± 0.669	1.029 ± 0.042	89.006 ± 2.636
10 ⁻⁷	---	3.351 ± 1.577	1.011 ± 0.128	79.898 ± 8.359
	LPS	7.878 ± 0.827	0.962 ± 0.043	90.459 ± 5.231
10 ⁻⁶	---	3.264 ± 1.570	0.986 ± 0.195	89.391 ± 4.709
	LPS	8.173 ± 0.641	1.001 ± 0.032	91.583 ± 4.490
10 ⁻⁵	---	1.136 ± 0.363	0.406 ± 0.147 ***	67.566 ± 7.053
	LPS	5.073 ± 1.424	0.605 ± 0.126 ***	78.363 ± 13.498

^a Ver. Material y Métodos

^b Activación: LPS 20 ng/ml

^c Relación entre la producción de nitritos en los grupos tratados y el grupo control

^d Porcentaje calculado en relación a la viabilidad del grupo control.

^{b,c,d} Expresan la media ± error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas cada uno.

* p < 0.05 comparado con el control no tratado

** p < 0.01 comparado con el control no tratado

*** p < 0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 2.3. Efecto del opioide 9333 sobre la producción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales^a

Dosis (Molar)	Activación ^b	Nitritos nmol/pozo ^b	Índice de producción de nitritos ^c	% de viabilidad de macrófagos ^d
control	----	4.459±0.752		
	LPS	7.820±0.764		
10 ⁻¹¹	----	4.831±1.152	1.065±0.124	96.324±3.961
	LPS	7.481±0.684	0.957±0.006	87.905±7.683
10 ⁻¹⁰	----	4.449±0.754	0.997±0.008	95.342±3.945
	LPS	7.457±0.641	0.956±0.035	92.303±5.266
10 ⁻⁹	----	4.154±0.747	0.927±0.021	98.109±0.963
	LPS	7.148±0.826	0.912±0.051	92.557±4.838
10 ⁻⁸	----	4.372±0.800	0.974±0.021	99.139±3.990
	LPS	7.414±0.623	0.952±0.047	91.289±6.922
10 ⁻⁷	----	4.749±1.269	1.036±0.153	94.052±3.548
	LPS	7.530±0.793	0.962±0.036	90.640±12.943
10 ⁻⁶	----	4.435±0.859	0.985±0.046	96.475±1.654
	LPS	7.762±0.924	0.989±0.050	94.652±7.558
10 ⁻⁵	----	5.208±1.126	1.145±0.073	107.263±4.516
	LPS	8.487±0.889	1.083±0.028	103.572±9.985

^a Ver. Material y Métodos

^b Activación: LPS 20 ng/ml

^c Relación entre la producción de nitritos en los grupos tratados y el grupo control

^d Porcentaje calculado en relación a la viabilidad del grupo control.

^{b,c,d} Expresan la media ± error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas cada uno.

* p<0.05 comparado con el control no tratado

Tabla 2.4. Efecto del opioide 9334 sobre la producción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales^a

Dosis (Molar)	Activación ^b	Nitritos nmol/pozo ^b	Índice de producción de nitritos ^c	% de viabilidad de macrófagos ^d
control	----	4.323±1.493		
	LPS	7.419±0.814		
10 ⁻¹¹	----	4.004±1.260	0.967±0.059	104.589±10.248
	LPS	6.862±0.909	0.921±0.035	98.326±8.479
10 ⁻¹⁰	----	4.111±1.568	0.895±0.082	101.477±5.122
	LPS	6.166±1.276	0.819±0.121	91.747±5.591
10 ⁻⁹	----	3.907±1.517	0.846±0.083	98.067±1.081
	LPS	5.856±1.426	0.775±0.153 *	88.930±6.454
10 ⁻⁸	----	4.057±1.576	0.870±0.107	96.343±4.938
	LPS	6.040±1.194	0.804±0.112	88.827±8.141
10 ⁻⁷	----	3.757±1.492	0.797±0.105	97.673±9.377
	LPS	6.035±1.353	0.796±0.113	98.816±9.816
10 ⁻⁶	----	4.014±1.605	0.851±0.112	105.257±9.959
	LPS	6.243±1.453	0.823±0.129	99.765±8.606
10 ⁻⁵	----	4.710±1.893	0.987±0.176	106.349±5.105
	LPS	7.844±0.893	1.058±0.047	111.154±7.415

^a Ver. Material y Métodos

^b Activación: LPS 20 ng/ml

^c Relación entre la producción de nitritos en los grupos tratados y el grupo control

^d Porcentaje calculado en relación a la viabilidad del grupo control.

^{b,c,d} Expresan la media ± error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas cada uno.

* p<0.05 comparado con el control no tratado

Tabla 2.5. Efecto del opioide 9336 sobre la producción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales^a

Dosis (Molar)	Activación ^b	Nitritos nmol/pozo ^b	Índice de producción de nitritos ^c	% de viabilidad de macrófagos ^d
control	----	3.192±1.090		
	LPS	8.981±1.627		
10 ⁻¹¹	----	4.130±1.146	1.472±0.285	114.381±8.938
	LPS	9.653±0.633	1.143±0.216	117.657±8.754
10 ⁻¹⁰	----	4.202±1.788	1.220±0.191	103.009±2.166
	LPS	6.872±1.881	0.738±0.115	102.761±6.239
10 ⁻⁹	----	2.810±1.059	0.830±0.085	100.644±3.854
	LPS	6.978±2.922	0.706±0.224	100.303±2.574
10 ⁻⁸	----	2.785±1.066	0.818±0.100	97.052±2.033
	LPS	7.554±2.511	0.792±0.156	97.106±3.600
10 ⁻⁷	----	2.964±1.205	0.851±0.155	97.790±2.680
	LPS	7.854±2.412	0.832±0.131	98.545±3.632
10 ⁻⁶	----	3.825±1.875	1.002±0.313	100.946±4.522
	LPS	6.945±1.891	0.748±0.127	100.739±7.426
10 ⁻⁵	----	3.143±1.273	0.887±0.158	111.573±1.565
	LPS	7.825±2.549	0.822±0.155	111.353±3.059

^a Ver. Material y Métodos

^b Activación: LPS 20 ng/ml

^c Relación entre la producción de nitritos en los grupos tratados y el grupo control

^d Porcentaje calculado en relación a la viabilidad del grupo control.

^{b,c,d} Expresan la media ± error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas cada uno.

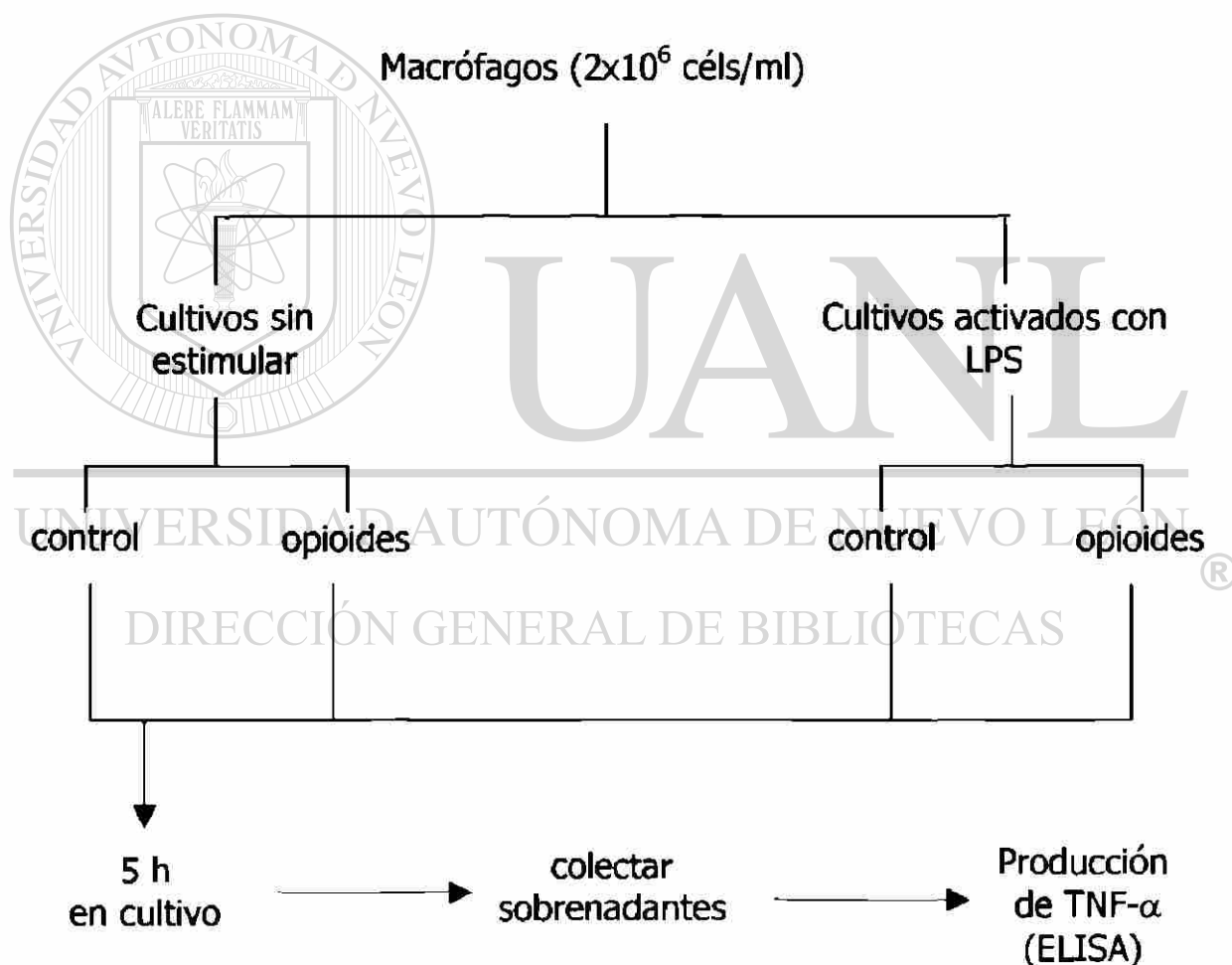
* p<0.05 comparado con el control no tratado

* p<0.01 comparado con el control no tratado

6.1.3 Producción de TNF- α por macrófagos de rata.

De la misma forma que para la producción de óxido nítrico, se determinaron los niveles de TNF- α producidos por macrófagos residentes y activados (LPS) que fueron tratados con opioides a diferentes concentraciones (Protocolo experimental 3).

Protocolo Experimental 3



Ninguno de los opioides utilizados alteró la producción de TNF- α por macrófagos peritoneales (Tabla 3.1-3.5)

Tabla 3.1 Efecto del SNC80 sobre la producción de factor de necrosis tumoral alfa por macrófagos peritoneales de rata ^a

Dosis (Molar)	Act. ^b	R1 ^c	R2 ^c	TNF- α ^d pg/ml	Índice de producción de TNF- α ^e
control	---	775 \pm 290	1340 \pm 299	1057 \pm 283	
10 ⁻¹¹	LPS	2362 \pm 946	895 \pm 48	1628 \pm 733	
	---	655 \pm 93	868 \pm 140	761 \pm 106	0.746
10 ⁻⁹	LPS	2205 \pm 605	749 \pm 10	1476 \pm 728	0.885
	---	636 \pm 201	921 \pm 72	778 \pm 142	0.754
10 ⁻⁷	LPS	2463 \pm 68	921 \pm 72	1692 \pm 771	1.036
	---	764 \pm 306	749 \pm 10	756 \pm 7	0.772
	LPS	2665 \pm 119	868 \pm 139	1767 \pm 898	1.049

^a Ver Material y Métodos

^b Activación: LPS 20 ng/ml

^c Representa la media \pm el error estándar de un experimento representativo con 2 repeticiones para la prueba ELISA. Cada repetición de un experimento representa a su vez 3 repeticiones (sobrenadantes del cultivo de macrófagos empleados en ELISA).

^d Representa la media \pm el error estándar de dos experimentos representativos.

^e El Índice de producción de TNF- α se calculó como la relación entre la producción de TNF- α en los grupos tratados y el grupo control

Tabla 3.2 Efecto del 9332 sobre la producción de factor de necrosis tumoral alfa por macrófagos peritoneales de rata ^a

Dosis (Molar)	Act. ^b	R1 ^c	R2 ^c	TNF- α ^d pg/ml	Índice de producción de TNF- α ^e
control	---	726±164	490±12	608±117	
	LPS	15120±343	310±29	911±600	
10 ⁻¹¹	---	752±80	464±9	608±144	0.991
	LPS	1254±378	913±99	1083±170	1.884
10 ⁻⁹	---	572±19	591±29	582±9	0.997
	LPS	1519±24	711±110	1115±404	1.646
10 ⁻⁷	---	595±26	516±176	555±39	0.936
	LPS	14635±77	512±51	988±475	1.309

^a Ver Material y Métodos

^b Activación: LPS 20 ng/ml

^c Representa la media \pm el error estándar de un experimento representativo con 2 repeticiones para la prueba ELISA. Cada repetición de un experimento representa a su vez 3 repeticiones (sobrenadantes del cultivo de macrófagos empleados en ELISA).

^d Representa la media \pm el error estándar de dos experimentos representativos.

^e El Índice de producción de TNF- α se calculó como la relación entre la producción de TNF- α en los grupos tratados y el grupo control

Tabla 3.3 Efecto del 9333 sobre la producción de factor de necrosis tumoral alfa por macrófagos peritoneales de rata ^a

Dosis (Molar)	Act. ^b	R1 ^c	R2 ^c	TNF- α ^d pg/ml	Índice de producción de TNF- α ^e
control	---	726±164	490±12	608±117	
	LPS	1512±343	310±29	911±600	
10 ⁻¹¹	---	849±156	610±111	730±119	1.207
	LPS	1710±178	580±176	1145±565	1.499
10 ⁻⁹	---	685±152	303±11	494±190	0.780
	LPS	2448±379	438±50	1443±1005	1.514
10 ⁻⁷	---	453±100	550±6	501±48	0.872
	LPS	1909±684	1003±286	1456±452	2.245

^a Ver Material y Métodos

^b Activación: LPS 20 ng/ml

^c Representa la media \pm el error estándar de un experimento representativo con 2 repeticiones para la prueba ELISA. Cada repetición de un experimento representa a su vez 3 repeticiones (sobrenadantes del cultivo de macrófagos empleados en ELISA).

^d Representa la media \pm el error estándar de dos experimentos representativos.

^e El Índice de producción de TNF- α se calculó como la relación entre la producción de TNF- α en los grupos tratados y el grupo control

Tabla 3.4 Efecto del 9334 sobre la producción de factor de necrosis tumoral alfa por macrófagos peritoneales de rata ^a

Dosis (Molar)	Act. ^b	R1 ^c	R2 ^c	TNF- α ^d pg/ml	Índice de producción de TNF- α ^e
control	---	726±164	490±12	608±117	
10 ⁻¹¹	LPS	1512±343	310±29	911±600	
	---	670±145	789±283	730±59	1.266
10 ⁻⁹	LPS	1096±242	789±283	943±153	1.633
	---	984±123	778±185	881±102	1.471
10 ⁻⁷	LPS	1108±17	778±185	943±164	1.619
	---	565±32	1078±433	821±256	1.488
	LPS	1351±42	1078±433	1214±136	2.181

^a Ver Material y Métodos

^b Activación: LPS 20 ng/ml

^c Representa la media \pm el error estándar de un experimento representativo con 2 repeticiones para la prueba ELISA. Cada repetición de un experimento representa a su vez 3 repeticiones (sobrenadantes del cultivo de macrófagos empleados en ELISA).

^d Representa la media \pm el error estándar de dos experimentos representativos.

^e El Índice de producción de TNF- α se calculó como la relación entre la producción de TNF- α en los grupos tratados y el grupo control

Tabla 3.5 Efecto del 9336 sobre la producción de factor de necrosis tumoral alfa por macrófagos peritoneales de rata ^a

Dosis (Molar)	Act. ^b	R1 ^c	R2 ^c	TNF- α ^d pg/ml	Índice de producción de TNF- α ^e
control	---	774±289	1340±299	1057±282	
	LPS	2362±946	1033±58	1697±664	
10 ⁻¹¹	---	681±16	905±92	793±112	0.777
	LPS	3028±254	1179±34	2103±924	1.211
10 ⁻⁹	---	640±138	595±202	617±22	0.635
	LPS	3309±558	1621±966	2465±844	1.484
10 ⁻⁷	---	610±13	883±351	746±136	0.723
	LPS	2953±720	977±34	1965±988	1.098

^a Ver Material y Métodos

^b Activación: LPS 20 ng/ml

^c Representa la media \pm el error estándar de un experimento representativo con 2 repeticiones para la prueba ELISA. Cada repetición de un experimento representa a su vez 3 repeticiones (sobrenadantes del cultivo de macrófagos empleados en ELISA).

^d Representa la media \pm el error estándar de dos experimentos representativos.

^e El Índice de producción de TNF- α se calculó como la relación entre la producción de TNF- α en los grupos tratados y el grupo control

Tabla 4.1. Efecto del SNC80 sobre la fagocitosis de la levadura *Candida albicans* por macrófagos peritoneales de rata ^a

Concentración (Molar)	Act. ^b	R1 ^c	R2 ^c	R3 ^c	Porcentaje fagocitosis	Índice de fagocitosis
control	---	11±0	12.5±2.5	8.5±0.5	10.66±1.16	
	LPS	14.5±2.5	11±2	9±1	11.5±1.60	
10 ⁻¹⁰	---	18±8	6±1	5±4	9.66±4.17	0.901
	LPS	18±2	7.5±1.5	8.5±1.5	11.33±3.34	0.955
10 ⁻⁸	---	7.5±1.5	14±1	5.5±0.5	9±2.56	0.816
	LPS	10.5±0.5	17.5±2.5	7.5±0.5	11.83±2.96	1.049
10 ⁻⁶	---	12.5±2.5	9.5±1.5	8.5±1.5	10.16±1.20	0.965
	LPS	13.5±4.5	11.5±5.5	4.5±2.5	9.83±2.72	0.825

^a Ver Material y Métodos.

^b Activación: LPS 20 ng/ml

^c Representa la media ± el error estándar de un experimento representativo con 2 repeticiones

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 4.2 Efecto del 9332 sobre la fagocitosis de la levadura *Candida albicans* por macrófagos peritoneales de rata ^a

Concentración (Molar)	Act. ^b	R1 ^c	R2 ^c	R3 ^c	Porcentaje fagocitosis	Índice de fagocitosis
control	---	30±2	25.5±5.5	34.5±1.5	30±2.59	
	LPS	12±1	19±14	33±1	21.33±6.17	
10 ⁻¹⁰	---	17±1	18±4	34±6	23±5.50	0.752
	LPS	17.5±2.5	8.5±2.5	21±5	15.66±3.72	0.847
10 ⁻⁸	---	25±4	28.5±4.5	38±7	30.5±3.88	1.017
	LPS	15.5±3.5	16.5±1.5	23±1	18.33±2.35	0.952
10 ⁻⁶	---	27.5±3.5	15.5±3.5	36.5±5.5	26.5±6.08	0.860
	LPS	16.5±8.5	16±7	30.5±0.5	21±4.75	1.047

^a Ver Material y Métodos.

^b Activación: LPS 20 ng/ml

^c Representa la media ± el error estándar de un experimento representativo con 2 repeticiones

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 4.3 Efecto del 9333 sobre la fagocitosis de la levadura *Candida albicans* por macrófagos peritoneales de rata ^a

Concentración (Molar)	Act. ^b	R1 ^c	R2 ^c	R3 ^c	Porcentaje fagocitosis	Índice de fagocitosis
control	----	5±1	12±3	10.5±1.5	9.16±2.12	
	LPS	5.5±1.5	6±2	9.5±1.5	7±1.25	
10 ⁻¹⁰	----	11.5±5.5	6±0	6.5±0.5	8±1.75	1.139
	LPS	8±2.5	4±1.5	7.5±2.5	6.5±1.25	0.970
10 ⁻⁸	----	3±1	9±4	5±2	5.66±1.76	0.608
	LPS	2.5±0.5	5.5±1.5	7.5±2.5	5.16±1.45	0.720
10 ⁻⁶	----	3±2	6±0	7.5±0.5	5.5±1.32	0.604
	LPS	5.5±2	6±3	9±4	6.83±1.09	0.982

^a Ver Material y Métodos.

^b Activación: LPS 20 ng/ml

^c Representa la media ± el error estándar de un experimento representativo con 2 repeticiones

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 4.4 Efecto del 9334 sobre la fagocitosis de la levadura *Candida albicans* por macrófagos peritoneales de rata ^a

Concentración (Molar)	Act. ^b	R1 ^c	R2 ^c	R3 ^c	Porcentaje fagocitosis	Índice de fagocitosis
control	---	23.5±7.5	17.5±10.5	41.5±3.5	27.5±7.21	
	LPS	15.5±2.5	16.5±4.5	38±7	23.33±7.33	
10 ⁻¹⁰	---	13.5±6.5	11±4	40.5±4.5	21.66±9.44	0.726
	LPS	15±8	17.5±4.5	27±9	19.83±3.65	0.912
10 ⁻⁸	---	12±2	10.5±3.5	46±1	22.83±11.59	0.739
	LPS	19±3	9±3	44.5±17.5	24.16±10.56	0.980
10 ⁻⁶	---	19.5±1.5	17.5±2.5	21.5±4.5	19.5±1.15	0.782
	LPS	13.5±7.5	17.5±3.5	40.5±3.5	23.83±8.41	0.999

^a Ver Material y Métodos.

^b Activación: LPS 20 ng/ml

^c Representa la media ± el error estándar de un experimento representativo con 2 repeticiones

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 4.5 Efecto del 9336 sobre la fagocitosis de la levadura *Candida albicans* por macrófagos peritoneales de rata ^a

Concentración (Molar)	Act. ^b	R1 ^c	R2 ^c	R3 ^c	Porcentaje fagocitosis	Índice de fagocitosis
control	---	27±8	28±7	27±1	27.33±0.33	
	LPS	17±3	20.5±5.5	15.5±10.5	17.66±1.48	
10 ⁻¹⁰	---	18.5±5.5	24.5±6.5	10.5±1.5	17.83±4.05	0.649
	LPS	16.5±4.5	12±1	14.5±0.5	14.33±1.30	0.830
10 ⁻⁸	---	20.5±3.5	22±1	12±2	18.16±3.11	0.663
	LPS	22±1	21.5±8.5	12.5±2.5	18.66±3.08	1.049
10 ⁻⁶	---	22.5±1.5	23±2	10±3	18.5±4.25	0.675
	LPS	11.5±0.5	13±0	15±8	13.16±1.01	0.759

^a Ver Material y Métodos.

^b Activación: 20 ng/ml

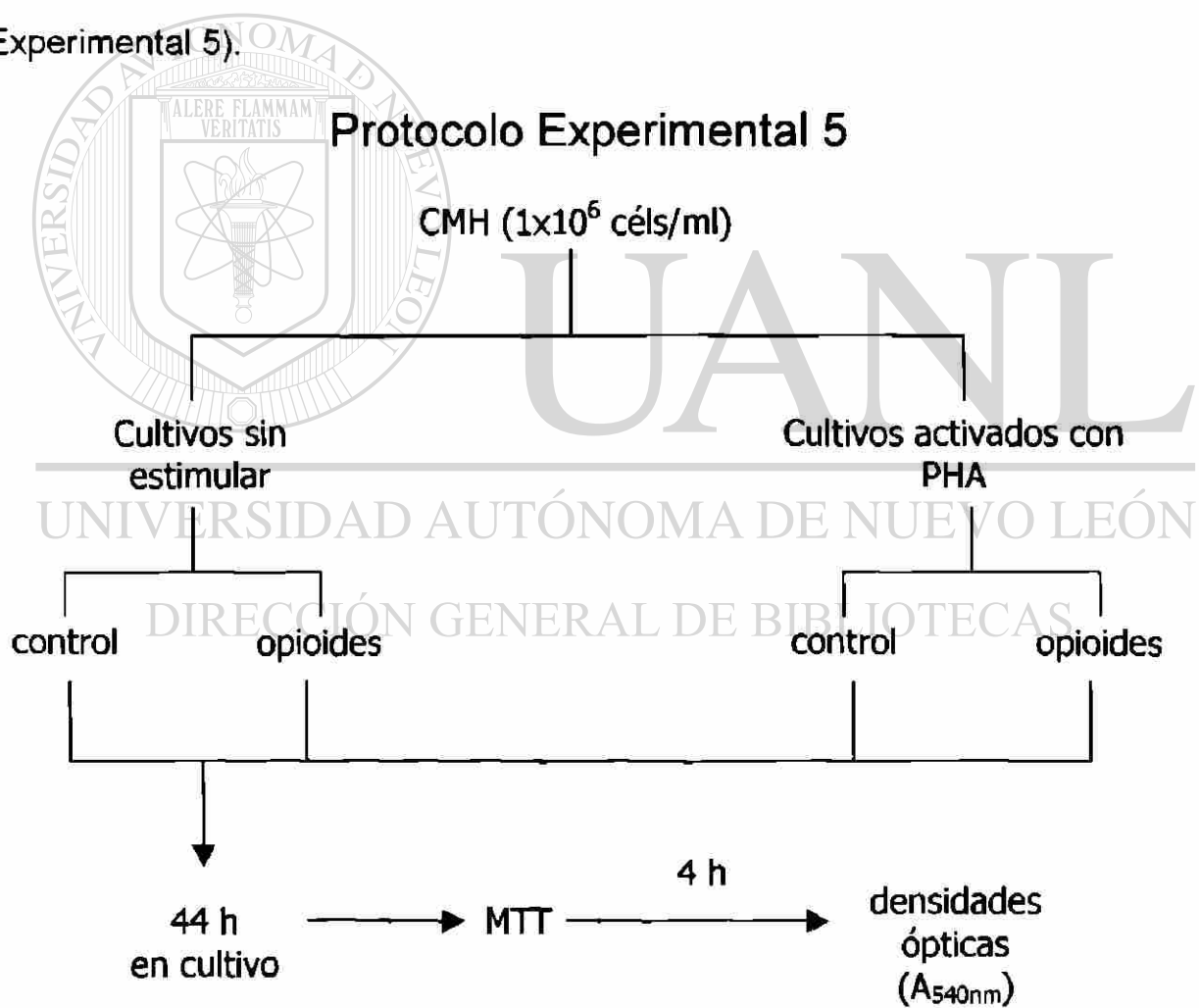
^c Representa la media ± el error estándar de un experimento representativo con 2 repeticiones

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

6.2 Efecto de opioides sobre las funciones de células mononucleares y monocitos humanos

6.2.1 Respuesta proliferativa de células mononucleares humanas.

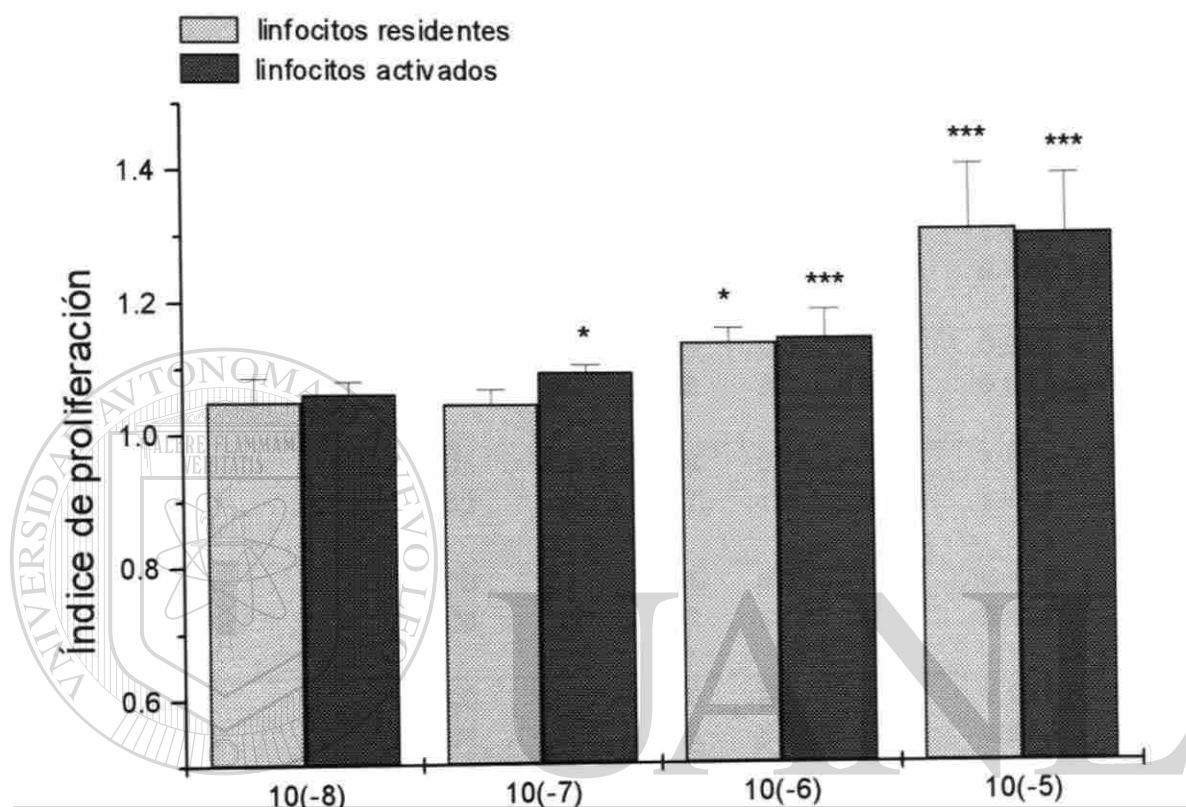
Como en el caso de linfocitos de rata, para la proliferación de células mononucleares humanas se determinó el efecto de opioides sobre células no activadas y activadas con PHA a una concentración subóptima (Protocolo Experimental 5).



Se observó que dos de los compuestos evaluados tienen algún tipo de actividad sobre la proliferación *in vitro* de las CMH. El 9332 (10^{-5} M) tiene un efecto inhibitor de la proliferación de las CMH tanto en células residentes como sobre aquellas que fueron preactivadas con PHA 20 $\mu\text{g/ml}$. En ambos casos la inhibición fue de alrededor del 30%, en el primer caso con un índice de proliferación de 0.727 y en el segundo se encontró un índice de proliferación de 0.676, ambos con una alta significancia ($p < 0.001$) (Tabla 5.2).

El compuesto 9336 por su parte, estimuló la proliferación de CMH residentes y activados. En CMH residentes, el 9336 a las concentraciones de 10^{-6} y 10^{-5} estimuló la proliferación linfoide con índices de 1.136 y 1.311 ($p < 0.001$); en CMH activadas la estimulación es también dependiente de la concentración de opioide, pues las concentraciones 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M tuvieron índices respectivos de 1.092, 1.147 y 1.304, todos con alta significancia estadística (Figuras 21 y Tabla 5.5).

Los opioides SNC80 (Tabla 5.1), 9333 (Tabla 5.3) y 9334 (Tabla 5.4, no alteraron la proliferación de CMH residentes o activadas con PHA.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 21. Efecto del 9336 sobre la proliferación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica humana. La determinación de la proliferación *in vitro*, se realizó mediante la medición de la incorporación de MTT a las células en cultivo. Para ello se preparó una suspensión de células mononucleares a una densidad de 10^6 células/ml. Las suspensiones celulares ($100 \mu\text{l}$ /pozo) se depositaron en placas de 96 pozos en la presencia o ausencia de 9336. Después de incubar por 44 horas se añadió el MTT (0.5 mg/ml), y los cultivos se incubaron por cuatro horas adicionales. Se añadieron $100 \mu\text{l}$ /pozo de buffer para lisis celular, y se incubaron durante toda la noche. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm .

Los linfocitos se activaron con PHA a una concentración de $20 \mu\text{g/ml}$

Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

* $p < 0.05$ comparado con el control no tratado

*** $p < 0.01$ comparado con el control no tratado

Tabla 5.1. Efecto del opioide SNC80 sobre el Índice de proliferación de células mononucleares humanas^a

Dosis (Molar)	Activación ^e	E1 ^b	E2 ^b	E3 ^b	Índice de proliferación ^c
control ^d	---	0.331±0.003	0.426±0.007	0.801±0.040	
	PHA	0.397±0.006	0.386±0.005	0.775±0.025	
10 ⁻¹¹	---	1.046±0.005	0.996±0.006	0.935±0.016	0.992±0.031
	PHA	1.016±0.018	1.001±0.001	0.941±0.011	0.986±0.022
10 ⁻¹⁰	---	1.036±0.007	1.003±0.042	1.010±0.026	1.016±0.009
	PHA	0.937±0.003	1.013±0.015	1.009±0.010	0.986±0.024
10 ⁻⁹	---	0.987±0.004	0.979±0.025	0.952±0.021	0.973±0.010
	PHA	0.927±0.023	0.973±0.026	1.058±0.014	0.986±0.038
10 ⁻⁸	---	1.012±0.005	1.049±0.019	0.966±0.011	1.009±0.023
	PHA	0.947±0.025	1.130±0.017	1.053±0.039	1.043±0.053
10 ⁻⁷	---	0.998±0.003	0.991±0.006	0.964±0.005	0.984±0.010
	PHA	0.947±0.006	1.025±0.021	1.010±0.013	0.994±0.023
10 ⁻⁶	---	0.980±0.003	0.987±0.020	0.955±0.018	0.974±0.009
	PHA	0.958±0.004	0.949±0.008	0.953±0.026	0.953±0.002
10 ⁻⁵	---	0.982±0.005	0.988±0.023	0.992±0.023	0.988±0.002
	PHA	0.955±0.018	0.993±0.009	1.000±0.007	0.983±0.013

^a El Índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento = 1

^b Representa la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones.

^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores de absorbancia (540nm) del grupo control, se emplea como una referencia de la proliferación basal de las células mononucleares en cultivo.

^e Activación: PHA 20 µg/ml

Tabla 5.2. Efecto del opioide 9332 sobre el Índice de proliferación^a de células mononucleares humanas

Dosis (Molar)	Activación ^e	E1 ^b	E2 ^b	E3 ^b	Índice de proliferación ^c
control ^d	----	0.356±0.003	0.453±0.021	0.744±0.008	
	PHA	0.382±0.004	0.447±0.025	0.746±0.022	
10 ⁻¹¹	----	0.972±0.017	0.927±0.030	0.992±0.023	0.964±0.019
	PHA	1.008±0.019	0.943±0.010	1.004±0.011	0.985±0.021
10 ⁻¹⁰	----	0.990±0.011	1.070±0.024	0.980±0.029	1.013±0.028
	PHA	1.004±0.011	0.997±0.005	0.991±0.034	0.997±0.003
10 ⁻⁹	----	0.977±0.025	1.124±0.049	1.076±0.013	1.059±0.043
	PHA	0.953±0.010	0.999±0.026	1.003±0.072	0.985±0.015
10 ⁻⁸	----	0.983±0.034	1.012±0.007	1.070±0.019	1.021±0.025
	PHA	0.952±0.007	0.959±0.011	0.995±0.049	0.969±0.013
10 ⁻⁷	----	0.984±0.030	0.992±0.035	1.076±0.012	1.017±0.029
	PHA	0.963±0.009	0.976±0.024	0.982±0.063	0.974±0.005
10 ⁻⁶	----	1.012±0.016	1.025±0.010	1.016±0.015	1.017±0.004
	PHA	0.989±0.012	0.986±0.025	0.987±0.047	0.988±0.000
10 ⁻⁵	----	0.492±0.010	0.936±0.037	0.754±0.021	0.727±0.128 **
	PHA	0.437±0.003	0.829±0.026	0.763±0.029	0.676±0.121 ***

^a El Índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento = 1

^b Representa la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones.

^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores de absorbancia (540nm) del grupo control, se emplea como una referencia de la proliferación basal de las células mononucleares en cultivo.

^e Activación: PHA 20 µg/ml

** p<0.01 comparado con el control no tratado

*** p<0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 5.3. Efecto del opioide 9333 sobre el índice de proliferación^a de células mononucleares humanas

Dosis (Molar)	Activación ^e	E1 ^b	E2 ^b	E3 ^b	Índice de proliferación ^c
control ^d	---	0.382±0.002	0.455±0.008	0.764±0.009	
	PHA	0.425±0.004	0.406±0.007	0.792±0.016	
10 ⁻¹¹	---	1.048±0.016	0.942±0.022	0.980±0.011	0.990±0.030
	PHA	1.033±0.002	0.963±0.017	0.941±0.014	0.979±0.027
10 ⁻¹⁰	---	1.048±0.036	1.001±0.033	0.922±0.005	0.991±0.036
	PHA	1.014±0.028	1.041±0.009	0.965±0.031	1.007±0.022
10 ⁻⁹	---	1.036±0.017	0.950±0.038	1.265±0.010	1.083±0.093
	PHA	1.076±0.009	1.012±0.009	0.939±0.033	1.009±0.039
10 ⁻⁸	---	1.042±0.027	1.017±0.030	1.147±0.035	1.069±0.039
	PHA	1.050±0.015	1.027±0.031	0.976±0.025	1.018±0.021
10 ⁻⁷	---	1.000±0.005	0.961±0.020	0.963±0.020	0.975±0.012
	PHA	1.018±0.007	1.036±0.019	0.963±0.003	1.006±0.022
10 ⁻⁶	---	1.013±0.013	0.971±0.009	0.979±0.025	0.988±0.013
	PHA	1.050±0.006	0.971±0.008	0.961±0.025	0.996±0.030
10 ⁻⁵	---	1.074±0.010	0.989±0.008	1.015±0.021	1.026±0.024
	PHA	1.042±0.008	1.019±0.010	0.950±0.013	1.004±0.027

^a El Índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento = 1

^b Representa la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones.

^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores de absorbancia (540nm) del grupo control, se emplea como una referencia de la proliferación basal de las células mononucleares en cultivo.

^e Activación: PHA 20 µg/ml

Tabla 5.4. Efecto del opioide 9334 sobre el índice de proliferación^a de células mononucleares humanas

Dosis (Molar)	Activación ^e	E1 ^b	E2 ^b	E3 ^b	Índice de proliferación ^c
control ^d	---	0.379±0.007	0.398±0.008	0.793±0.008	
	PHA	0.473±0.013	0.401±0.006	0.780±0.006	
10 ⁻¹¹	---	1.007±0.009	1.049±0.014	0.975±0.018	1.010±0.021
	PHA	1.004±0.029	1.013±0.028	0.972±0.018	0.996±0.012
10 ⁻¹⁰	---	0.969±0.007	1.140±0.020	0.982±0.051	1.030±0.055
	PHA	0.998±0.034	1.018±0.017	0.937±0.035	0.984±0.024
10 ⁻⁹	---	1.033±0.015	1.186±0.013	0.967±0.027	1.062±0.064
	PHA	0.975±0.031	1.056±0.028	1.173±0.026	1.068±0.057
10 ⁻⁸	---	1.072±0.017	1.097±0.000	0.924±0.025	1.031±0.053
	PHA	0.943±0.009	1.059±0.011	1.074±0.091	1.026±0.041
10 ⁻⁷	---	0.961±0.009	1.117±0.033	0.955±0.012	1.011±0.053
	PHA	0.915±0.025	1.014±0.014	0.953±0.017	0.961±0.028
10 ⁻⁶	---	1.009±0.013	1.069±0.006	0.973±0.022	1.017±0.027
	PHA	0.950±0.010	1.015±0.013	0.979±0.029	0.981±0.019
10 ⁻⁵	---	1.098±0.034	1.123±0.007	0.993±0.019	1.071±0.039
	PHA	1.003±0.022	1.092±0.011	0.991±0.021	1.029±0.031

^a El índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo índice de crecimiento = 1

^b Representa la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones.

^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores de absorbancia (540nm) del grupo control, se emplea como una referencia de la proliferación basal de las células mononucleares en cultivo.

^e Activación: PHA 20 µg/ml

Tabla 5.5. Efecto del opioide 9336 sobre el Índice de proliferación^a de células mononucleares humanas

Dosis (Molar)	Activación ^e	E1 ^b	E2 ^b	E3 ^b	Índice de proliferación ^c
control ^d	---	0.334±0.005	0.450±0.002	0.757±0.022	
	PHA	0.392±0.004	0.389±0.011	0.73±0.007	
10 ⁻¹¹	---	1.033±0.031	1.054±0.008	0.930±0.041	1.009±0.034
	PHA	1.037±0.006	1.018±0.005	0.941±0.013	0.999±0.029
10 ⁻¹⁰	---	1.026±0.029	1.024±0.032	0.962±0.017	1.018±0.007
	PHA	1.034±0.027	1.039±0.034	1.004±0.017	1.026±0.010
10 ⁻⁹	---	1.042±0.015	1.009±0.045	0.949±0.004	1.051±0.027
	PHA	1.048±0.018	1.005±0.021	1.102±0.018	1.051±0.028
10 ⁻⁸	---	0.980±0.006	1.088±0.006	0.959±0.032	1.050±0.035
	PHA	1.022±0.011	1.075±0.003	1.083±0.027	1.060±0.019
10 ⁻⁷	---	1.038±0.009	1.010±0.023	1.027±0.021	1.045±0.022
	PHA	1.073±0.019	1.115±0.020	1.088±0.022	1.092±0.012 *
10 ⁻⁶	---	1.184±0.008	1.102±0.014	1.143±0.005	1.136±0.024 ***
	PHA	1.229±0.012	1.088±0.007	1.123±0.012	1.147±0.042 ***
10 ⁻⁵	---	1.507±0.016	1.234±0.042	1.221±0.020	1.311±0.099 ***
	PHA	1.483±0.007	1.239±0.036	1.190±0.024	1.304±0.090 ***

^a El Índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento = 1

^b Representa la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones.

^c Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores de absorbancia (540nm) del grupo control, se emplea como una referencia de la proliferación basal de las células mononucleares en cultivo.

^e Activación: PHA 20 µg/ml

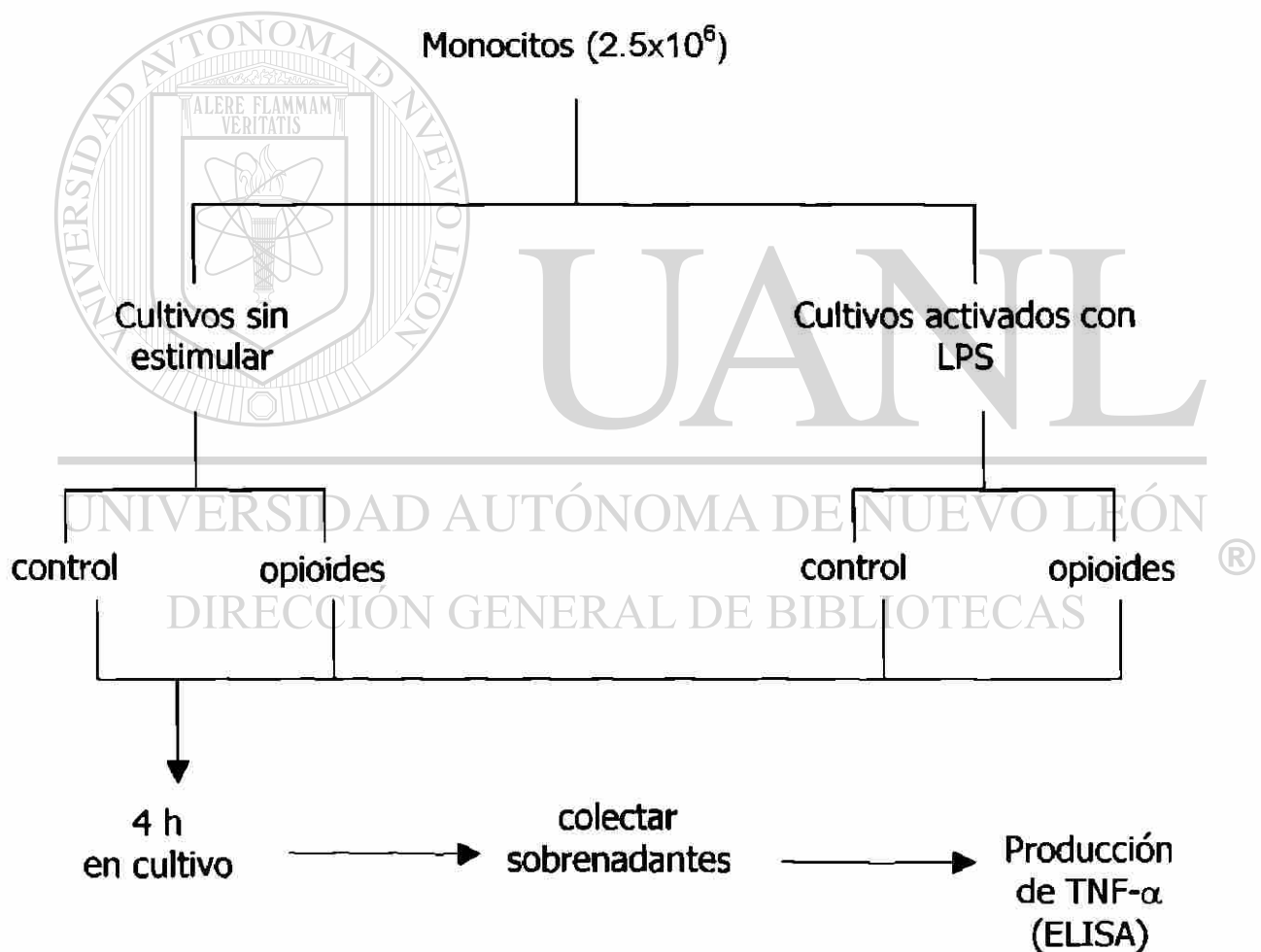
** p<0.01 comparado con el control no tratado

*** p<0.001 comparado con el control no tratado

6.2.2 Producción de TNF- α por monocitos humanos.

Se evaluó el efecto de opioides sobre la producción de TNF- α por monocitos humanos no activados y activados con LPS (a una concentración de 0.001 $\mu\text{g/ml}$, determinada con una curva dosis-respuesta).

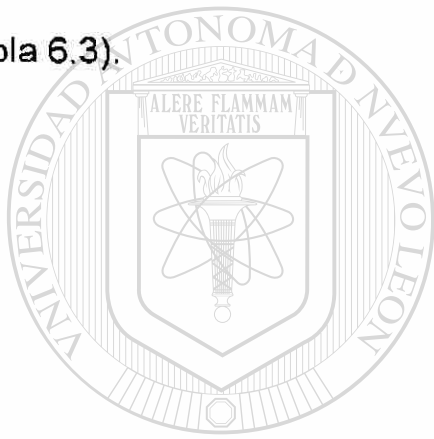
Protocolo Experimental 6



Se observó que los compuestos SNC80, 9332 y 9333 alteraron la producción de TNF- α por monocitos humanos. El SNC80 estimuló la producción de TNF- α por monocitos residentes en forma significativa a la

concentración 10^{-6} M (índice =1.285, $p<0.05$) (Figura 22 y Tabla 6.1). El 9332 inhibió la producción de TNF- α por monocitos residentes en las concentraciones de 10^{-12} , 10^{-9} , y 10^{-6} M, (los índices de producción de la citocina fueron de 0.698, 0.678 y 0.751 respectivamente, $p<0.01$) (Figura 23 y Tabla 6.1).

En monocitos residentes el 9333 a la concentración de 10^{-12} M inhibe la producción de TNF- α , con un índice de 0.698 ($p<0.05$). En monocitos activados la inhibición se observa en las concentraciones de 10^{-12} y 10^{-9} M, con índices de producción de TNF- α de 0.753 y 0.814 respectivamente ($p<0.001$) (Figura 24 y Tabla 6.3).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

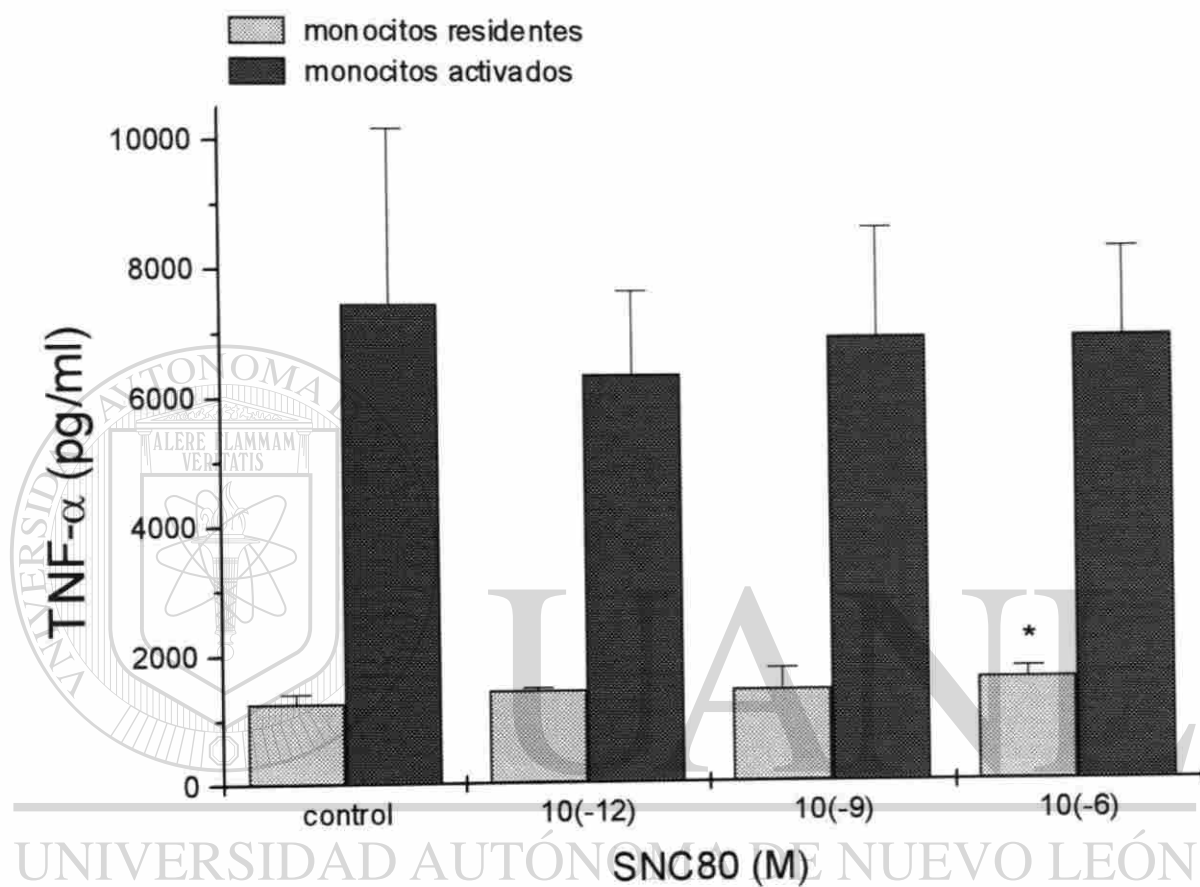
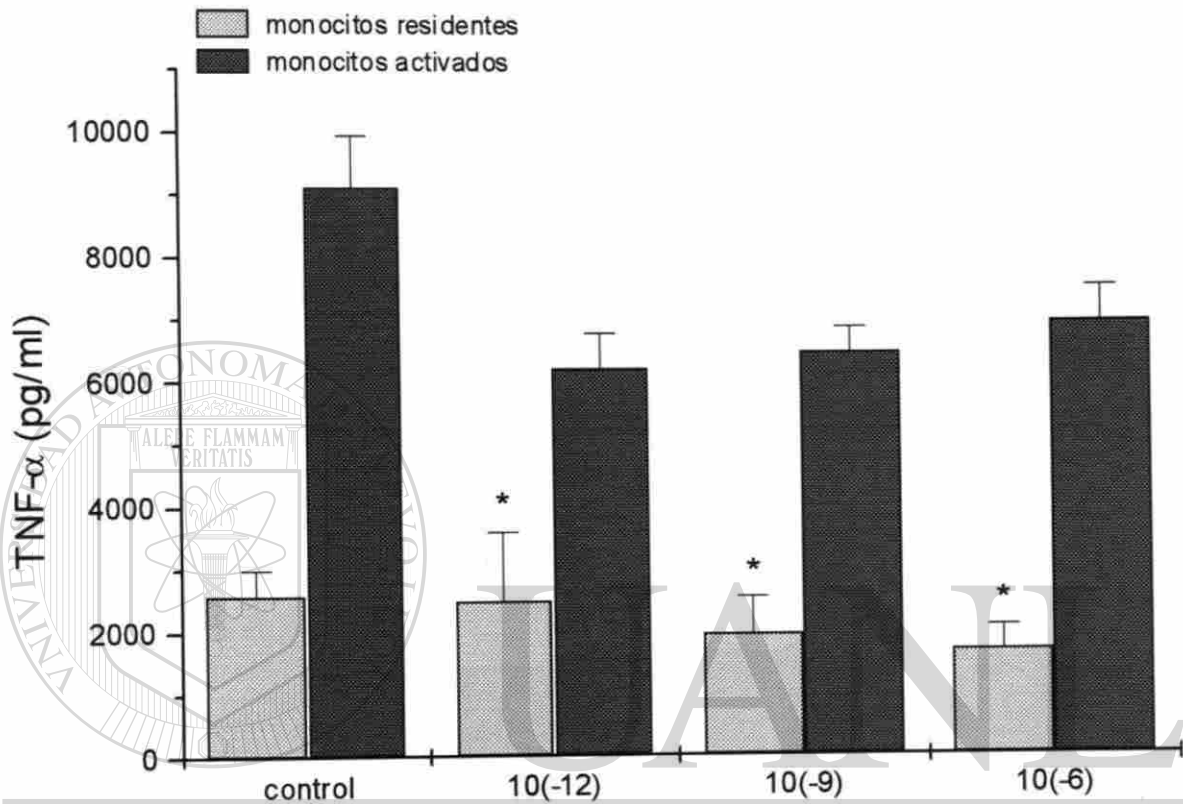


Figura 22. Efecto del SNC80 sobre la producción de TNF- α por monocitos humanos. Monocitos obtenidos a partir de sangre periférica humana se cultivaron en presencia de opioides durante 16h, después de lo cual se lavaron y se ajustaron en medio AIM-V o bien medio AIM-V con LPS (0.01 μ g/ml) a un volumen final de 200 μ l/pozo, se incubaron durante 4 horas y entonces se colectaron 150 μ l/pozo de los sobrenadantes y se almacenaron en congelación (-20°C). Los niveles de TNF- α presentes en los sobrenadantes se determinaron con una prueba ELISA comercial (Ver apéndice).

Los datos representan la media \pm el error estándar de 2 experimentos representativos con 3 replicas.

* p < 0.05 comparado con el control no tratado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN 9332 (M)

Figura 23. Efecto del 9332 sobre la producción de TNF- α por monocitos humanos. Monocitos obtenidos a partir de sangre periférica humana se cultivaron en presencia de opioides durante 16h, después de lo cual se lavaron y se ajustaron en medio AIM-V o bien medio AIM-V con LPS (0.01 μ g/ml) a un volumen final de 200 μ l/pozo, se incubaron durante 4 horas y entonces se colectaron 150 μ l/pozo de los sobrenadantes y se almacenaron en congelación (-20°C). Los niveles de TNF- α presentes en los sobrenadantes se determinaron con una prueba ELISA comercial (Ver apéndice).

Los datos representan la media \pm el error estándar de 2 experimentos representativos con 3 replicas.

* p < 0.05 comparado con el control no tratado

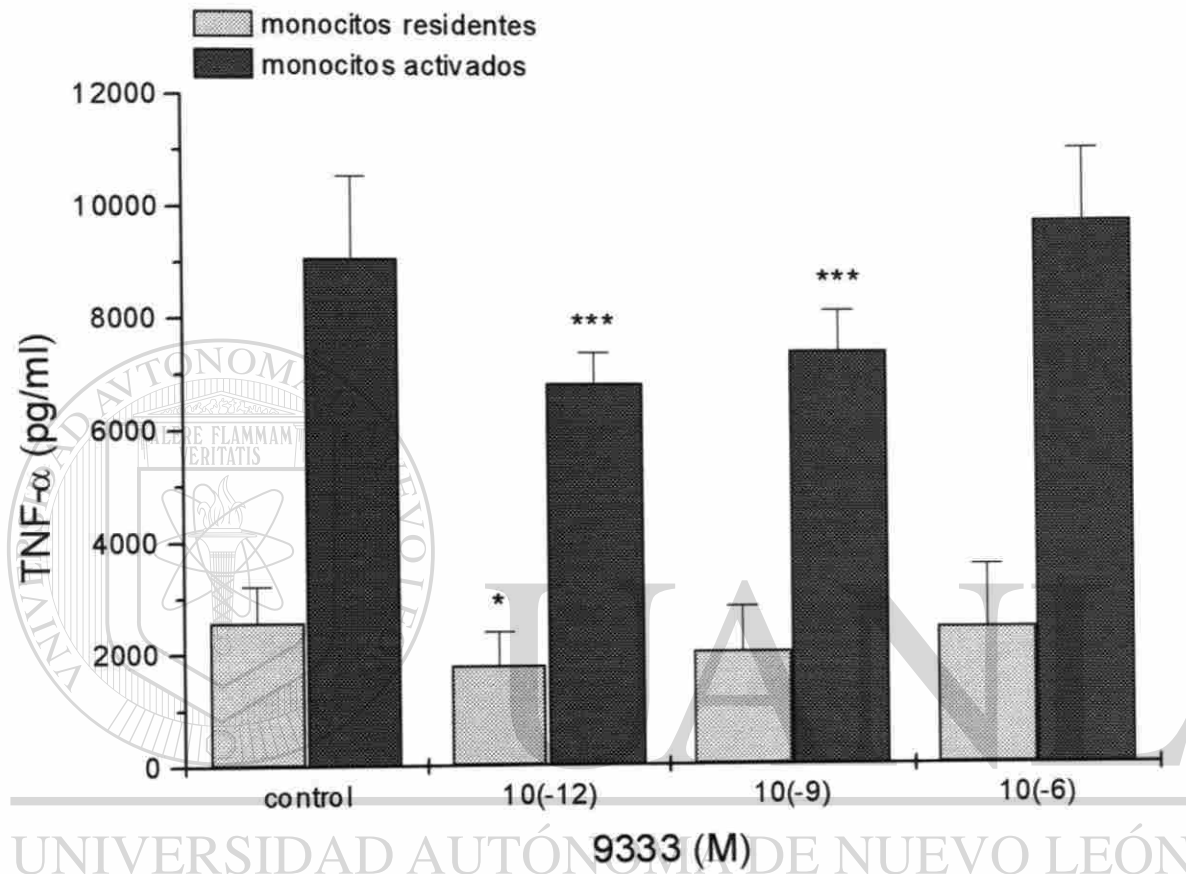


Figura 24. Efecto del 9333 sobre la producción de TNF- α por monocitos humanos. Monocitos obtenidos a partir de sangre periférica humana se cultivaron en presencia de opioides durante 16h, después de lo cual se lavaron y se ajustaron en medio AIM-V o bien medio AIM-V con LPS (0.01 μ g/ml) a un volumen final de 200 μ l/pozo, se incubaron durante 4 horas y entonces se colectaron 150 μ l/pozo de los sobrenadantes y se almacenaron en congelación (-20°C). Los niveles de TNF- α presentes en los sobrenadantes se determinaron con una prueba ELISA comercial (Ver apéndice).

Los datos representan la media \pm el error estándar de 2 experimentos representativos con 3 replicas.

* p < 0.05 comparado con el control no tratado

Tabla 6.1. Efecto del SNC80 sobre la producción de *TNF- α* por monocitos humanos ^a

Dosis (Molar)	Act. ^b	R1 ^c	R2 ^c	TNF- α ^d pg/ml	Índice de producción de TNF- α ^e
control	---	1138 \pm 36	1389 \pm 57	1264 \pm 125	
	LPS	10177 \pm 290	4763 \pm 92	7470 \pm 2706	
10 ⁻¹²	---	1389 \pm 135	1478 \pm 146	1434 \pm 44	1.142
	LPS	7646 \pm 35	5103 \pm 127	6375 \pm 1271	0.911
10 ⁻⁹	---	1150 \pm 46	1767 \pm 121	1459 \pm 308	1.141
	LPS	8641 \pm 72	5242 \pm 46	6941 \pm 1699	0.974
10 ⁻⁶	---	1478 \pm 9	1767 \pm 121	1622 \pm 144	1.285 *
	LPS	8313 \pm 191	5569 \pm 187	6941 \pm 1372	0.993

^a Ver Material y Métodos

^b Activación: LPS 10 ng/ml

^c Representa la media \pm el error estándar de un experimento representativo con 2 repeticiones para la prueba ELISA. Cada repetición de un experimento representa a su vez 3 repeticiones (sobrenadantes del cultivo de macrófagos empleados en ELISA).

^{d,e} Representa la media \pm el error estándar de dos experimentos representativos.

^e El Índice de producción de TNF- α se calculó como la relación entre la producción de TNF- α en los grupos tratados y el grupo control

* p<0.05 comparado con el control no tratado

Tabla 6.2 Efecto del 9332 sobre la producción de *TNF- α* por monocitos humanos ^a

Dosis (Molar)	Act. ^b	R1 ^c	R2 ^c	TNF- α ^d pg/ml	Índice de producción de TNF- α ^e
control	---	1956 \pm 362	3215 \pm 33	2585 \pm 629	
	LPS	10542 \pm 181	7659 \pm 119	9100 \pm 1441	
10 ⁻¹²	---	773 \pm 8	4184 \pm 1166	2479 \pm 1705	0.848 **
	LPS	7168 \pm 83	5292 \pm 209	6230 \pm 937	0.685
10 ⁻⁹	---	911 \pm 51	2988 \pm 121	1950 \pm 1038	0.697 **
	LPS	7168 \pm 11	5808 \pm 82	6488 \pm 679	0.719
10 ⁻⁶	---	999 \pm 61	2359 \pm 138	1679 \pm 679	0.622 *
	LPS	7923 \pm 59	6035 \pm 11	6979 \pm 944	0.769

^a Ver Material y Métodos

^b Activación: LPS 10 ng/ml

^c Representa la media \pm el error estándar de un experimento representativo con 2 repeticiones para la prueba ELISA. Cada repetición de un experimento representa a su vez 3 repeticiones (sobrenadantes del cultivo de macrófagos empleados en ELISA).

^{d,e} Representa la media \pm el error estándar de dos experimentos representativos.

^e El Índice de producción de TNF- α se calculó como la relación entre la producción de TNF- α en los grupos tratados y el grupo control

* p<0.05 comparado con el control no tratado

** p<0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 6.3 Efecto del 9333 sobre la producción de factor de necrosis tumoral alfa por monocitos humanos ^a

Dosis (Molar)	Act. ^b	R1 ^c	R2 ^c	TNF- α ^d pg/ml	Índice de producción de TNF- α ^e
control	---	1956 \pm 362	3215 \pm 33	2585 \pm 629	
10 ⁻¹²	LPS	10542 \pm 181	7659 \pm 119	9100 \pm 1441	
	---	1213 \pm 205	2397 \pm 42	1805 \pm 591	0.682 *
10 ⁻⁹	LPS	7382 \pm 71	6337 \pm 59	6859 \pm 522	0.763 ***
	---	1188 \pm 18	2850 \pm 109	2019 \pm 830	0.746
10 ⁻⁶	LPS	8150 \pm 107	6677 \pm 94	7413 \pm 736	0.822 ***
	---	1389 \pm 57	3580 \pm 180	2485 \pm 1095	0.911
	LPS	11045 \pm 109	8515 \pm 239	9780 \pm 1265	1.079

^a Ver Material y Métodos

^b Activación: LPS 10 ng/ml

^c Representa la media \pm el error estándar de un experimento representativo con 2 repeticiones para la prueba ELISA. Cada repetición de un experimento representa a su vez 3 repeticiones (sobrenadantes del cultivo de macrófagos empleados en ELISA).

^{d,e} Representa la media \pm el error estándar de dos experimentos representativos.

^e El Índice de producción de TNF- α se calculó como la relación entre la producción de TNF- α en los grupos tratados y el grupo control

*** p<0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 6.4 Efecto del 9336 sobre la producción de *TNF- α* por monocitos humanos ^a

Dosis (Molar)	Act. ^b	R1 ^c	R2 ^c	TNF- α ^d pg/ml	Índice de producción de TNF- α ^e
control	---	1956 \pm 362	3215 \pm 33	2585 \pm 629	
10 ⁻¹²	LPS	10542 \pm 181	7659 \pm 119	9100 \pm 1441	
	---	1528 \pm 285	2925 \pm 65	2227 \pm 698	0.845
10 ⁻⁹	LPS	9170 \pm 48	8125 \pm 107	8647 \pm 522	0.965
	---	1465 \pm 0	3177 \pm 44	2321 \pm 856	0.868
10 ⁻⁶	LPS	8439 \pm 23	7306 \pm 95	7873 \pm 566	0.877
	---	1440 \pm 19	3227 \pm 133	2334 \pm 893	0.870
	LPS	8578 \pm 83	7583 \pm 572	8081 \pm 497	0.901

^a Ver Material y Métodos

^b Activación: LPS 10 ng/ml

^c Representa la media \pm el error estándar de un experimento representativo con 2 repeticiones para la prueba ELISA. Cada repetición de un experimento representa a su vez 3 repeticiones (sobrenadantes del cultivo de macrófagos empleados en ELISA).

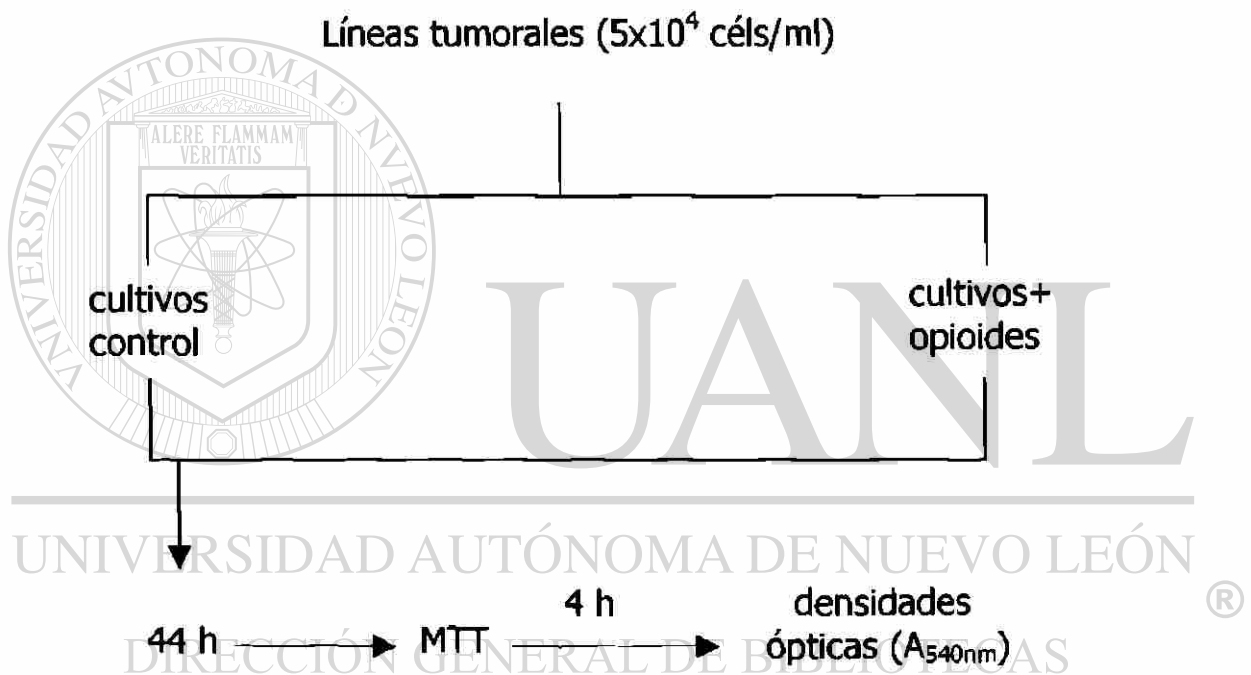
^{d,e} Representa la media \pm el error estándar de dos experimentos representativos.

^e El índice de producción de TNF- α se calculó como la relación entre la producción de TNF- α en los grupos tratados y el grupo control

6.3 Efecto directo de opioides sobre el crecimiento de líneas celulares.

Se determinó el efecto de opioides no peptídicos sobre la proliferación *in vitro* de líneas celulares tumorales, humanas y murinas, según se indica a continuación (Protocolo Experimental 7).

Protocolo Experimental 7



En este trabajo empleamos seis líneas tumorales, tres de origen humano y tres murinas; de éstas, cinco corresponden a células de estirpe inmune y una a fibroblastos. Los resultados obtenidos son variados y muestran una actividad diferencial con respecto al origen celular y a la concentración del opioide empleada.

El SNC80 presenta actividad inhibitoria del crecimiento *in vitro* de las líneas tumorales L5178Y, Jurkat, U937, J774A.1 y L929. Los porcentajes de inhibición observados con la línea L5178Y fueron de 9-14%, en el rango de 10^{-9} - 10^{-6} del SNC80 ($p < 0.001$) (Figura 25 y Tabla 7.1). En la línea Jurkat los valores de inhibición fueron menores, de 4-6% en el rango de 10^{-10} - 10^{-7} M del opioide (Figura 25b y Tabla 7.2). Para la línea U937 los porcentajes de inhibición oscilaron entre el 8-10% ($p < 0.05$), en las concentraciones 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M del opioide (Figura 25b, Tabla 7.2). Se observó una mayor actividad antitumoral del SNC80 sobre las líneas adherentes, en la línea J774A.1 los porcentajes de inhibición fueron de 16-22%, en forma proporcional a la concentración del opioide ($p < 0.001$) (Figura 25^a y Tabla 7.1), mientras que en la línea celular L929 se observó inhibición del crecimiento en todas las concentraciones probadas del opioide, la mayor inhibición se observó a la concentración de 10^{-8} M, disminuyendo en las concentraciones más altas y más bajas, con porcentajes de inhibición de 14-20% ($p < 0.01$) (Figura 26 y Tabla 7.1).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

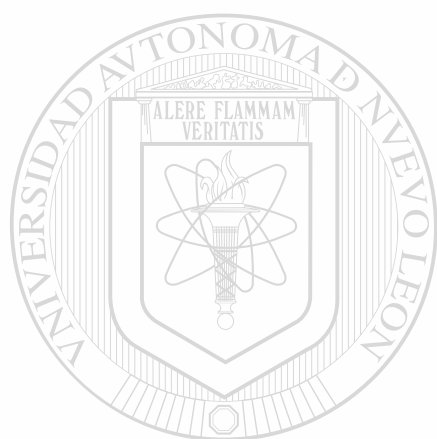
El compuesto 9332 muestra actividad antitumoral contra las líneas L5178Y, Jurkat, H9, U937, J774A.1 y L929. En el caso de la línea L5178Y muestra además actividad estimuladora del crecimiento, de acuerdo a los resultados obtenidos el tipo de actividad fue dependiente de la concentración del opioide. El efecto inhibitorio se observa en la concentración 10^{-5} M del opioide en las líneas L5178Y, Jurkat, H9, U937, J774A.1 y L929, con porcentajes de inhibición de 35, 31, 42, 30, 50 y 31% ($p < 0.01$ para todos los casos) (Figura 27 a y b, y Tablas 7.3 y 7.4). En el caso de la línea L5178Y, se

observó además que en las concentraciones por debajo de 10^{-5} M, (10^{-7} – 10^{-11} M) el 9332 estimuló la proliferación *in vitro* de esta línea en particular, con índices de crecimiento de 1.290, 1.222, 1.246 y 1.183 respectivamente ($p < 0.01$) (Figura 27a y Tabla 7.3).

De acuerdo a los resultados, el opioide 9333 tiene un efecto estimulador del crecimiento *in vitro* de las líneas tumorales L5178Y, U937, J774A.1 y L929. El efecto se observó mayormente en la línea L5178Y, ya que en todas las concentraciones probadas se observó estimulación con índices entre 1.2 y 1.3, todos los casos con alta significancia estadística ($p < 0.01$, Figura 29 y Tabla 7.5). Valores similares se observaron para la línea L929, en este caso sólo en las concentraciones 10^{-6} y 10^{-5} M del opioide (Tabla 7.5). En el caso particular de la línea U937 se encontró estimulación del crecimiento *in vitro* con un índice de 1.089 que aunque estadísticamente significativo es un valor marginal (Tabla 7.6). En la línea Jurkat se encontró inhibición del crecimiento en la concentración 10^{-5} M del opioide, el índice de crecimiento fue de 0.890 ($p < 0.0001$) (Tabla 7.5).

El 9334 sólo presenta acción sobre las líneas Jurkat y L929, y sus efectos son opuestos, mientras que inhibe el crecimiento de la línea Jurkat, estimula el de la línea L929. En el caso de la línea Jurkat se observan porcentajes de inhibición mínimos con valores que van del 6 al 8% ($p < 0.01$) en el rango de concentraciones 10^{-6} – 10^{-11} M (Figura 30 y Tabla 7.8). Para la línea L929 se encontraron índices de crecimiento entre 1.164 y 1.222 ($p < 0.05$) en el rango de concentraciones 10^{-11} – 10^{-5} M del opioide (Figura 30 y Tabla 7.7).

Por su parte, en el caso del 9336 solo se detecto actividad sobre las líneas L5178Y y L929, en ambas se observa estimulación del crecimiento en un amplio rango de concentraciones del opioide (Figura 31 y Tabla 7.9). Para la línea L5178Y se observan índices de crecimiento de 1.17 a 1.24 ($p < 0.05$), mientras que para la línea L929 los índices observados son de 1.094, 1103, 1149 y 1.321, correspondientes a las concentraciones 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-6} y 10^{-5} M respectivamente ($p < 0.01$).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

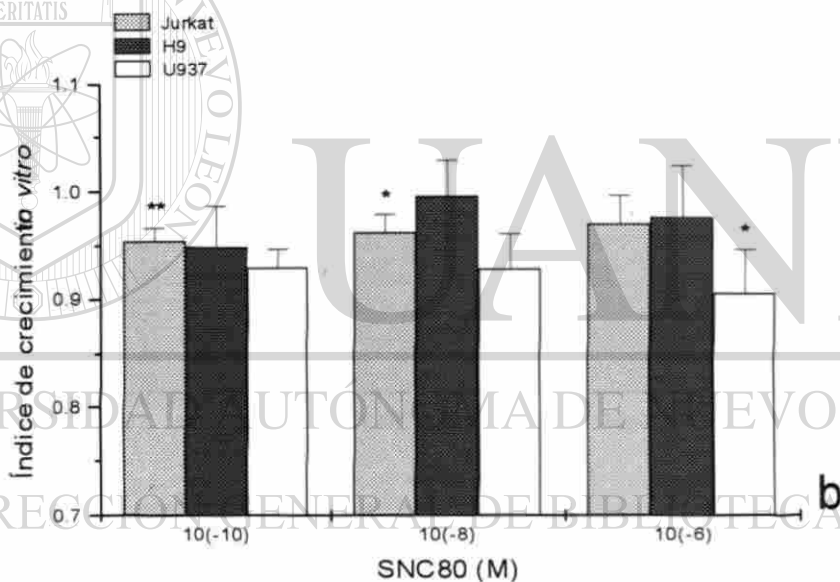
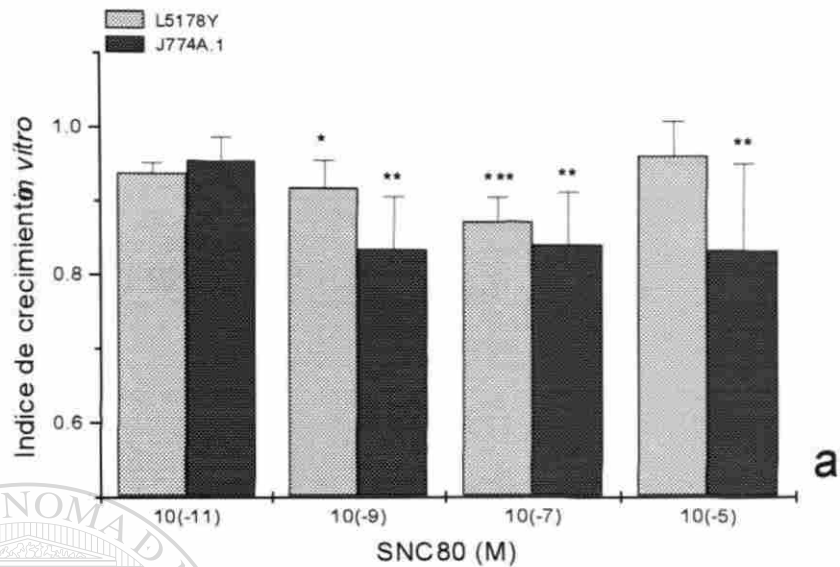


Figura 25. Efecto del SNC80 sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares (a) murinas y (b) humanas. Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI suplementado con SFB. Se añadieron 100 μ l/pozo de SNC80 en concentraciones que van de 10^{-5} M a 10^{-11} M. Se incubaron 44 horas a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación del crecimiento *in vitro* se añadieron 20 μ l/pozo de MTT (5 mg/ml) a cada placa, y se incubaron 4 horas adicionales. Se agregaron 100 μ l/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (aproximadamente 16 horas) a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas.

Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

* $p < 0.05$ comparado con el control no tratado

** $p < 0.01$ comparado con el control no tratado

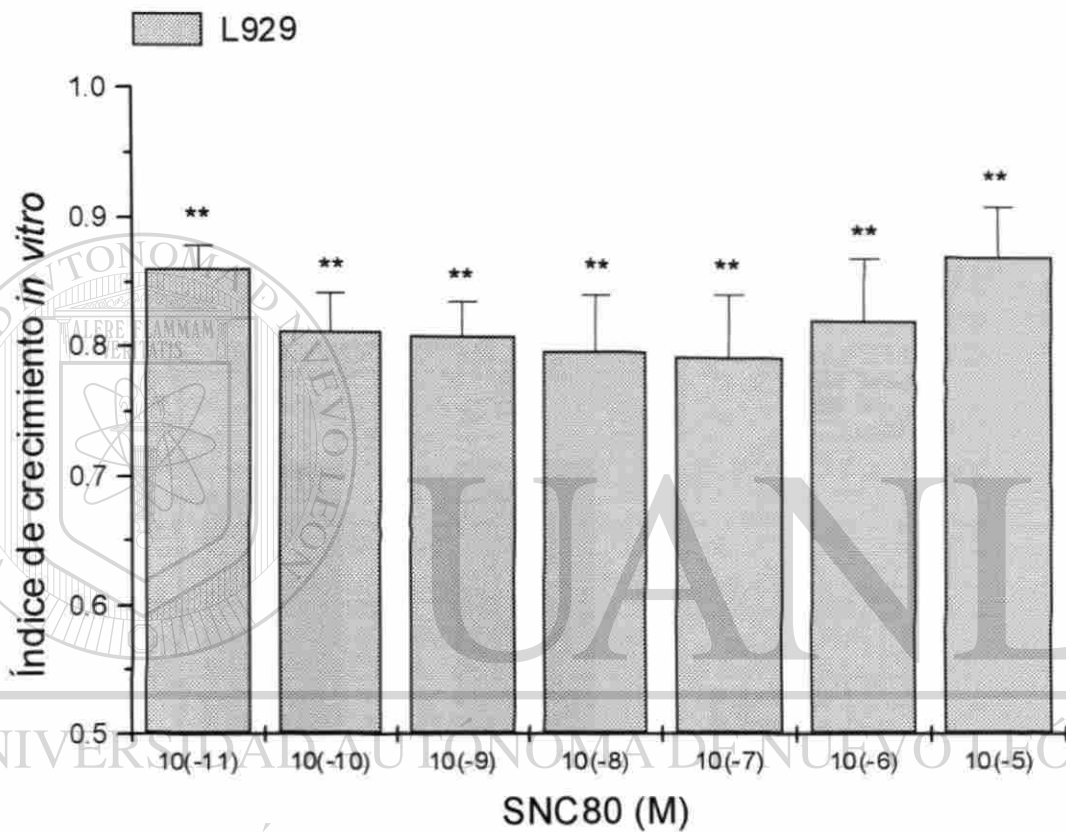


Figura 26. Efecto del SNC80 sobre el crecimiento *in vitro* de la línea celular L929.

Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI suplementado con SFB. Se añadieron 100 μ l/pozo de SNC80 en concentraciones que van de 10^{-5} M a 10^{-11} M. Se incubaron 44 horas a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación del crecimiento *in vitro* se añadieron 20 μ l/pozo de MTT (5 mg/ml) a cada placa, y se incubaron 4 horas adicionales. Se agregaron 100 μ l/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (aproximadamente 16 horas) a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas.

Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

* $p < 0.05$ comparado con el control no tratado

** $p < 0.01$ comparado con el control no tratado

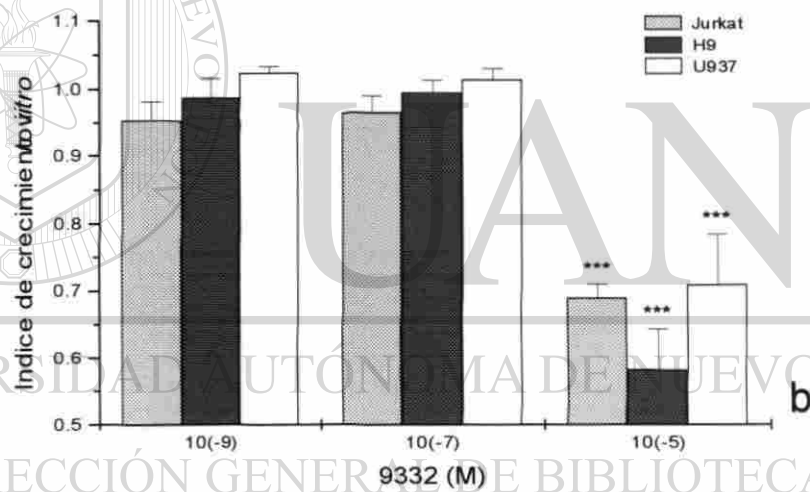
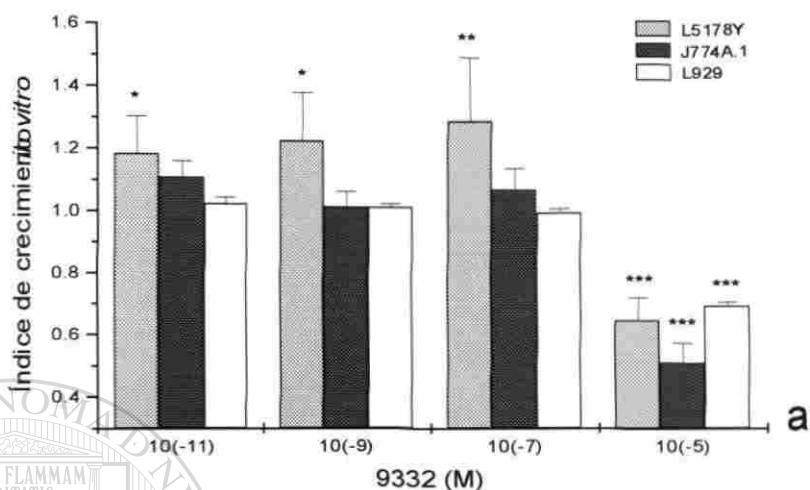


Figura 27. Efecto del 9332 sobre el crecimiento in vitro de líneas celulares (a) murinas y (b) humanas.

Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI suplementado con SFB. Se añadieron 100 μ l/pozo de 9332 en concentraciones que van de 10^{-5} M a 10^{-11} M. Se incubaron 44 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Para la determinación del crecimiento *in vitro* se añadieron 20 μ l/pozo de MTT (5 mg/ml) a cada placa, y se incubaron 4 horas adicionales. Se agregaron 100 μ l/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (aproximadamente 16 horas) a 37°C y 5% de CO_2 . Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas.

Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

* $p < 0.05$ comparado con el control no tratado

** $p < 0.01$ comparado con el control no tratado

*** $p < 0.001$ comparado con el control no tratado

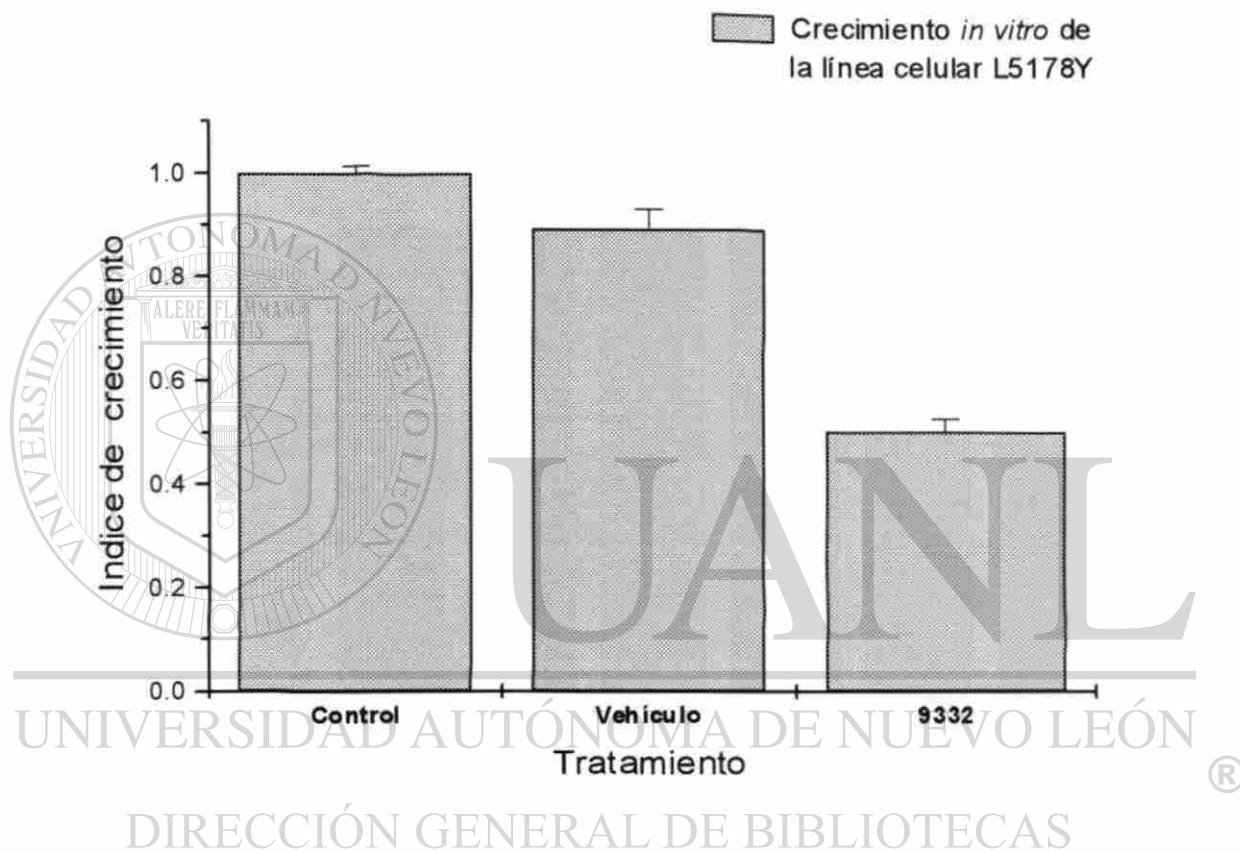
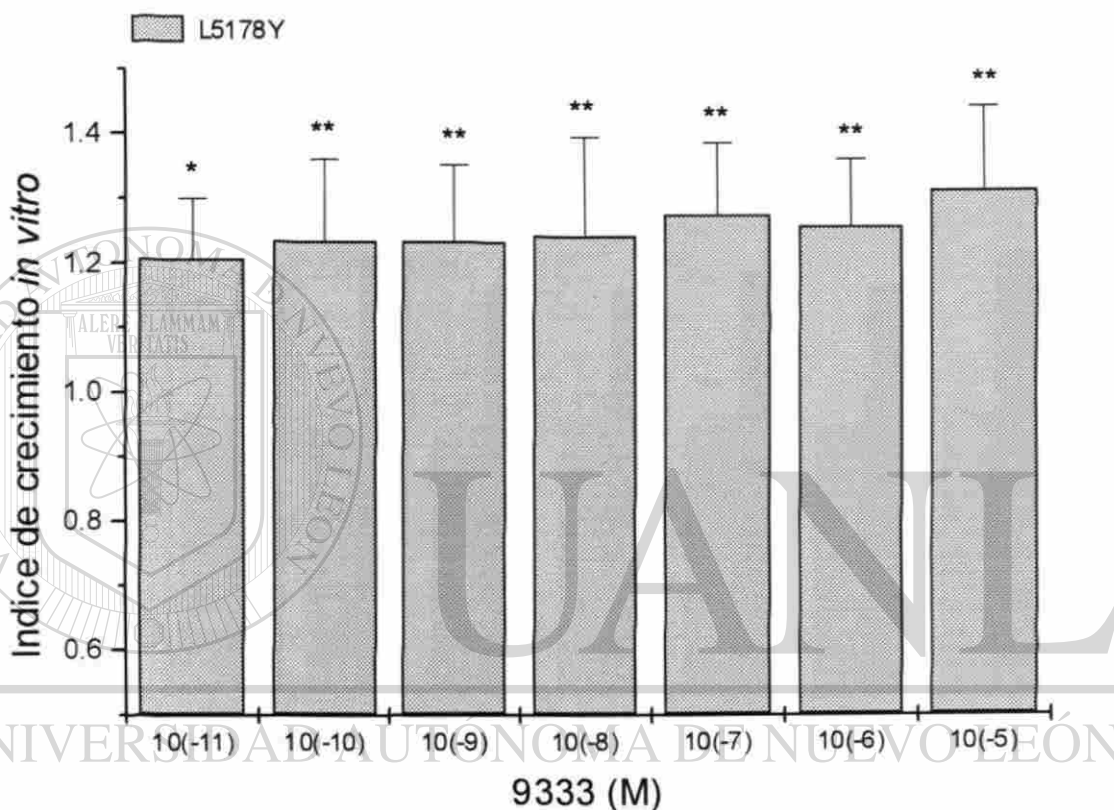


Figura 28. Efecto del 9332 y su vehículo sobre el crecimiento *in vitro* de la línea celular L5178Y. Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI suplementado con SFB. Se añadieron 100 μ l/pozo de cada tratamiento (control, vehículo y 9332 a una concentración de 10^{-5} M. Se incubaron 44 horas a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación del crecimiento *in vitro* se añadieron 20 μ l/pozo de MTT (5 mg/ml) a cada placa, y se incubaron 4 horas adicionales. Se agregaron 100 μ l/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (aproximadamente 16 horas) a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 1 experimento representativos con 3 replicas.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

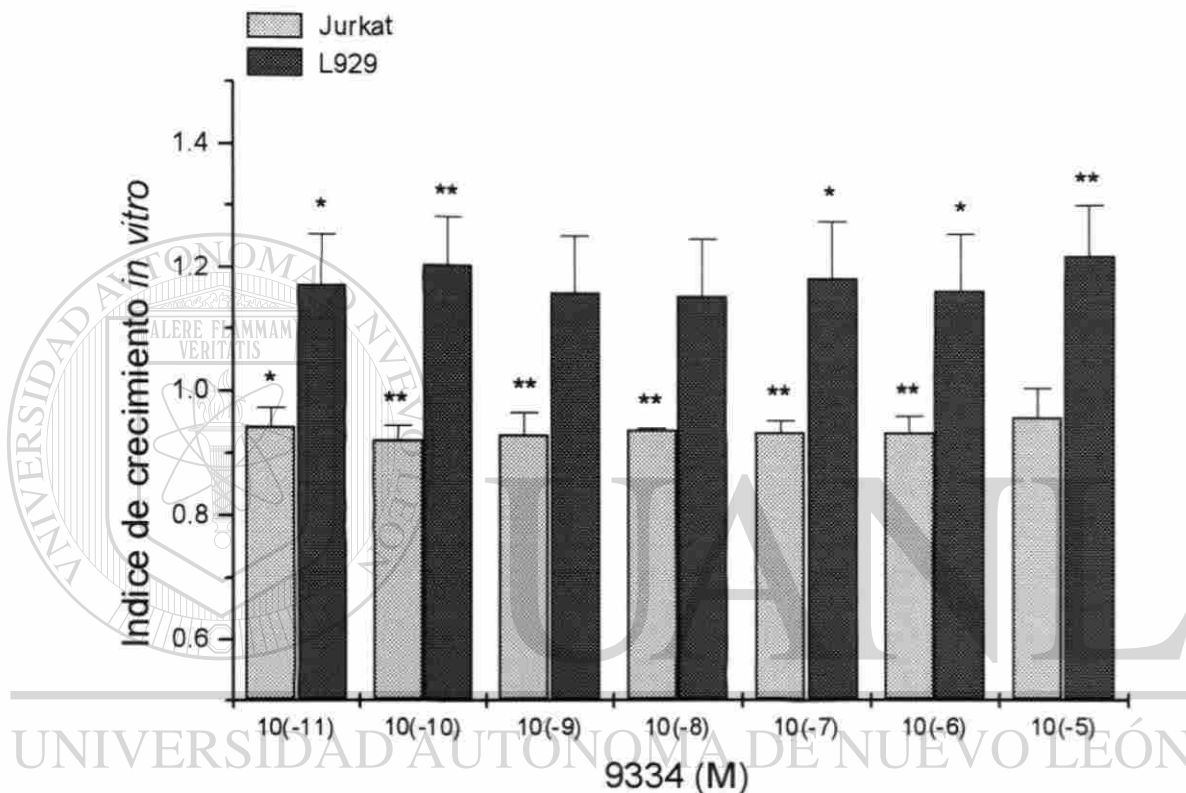
Figura 29. Efecto del 9333 sobre el crecimiento *in vitro* de la línea celular L5178Y.

Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI suplementado con SFB. Se añadieron 100 μ l/pozo de 9333 en concentraciones que van de 10^{-5} M a 10^{-11} M. Se incubaron 44 horas a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación del crecimiento *in vitro* se añadieron 20 μ l/pozo de MTT (5 mg/ml) a cada placa, y se incubaron 4 horas adicionales. Se agregaron 100 μ l/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (aproximadamente 16 horas) a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas.

Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

* p < 0.05 comparado con el control no tratado

** p < 0.01 comparado con el control no tratado



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 30. Efecto del 9334 sobre el crecimiento *in vitro* de las líneas celulares Jurkat y L929. Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI suplementado con SFB. Se añadieron 100 μ l/pozo de 9334 en concentraciones que van de 10^{-5} M a 10^{-11} M. Se incubaron 44 horas a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación del crecimiento *in vitro* se añadieron 20 μ l/pozo de MTT (5 mg/ml) a cada placa, y se incubaron 4 horas adicionales. Se agregaron 100 μ l/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (aproximadamente 16 horas) a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas.

Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

* p < 0.05 comparado con el control no tratado

** p < 0.01 comparado con el control no tratado

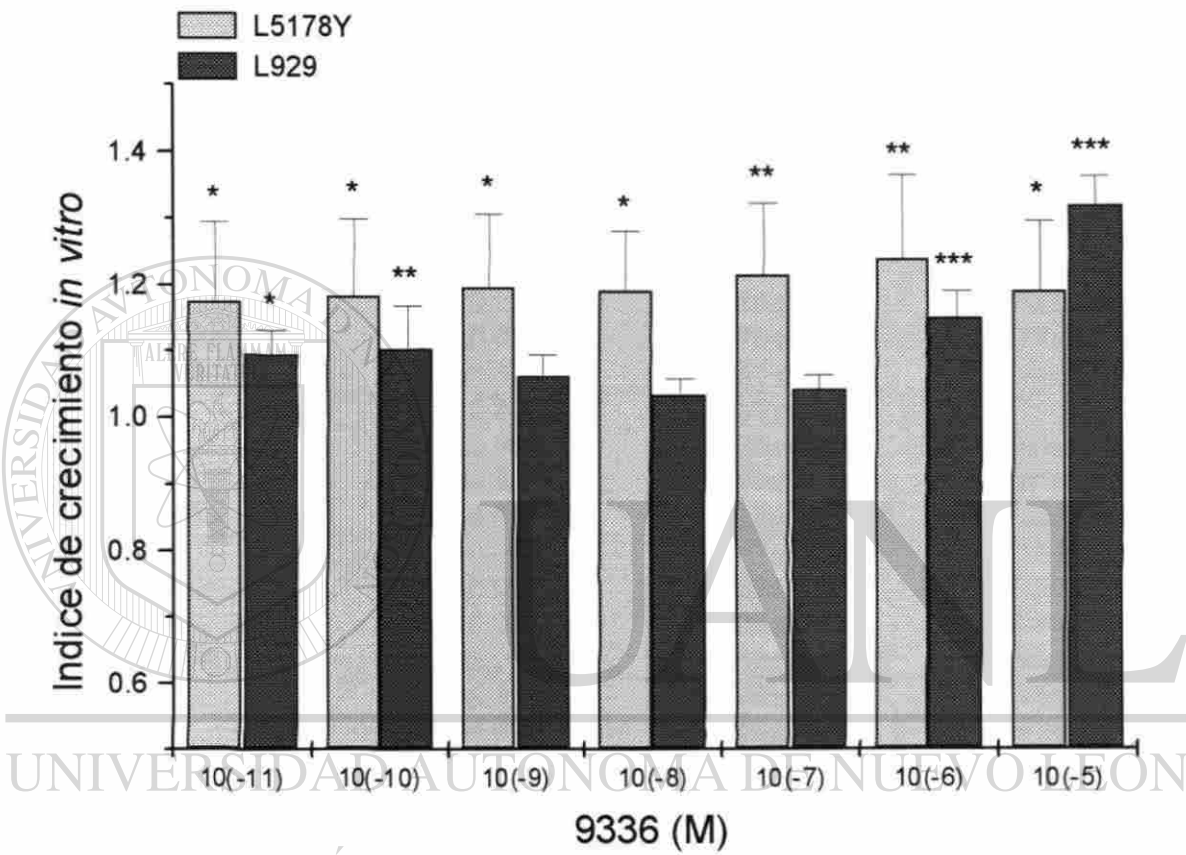


Figura 31. Efecto del 9336 sobre el crecimiento *in vitro* de las líneas celulares L5178Y y L929. Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI suplementado con SFB. Se añadieron 100 μ l/pozo de 9336 en concentraciones que van de 10^{-5} M a 10^{-11} M. Se incubaron 44 horas a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación del crecimiento *in vitro* se añadieron 20 μ l/pozo de MTT (5 mg/ml) a cada placa, y se incubaron 4 horas adicionales. Se agregaron 100 μ l/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (aproximadamente 16 horas) a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

* p < 0.05 comparado con el control no tratado
 ** p < 0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 7.1 Efecto del opioide SNC80 sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares linfoides, mieloides y fibroblastoides de origen murino

Dosis (Molar)	Repetición	Índice de crecimiento ^a		
		L5178Y	J774A.1	L929
control ^b	R1	0.406±0.006	0.386±0.012	0.270±0.022
	R2	0.386±0.010	1.023±0.020	0.461±0.010
	R3	0.413±0.004	1.064±0.004	0.782±0.025
10 ⁻¹¹	R1	0.944±0.019	1.017±0.023	0.833±0.080
	R2	0.957±0.008	0.933±0.010	0.893±0.023
	R3	0.914±0.021	0.917±0.003	0.855±0.028
	media	0.938±0.012	0.956±0.031	0.860±0.017 **
10 ⁻¹⁰	R1	0.918±0.030	0.964±0.010	0.783±0.084
	R2	0.961±0.021	0.910±0.013	0.872±0.043
	R3	0.905±0.019	0.770±0.022	0.777±0.019
	media	0.928±0.016	0.881±0.057	0.811±0.030 ***
10 ⁻⁹	R1	0.875±0.005	0.959±0.019	0.771±0.071
	R2	0.992±0.035	0.835±0.009	0.858±0.022
	R3	0.886±0.024	0.705±0.013	0.796±0.022
	media	0.918±0.037 *	0.833±0.073 **	0.808±0.025 ***
10 ⁻⁸	R1	0.891±0.016	0.987±0.022	0.717±0.083
	R2	0.975±0.047	0.832±0.009	0.872±0.031
	R3	0.853±0.022	0.708±0.016	0.797±0.025
	media	0.906±0.036 *	0.842±0.080 **	0.795±0.044 ***
10 ⁻⁷	R1	0.878±0.009	0.978±0.021	0.698±0.084
	R2	0.926±0.071	0.814±0.013	0.861±0.037
	R3	0.816±0.024	0.726±0.004	0.816±0.010
	media	0.873±0.032 ***	0.839±0.073 **	0.792±0.048 ***
10 ⁻⁶	R1	0.874±0.011	0.917±0.019	0.729±0.085
	R2	0.895±0.030	0.743±0.021	0.888±0.018
	R3	0.804±0.010	0.677±0.021	0.846±0.025
	media	0.858±0.027 ***	0.779±0.071 ***	0.820±0.047 ***
10 ⁻⁵	R1	0.935±0.022	1.056±0.025	0.832±0.102
	R2	1.055±0.075	0.644±0.020	0.946±0.014
	R3	0.902±0.017	0.797±0.006	0.834±0.013
	media	0.964±0.046	0.832±0.120 **	0.871±0.037 ***

^a El Índice de crecimiento expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento por lo tanto = 1

^b Debido a lo anterior, para el grupo control se presentan los rangos de los valores de absorbancia a 540nm, que representan la proliferación basal de los cultivos.

* p<0.05 comparado con el control no tratado

** p<0.01 comparado con el control no tratado

*** p<0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 7.2 Efecto del opioide SNC80 sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares linfoides y mieloides de origen humano

		Índice de crecimiento ^a		
Dosis (Molar)	Repetición	Jurkat	H9	U937
control ^b	R1	0.100±0.001	0.104±0.002	0.177±0.001
	R2	0.204±0.000	0.286±0.004	0.435±0.001
	R3	0.262±0.002	0.207±0.003	0.578±0.006
10 ⁻¹¹	R1	0.965±0.017	0.959±0.026	0.980±0.011
	R2	0.995±0.012	0.984±0.011	0.978±0.018
	R3	0.973±0.015	1.021±0.013	0.897±0.033
	media	0.977±0.008	0.988±0.018	0.952±0.027
10 ⁻¹⁰	R1	0.930±0.020	0.879±0.048	0.990±0.027
	R2	0.969±0.007	0.951±0.013	0.964±0.030
	R3	0.962±0.011	1.013±0.014	0.913±0.019
	media	0.954±0.012 **	0.948±0.038	0.925±0.017
10 ⁻⁹	R1	0.937±0.015	0.949±0.021	0.926±0.031
	R2	0.984±0.008	0.991±0.007	0.990±0.027
	R3	0.928±0.023	1.068±0.046	0.865±0.009
	media	0.950±0.017 **	1.003±0.034	0.927±0.035
10 ⁻⁸	R1	0.932±0.017	0.930±0.045	0.889±0.042
	R2	0.993±0.008	1.021±0.019	0.992±0.022
	R3	0.956±0.012	1.033±0.023	0.902±0.019
	media	0.960±0.017 **	0.995±0.032	0.928±0.032
10 ⁻⁷	R1	0.873±0.029	0.896±0.034	0.906±0.049
	R2	0.982±0.008	0.995±0.015	0.956±0.026
	R3	0.972±0.020	1.062±0.009	0.895±0.030
	media	0.942±0.034 ***	0.985±0.048	0.919±0.018 *
10 ⁻⁶	R1	0.920±0.008	0.882±0.030	0.823±0.041
	R2	1.006±0.007	1.009±0.022	0.962±0.031
	R3	0.984±0.011	1.036±0.004	0.926±0.016
	media	0.970±0.025	0.976±0.047	0.904±0.041 **
10 ⁻⁵	R1	0.942±0.007	0.879±0.030	0.860±0.056
	R2	0.975±0.009	0.990±0.022	0.950±0.030
	R3	1.013±0.011	1.060±0.017	0.967±0.038
	media	0.977±0.020	0.976±0.052	0.926±0.033 *

^a El Índice de crecimiento expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento por lo tanto = 1

^b Debido a lo anterior, para el grupo control se presentan los rangos de los valores de absorbancia a 540nm, que representan la proliferación basal de los cultivos.

* p<0.05 comparado con el control no tratado

** p<0.01 comparado con el control no tratado

*** p<0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 7.3 Efecto del opioide 9332 sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares linfoides, mieloides y fibroblastoides de origen murino

Dosis (Molar)	Repetición	Índice de crecimiento ^a		
		L5178Y	J774A.1	L929
control ^b	R1	0.324±0.002	0.596±0.013	0.395±0.010
	R2	0.325±0.011	0.561±0.044	0.311±0.026
	R3	0.232±0.003	0.204±0.003	0.252±0.002
10 ⁻¹¹	R1	1.050±0.011	1.023±0.046	0.988±0.037
	R2	1.079±0.030	1.102±0.049	1.023±0.013
	R3	1.420±0.028	1.201±0.020	1.060±0.018
	media	1.183±0.118 *	1.108±0.051	1.024±0.020
10 ⁻¹⁰	R1	1.048±0.016	0.984±0.045	0.989±0.021
	R2	1.099±0.055	1.072±0.031	1.018±0.014
	R3	1.592±0.041	1.146±0.031	1.049±0.009
	media	1.246±0.173 *	1.067±0.046	1.019±0.017
10 ⁻⁹	R1	1.025±0.012	0.947±0.031	0.987±0.027
	R2	1.109±0.026	0.977±0.044	1.016±0.017
	R3	1.532±0.041	1.114±0.037	1.030±0.020
	media	1.222±0.156 *	1.013±0.051	1.011±0.012
10 ⁻⁸	R1	1.015±0.020	1.002±0.035	0.969±0.027
	R2	1.059±0.035	1.060±0.016	1.001±0.013
	R3	1.535±0.061	1.202±0.014	1.008±0.014
	media	1.203±0.166	1.088±0.059	0.993±0.012
10 ⁻⁷	R1	1.057±0.009	0.969±0.044	0.982±0.036
	R2	1.112±0.023	1.053±0.027	1.021±0.007
	R3	1.701±0.037	1.198±0.021	0.991±0.008
	media	1.290±0.205 **	1.073±0.066	0.998±0.011
10 ⁻⁶	R1	1.078±0.016	1.040±0.030	1.108±0.029
	R2	1.156±0.053	0.962±0.005	1.050±0.013
	R3	1.613±0.057	1.179±0.023	0.992±0.023
	media	1.282±0.166	1.060±0.063	1.050±0.033 **
10 ⁻⁵	R1	0.604±0.002	0.462±0.006	0.681±0.006
	R2	0.550±0.026	0.426±0.012	0.720±0.012
	R3	0.790±0.010	0.636±0.036	0.677±0.012
	media	0.648±0.072 ***	0.508±0.064 ***	0.693±0.013 ***

^a El Índice de crecimiento expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento por lo tanto = 1

^b Debido a lo anterior, para el grupo control se presentan los rangos de los valores de absorbancia a 540nm, que representan la proliferación basal de los cultivos.

* p<0.05 comparado con el control no tratado

** p<0.01 comparado con el control no tratado

*** p<0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 7.4 Efecto del opioide 9332 sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares linfoides y mieloides de origen humano

Dosis (Molar)	Repetición	Índice de crecimiento ^a		
		Jurkat	H9	U937
control ^b	R1	0.466±0.006	0.643±0.009	0.411±0.006
	R2	0.326±0.003	0.356±0.011	0.460±0.012
	R3	0.375±0.003	0.404±0.007	0.376±0.006
10 ⁻¹¹	R1	0.951±0.013	1.122±0.032	1.055±0.017
	R2	0.987±0.015	1.021±0.022	0.984±0.012
	R3	0.968±0.003	0.995±0.010	1.008±0.015
	media	0.969±0.010	1.046±0.038	1.016±0.020
10 ⁻¹⁰	R1	0.943±0.002	0.979±0.026	1.055±0.017
	R2	0.982±0.011	1.016±0.019	1.056±0.017
	R3	0.968±0.011	0.966±0.010	1.045±0.017
	media	0.964±0.011	0.987±0.015	1.052±0.003
10 ⁻⁹	R1	0.932±0.026	0.977±0.013	1.035±0.006
	R2	1.007±0.020	1.039±0.015	1.005±0.005
	R3	0.922±0.015	0.941±0.010	1.029±0.016
	media	0.954±0.026	0.985±0.028	1.023±0.008
10 ⁻⁸	R1	0.907±0.028	0.989±0.008	1.006±0.010
	R2	0.966±0.011	0.988±0.027	1.059±0.011
	R3	1.046±0.017	0.970±0.006	1.039±0.022
	media	0.973±0.040 *	0.982±0.005	1.034±0.015
10 ⁻⁷	R1	0.922±0.026	1.010±0.015	1.041±0.010
	R2	1.006±0.019	1.015±0.026	0.987±0.009
	R3	0.964±0.012	0.958±0.008	1.013±0.013
	media	0.964±0.024	0.994±0.018	1.014±0.015
10 ⁻⁶	R1	0.944±0.039	1.087±0.008	1.060±0.005
	R2	1.025±0.023	1.087±0.025	0.982±0.008
	R3	0.991±0.014	0.975±0.008	0.998±0.015
	media	0.986±0.023	1.050±0.037	1.013±0.024
10 ⁻⁵	R1	0.649±0.027	0.461±0.007	0.761±0.003
	R2	0.715±0.024	0.647±0.015	0.559±0.009
	R3	0.702±0.024	0.637±0.001	0.803±0.010
	media	0.689±0.020 ***	0.582±0.060 ***	0.708±0.075 ***

^a El Índice de crecimiento expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento por lo tanto = 1

^b Debido a lo anterior, para el grupo control se presentan los rangos de los valores de absorbancia a 540nm, que representan la proliferación basal de los cultivos.

* p<0.05 comparado con el control no tratado

** p<0.01 comparado con el control no tratado

*** p<0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 7.5 Efecto del opioide 9333 sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares linfoides, mieloides y fibroblastoides de origen murino

Dosis (Molar)	Repetición	Índice de crecimiento ^a		
		L5178Y	J774A.1	L929
control ^b	R1	0.312±0.008	0.573±0.007	0.386±0.019
	R2	0.247±0.003	0.499±0.016	0.293±0.028
	R3	0.277±0.003	0.208±0.003	0.241±0.005
10 ⁻¹¹	R1	1.027±0.029	1.350±0.003	0.968±0.034
	R2	1.346±0.028	1.217±0.029	1.380±0.134
	R3	1.242±0.026	0.939±0.011	1.120±0.054
	media	1.205±0.093 *	1.168±0.121 ***	1.156±0.120
10 ⁻¹⁰	R1	1.007±0.045	1.248±0.026	0.974±0.020
	R2	1.428±0.063	1.184±0.031	1.381±0.134
	R3	1.272±0.033	0.942±0.009	1.113±0.054
	media	1.235±0.122 **	1.125±0.093	1.156±0.119
10 ⁻⁹	R1	1.010±0.010	1.237±0.015	0.960±0.057
	R2	1.408±0.024	1.161±0.022	1.369±0.078
	R3	1.286±0.036	0.972±0.015	1.030±0.086
	media	1.235±0.117 *	1.123±0.078	1.120±0.126
10 ⁻⁸	R1	0.954±0.019	1.303±0.018	0.905±0.043
	R2	1.456±0.038	1.149±0.031	1.255±0.081
	R3	1.325±0.036	0.933±0.014	1.053±0.038
	media	1.245±0.150 **	1.128±0.107 *	1.071±0.101
10 ⁻⁷	R1	1.053±0.010	1.252±0.023	0.947±0.047
	R2	1.424±0.060	1.145±0.040	1.344±0.081
	R3	1.346±0.028	0.954±0.008	1.078±0.032
	media	1.274±0.112 **	1.117±0.087	1.123±0.116
10 ⁻⁶	R1	1.056±0.016	1.140±0.008	0.999±0.028
	R2	1.405±0.019	1.193±0.011	1.582±0.071
	R3	1.311±0.009	0.960±0.010	1.207±0.017
	media	1.257±0.104 **	1.098±0.070	1.263±0.170 *
10 ⁻⁵	R1	1.062±0.020	1.195±0.017	1.108±0.029
	R2	1.478±0.042	1.197±0.021	1.707±0.051
	R3	1.411±0.017	1.077±0.027	1.263±0.011
	media	1.317±0.129 ***	1.156±0.039 **	1.359±0.179 **

^a El Índice de crecimiento expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento por lo tanto = 1

^b Debido a lo anterior, para el grupo control se presentan los rangos de los valores de absorbancia a 540nm, que representan la proliferación basal de los cultivos.

* p<0.05 comparado con el control no tratado

** p<0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 7.6 Efecto del opioide 9333 sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares linfoides y mieloides de origen humano

Dosis (Molar)	Repetición	Índice de crecimiento ^a		
		Jurkat	H9	U937
control ^b	R1	0.457±0.005	0.598±0.012	0.417±0.007
	R2	0.340±0.011	0.340±0.009	0.458±0.009
	R3	0.358±0.007	0.377±0.003	0.361±0.003
10 ⁻¹¹	R1	0.963±0.009	0.961±0.020	1.139±0.034
	R2	0.939±0.019	0.995±0.016	1.002±0.039
	R3	0.969±0.010	0.989±0.022	1.055±0.016
	media	0.957±0.009	0.982±0.010	1.065±0.039
10 ⁻¹⁰	R1	0.978±0.004	0.964±0.016	1.101±0.051
	R2	0.936±0.013	1.002±0.028	1.046±0.054
	R3	0.937±0.009	0.949±0.023	1.017±0.007
	media	0.950±0.013	0.972±0.015	1.055±0.024
10 ⁻⁹	R1	0.991±0.009	1.000±0.026	1.076±0.037
	R2	0.950±0.026	1.035±0.021	1.008±0.027
	R3	0.924±0.018	0.938±0.012	1.039±0.003
	media	0.955±0.019	0.991±0.028	1.041±0.019
10 ⁻⁸	R1	0.963±0.013	0.921±0.029	1.087±0.051
	R2	0.952±0.033	1.020±0.027	1.037±0.024
	R3	0.944±0.018	0.968±0.032	1.035±0.007
	media	0.953±0.005	0.970±0.028	1.053±0.017
10 ⁻⁷	R1	0.979±0.014	0.993±0.010	1.076±0.022
	R2	0.963±0.011	1.037±0.005	1.059±0.035
	R3	0.957±0.009	0.971±0.015	1.003±0.006
	media	0.966±0.006	1.000±0.019	1.046±0.022
10 ⁻⁶	R1	1.004±0.008	0.981±0.010	1.114±0.044
	R2	0.943±0.012	1.054±0.009	1.053±0.052
	R3	0.939±0.009	0.970±0.016	1.024±0.006
	media	0.962±0.021	1.002±0.026	1.064±0.026
10 ⁻⁵	R1	1.030±0.013	1.095±0.020	1.134±0.032
	R2	0.820±0.025	0.888±0.062	1.071±0.035
	R3	0.820±0.072	0.874±0.020	1.061±0.012
	media	0.890±0.070**	0.952±0.071	1.089±0.022**

^a El Índice de crecimiento expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento por lo tanto=1

^b Debido a lo anterior, para el grupo control se presentan los rangos de los valores de absorbancia a 540nm, que representan la proliferación basal de los cultivos.

** p<0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 7.7 Efecto del opioide 9334 sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares linfoides, mieloides y fibroblastoides de origen murino

Dosis (Molar)	Repetición	Índice de crecimiento ^a		
		L5178Y	J774A.1	L929
control ^b	R1	0.313±0.006	0.632±0.008	0.349±0.011
	R2	0.336±0.009	0.521±0.009	0.227±0.002
	R3	0.249±0.005	0.203±0.001	0.304±0.005
10 ⁻¹¹	R1	1.047±0.014	0.932±0.064	1.328±0.026
	R2	1.052±0.040	1.296±0.092	1.136±0.036
	R3	1.412±0.054	1.185±0.012	1.055±0.017
	media	1.170±0.120	1.138±0.107	1.173±0.080 *
10 ⁻¹⁰	R1	1.053±0.011	1.001±0.031	1.337±0.040
	R2	1.059±0.027	1.198±0.066	1.210±0.093
	R3	1.503±0.046	1.111±0.027	1.065±0.010
	media	1.205±0.149	1.104±0.056	1.204±0.078 **
10 ⁻⁹	R1	1.041±0.012	1.002±0.041	1.346±0.046
	R2	1.090±0.027	1.252±0.057	1.061±0.039
	R3	1.507±0.042	1.129±0.025	1.070±0.022
	media	1.213±0.147	1.128±0.072	1.159±0.093
10 ⁻⁸	R1	1.024±0.020	1.054±0.037	1.338±0.013
	R2	1.069±0.029	1.187±0.054	1.094±0.036
	R3	1.486±0.054	1.150±0.017	1.032±0.010
	media	1.193±0.146	1.130±0.039	1.155±0.093
10 ⁻⁷	R1	1.033±0.025	0.962±0.029	1.361±0.060
	R2	1.023±0.031	1.249±0.009	1.139±0.027
	R3	1.474±0.043	1.185±0.016	1.051±0.013
	media	1.177±0.148	1.132±0.086	1.184±0.092 *
10 ⁻⁶	R1	1.065±0.018	1.054±0.023	1.345±0.021
	R2	1.074±0.041	1.141±0.022	1.109±0.026
	R3	1.478±0.061	1.124±0.007	1.039±0.019
	media	1.206±0.136	1.106±0.026	1.164±0.092 *
10 ⁻⁵	R1	1.054±0.033	1.063±0.018	1.368±0.016
	R2	1.096±0.053	1.166±0.025	1.212±0.014
	R3	1.408±0.060	1.193±0.017	1.086±0.028
	media	1.186±0.111	1.141±0.039	1.222±0.081 **

^a El Índice de crecimiento expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento por lo tanto = 1

^b Debido a lo anterior, para el grupo control se presentan los rangos de los valores de absorbancia a 540nm, que representan la proliferación basal de los cultivos.

* p<0.05 comparado con el control no tratado

** p<0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 7.8 Efecto del opioide 9334 sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares linfoides y mieloides de origen humano

Dosis (Molar)	Repetición	Índice de crecimiento ^a		
		Jurkat	H9	U937
control ^b	R1	0.491±0.002	0.620±0.026	0.412±0.004
	R2	0.369±0.004	0.364±0.012	0.465±0.007
	R3	0.360±0.003	0.378±0.007	0.37±0.006
10 ⁻¹¹	R1	0.922±0.005	1.057±0.049	1.063±0.020
	R2	0.908±0.009	0.934±0.013	1.009±0.023
	R3	1.000±0.016	0.954±0.016	1.042±0.011
	media	0.943±0.028 *	0.981±0.038	1.038±0.015
10 ⁻¹⁰	R1	0.892±0.011	1.042±0.037	1.088±0.039
	R2	0.914±0.005	0.974±0.027	1.014±0.041
	R3	0.963±0.013	0.947±0.009	1.022±0.018
	media	0.923±0.021 ***	0.988±0.028	1.041±0.023
10 ⁻⁹	R1	0.886±0.009	1.038±0.027	1.046±0.016
	R2	0.910±0.010	0.954±0.026	1.054±0.027
	R3	0.997±0.025	0.963±0.014	0.991±0.018
	media	0.931±0.033 **	0.985±0.026	1.031±0.019
10 ⁻⁸	R1	0.931±0.007	1.029±0.055	1.076±0.013
	R2	0.939±0.006	0.960±0.007	1.052±0.021
	R3	0.941±0.022	0.955±0.008	1.018±0.011
	media	0.937±0.002 **	0.981±0.023	1.049±0.016
10 ⁻⁷	R1	0.909±0.005	1.031±0.030	1.083±0.009
	R2	0.928±0.005	0.960±0.007	1.057±0.044
	R3	0.970±0.015	0.973±0.004	1.032±0.005
	media	0.936±0.017 **	0.988±0.021	1.057±0.014
10 ⁻⁶	R1	0.907±0.006	1.030±0.020	1.090±0.026
	R2	0.916±0.014	0.989±0.015	0.990±0.032
	R3	0.985±0.020	0.990±0.015	1.023±0.011
	media	0.936±0.024 **	1.003±0.013	1.034±0.029
10 ⁻⁵	R1	0.936±0.013	1.026±0.014	1.097±0.013
	R2	0.895±0.043	0.969±0.030	1.046±0.030
	R3	1.047±0.022	1.056±0.009	1.048±0.011
	media	0.959±0.045	1.017±0.025	1.064±0.016 *

^a El Índice de crecimiento expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento por lo tanto = 1

^b Debido a lo anterior, para el grupo control se presentan los rangos de los valores de absorbancia a 540nm, que representan la proliferación basal de los cultivos.

* p<0.05 comparado con el control no tratado

** p<0.01 comparado con el control no tratado

*** p<0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 7.9 Efecto del opioide 9336 sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares, mieloides y fibroblastoides de origen murino

		Índice de crecimiento ^a	
Dosis (Molar)	Repetición	L5178Y	L929
control ^b	R1	0.284±0.002	0.224±0.003
	R2	0.199±0.001	0.24±0.008
	R3	0.664±0.016	0.297±0.001
10 ⁻¹¹	R1	1.332±0.017	1.131±0.040
	R2	1.252±0.013	1.132±0.051
	R3	0.945±0.020	1.021±0.008
	media	1.176±0.118 *	1.094±0.036 *
10 ⁻¹⁰	R1	1.321±0.041	1.232±0.070
	R2	1.273±0.016	1.047±0.048
	R3	0.955±0.014	1.030±0.011
	media	1.183±0.115 *	1.103±0.064 **
10 ⁻⁹	R1	1.295±0.025	1.104±0.035
	R2	1.317±0.008	1.084±0.028
	R3	0.978±0.012	1.000±0.018
	media	1.197±0.109 *	1.063±0.031
10 ⁻⁸	R1	1.289±0.042	1.076±0.038
	R2	1.273±0.047	1.004±0.027
	R3	1.015±0.000	1.026±0.009
	media	1.192±0.088 *	1.035±0.021
10 ⁻⁷	R1	1.298±0.042	1.086±0.041
	R2	1.347±0.030	1.022±0.026
	R3	0.998±0.005	1.016±0.003
	media	1.215±0.109 **	1.042±0.022
10 ⁻⁶	R1	1.337±0.041	1.224±0.037
	R2	1.393±0.006	1.142±0.029
	R3	0.993±0.008	1.082±0.004
	media	1.241±0.124 **	1.149±0.041 ***
10 ⁻⁵	R1	1.226±0.024	1.400±0.043
	R2	1.355±0.037	1.310±0.044
	R3	0.988±0.034	1.253±0.017
	media	1.190±0.107 *	1.321±0.042 ***

^a El Índice de crecimiento expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento por lo tanto = 1

^b Debido a lo anterior, para el grupo control se presentan los rangos de los valores de absorbancia a 540nm, que representan la proliferación basal de los cultivos.

* p<0.05 comparado con el control no tratado

** p<0.01 comparado con el control no tratado

*** p<0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 7.10 Efecto del opioide 9336 sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares linfoides, mieloides de origen humano

		Índice de crecimiento ^a	
Dosis (Molar)	Repetición	Jurkat	U937
control ^b	R1	0.605±0.003	0.675±0.003
	R2	0.590±0.001	0.682±0.003
	R3	0.472±0.002	0.493±0.004
10 ⁻¹¹	R1	0.983±0.021	1.075±0.027
	R2	0.965±0.003	0.978±0.012
	R3	1.027±0.019	1.082±0.011
	media	0.992±0.018	1.045±0.033
10 ⁻¹⁰	R1	0.984±0.015	1.027±0.012
	R2	0.945±0.004	0.966±0.011
	R3	0.998±0.030	0.999±0.008
	media	0.976±0.015	0.997±0.017
10 ⁻⁹	R1	0.976±0.012	1.059±0.018
	R2	0.953±0.004	0.942±0.012
	R3	1.009±0.024	1.106±0.011
	media	0.980±0.016	1.036±0.048
10 ⁻⁸	R1	0.978±0.004	1.099±0.021
	R2	0.947±0.003	0.948±0.018
	R3	1.009±0.024	1.130±0.029
	media	0.978±0.017	1.059±0.056
10 ⁻⁷	R1	0.961±0.003	1.111±0.018
	R2	0.968±0.003	1.018±0.014
	R3	0.996±0.028	1.095±0.010
	media	0.975±0.010	1.074±0.028 **
10 ⁻⁶	R1	0.974±0.011	1.071±0.000
	R2	0.989±0.003	1.016±0.012
	R3	1.039±0.016	1.028±0.012
	media	1.001±0.019	1.038±0.016
10 ⁻⁵	R1	0.940±0.006	0.991±0.007
	R2	0.999±0.009	0.982±0.013
	R3	1.030±0.013	1.061±0.018
	media	0.990±0.026	1.011±0.025

^a El Índice de crecimiento expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo Índice de crecimiento por lo tanto = 1

^b Debido a lo anterior, para el grupo control se presentan los rangos de los valores de absorbancia a 540nm, que representan la proliferación basal de los cultivos.

** p<0.01 comparado con el control no tratado

7. DISCUSIÓN

Los compuestos opioides podrían constituir importantes modificadores de respuestas biológicas. Hasta el momento además de tener actividad antinociceptiva (Dickenson, 1997; Cherny, 1996, McCarthy y cols, 2001), de modular las respuestas inmunes (Carr y cols, 1990, 1995, 1996; Eisenstein y Hilburger, 1998; Nowak y cols, 1998; Gómez-Flores y cols, 1998, 1999, 2000), de mimetizar el estrés y afectar las vías neuroendocrinas (Dafny y cols, 1985; Dantzer y Kelley, 1989), recientemente se le han atribuido propiedades antitumorales (Maneckjee y cols, 1990; Panagiotou y cols, 1999; Sueoka y cols, 1998). Por todo esto se puede considerar a los opioides como un grupo de compuestos con gran potencial y utilidad para la investigación y desarrollo farmacológico, que tienen capacidad adyuvante en la terapia de pacientes con compromiso inmunológico.

Los opioides que originalmente se consideraron para su estudio y empleo terapéutico, fueron alcaloides obtenidos de *Papaver somniferum* o bien péptidos opioides endógenos como las encéfalinas, endorfinas y deltorfinas. (Brownstein, 1993), Sin embargo dichos compuestos presentan desventajas para su desarrollo y aplicación, además causan inmunosupresión (morfina) o son fácilmente degradados por peptidasas del organismo (opioides peptídicos). Por dichas razones se prefiere el diseño, desarrollo y utilización de opioides sintéticos como una alternativa mas viable.

En la actualidad, el diseño de opioides tiene diversos objetivos de acuerdo al campo de estudio; en inmunoterapia, el objetivo es el de desarrollar compuestos opioides capaces de modular la respuesta inmune de pacientes inmunocomprometidos, para este efecto es necesario llevar a cabo pruebas que determinen el efecto de estos opioides sobre parámetros representativos de la respuesta inmune (Loew, 1999)

El objetivo de este trabajo fue el de probar los efectos de una serie de compuestos opioides sintéticos sobre la respuesta de linfocitos y macrófagos murinos y humanos. Esto nos ha permitido obtener un perfil del potencial inmunomodulador de estos opioides para determinar su utilidad clínica. Además se realizaron pruebas *in vitro* para determinar si alguno de estos compuestos posee propiedades antitumorales lo que nos permite tener información más amplia de su actividad biológica.

Para el caso de las propiedades inmunomoduladoras, se emplearon células de dos especies, la rata y el humano; la rata como bien es sabido, es uno de los modelos más ampliamente empleados en la investigación farmacológica, y como tal, una herramienta fundamental para la identificación de drogas potencialmente útiles. Por otro lado, las células humanas son por su origen del mayor interés para nosotros, como se verá más adelante. A pesar de la cercanía filogenética entre ambas especies, por los resultados obtenidos es evidente que la exposición a estos opioides produce diferentes respuestas en ambos modelos, lo que se discutirá más adelante.

Otro aspecto importante que se consideró en este trabajo fue el estatus de las células que fueron expuestas a los opioides, ya que los estudios se realizaron con linfocitos y macrófagos residentes y activados para los ensayos de variables inmunológicas. Esta distinción es relevante ya que se han reportado variaciones en la respuesta a opioides de acuerdo al estado de activación de las células. La causa de esto, podría estar en que la activación de linfocitos y macrófagos lleva a importantes modificaciones en el patrón de genes expresados por las células y esto puede afectar el número y diversidad de receptores expresados en superficie, lo que condiciona la magnitud y naturaleza de la respuesta obtenida. (Kent Teague y cols, 1999).

De los compuestos opioides evaluados el SNC80 es por sus antecedentes el más prometedor. Los estudios farmacológicos realizados muestran que el SNC80 tiene actividad analgésica con potencial terapéutico (Calderón y cols, 1994, Bilsky y cols, 1995; Negus y cols, 1998), además esta droga posee también la capacidad de estimular la respuesta inmune *in vitro* y *ex-vivo* en ratas (Nowak y cols, 1998; Gómez-Flores y cols, 2001).

En el presente estudio tuvimos la oportunidad de ampliar estas observaciones y aportar información inédita de sus efectos sobre leucocitos humanos, los resultados mostraron que a pesar de que el SNC80 fue capaz de activar la proliferación de linfocitos de rata, este opioide no alteró la proliferación de linfocitos humanos. Este punto es importante dado que no necesariamente se busca un compuesto que afecte las funciones leucocitarias, y en este caso el SNC80 es un analgésico muy potente que podría ser utilizado en la clínica sin esperar cambios en las funciones inmunológicas del paciente como en el caso

de la morfina (Eisenstein y Hilburger, 1998; Weber y Pert, 1989, Gómez-Flores y cols, 1998, 1999, 2000).

En cuanto a los efectos sobre la activación de macrófagos de rata, la acción se limita a la producción de óxido nítrico por macrófagos activados con LPS y el efecto es de supresión, sin embargo esta disminución en la producción de óxido nítrico parece estar relacionada con citotoxicidad sobre los macrófagos, como pone en evidencia los índices de viabilidad observados en estos casos, ya que se ha demostrado que el óxido nítrico es tóxico para macrófagos (Albina y cols, 1993). En forma alternativa, esta citotoxicidad podría ser provocada por la droga (un determinante común en la estructura de ésta). Si bien estos hallazgos son contrarios a los de Gómez-Flores y cols. (2001), se debe considerar que se utilizó una línea diferente de animales, la Sprague Dawley, mientras que en el estudio mencionado se utilizó la línea F344, las líneas de animales son una variable importante al evaluar el efecto inmunomodulador de opioides (Eisenstein y cols, 1995).

Se sabe, por ejemplo que la rata Sprague Dawley presenta un sistema HPA deficiente, por lo que existen problemas de regulación inmunológica a través del sistema neuroendocrino. Con respecto a la selección de leucocitos de ratas y no de humanos para determinar la producción de óxido nítrico, se ha demostrado que los macrófagos humanos necesitan de estímulos muy especiales para promover la producción de esta molécula debido a la ausencia de biopterina, un cofactor indispensable en la activación de la sintetasa de óxido nítrico.

Las observaciones obtenidas con linfocitos y macrófagos de rata sugieren entonces que el SNC80 tiene un efecto bimodal, de estimulación con respecto a la respuesta de linfocitos y de supresión en relación a la de macrófagos, esta posibilidad ya ha sido sugerida para la actividad de otros opioides. El CGPM-9 tiene una acción dual *in vitro*, estimula la proliferación de linfocitos y suprime la producción de LPS y TNF- α por macrófagos de rata (Hicks y cols, 2001).

Se observó también que el SNC80 posee propiedades antitumorales *in vitro*. El SNC80 inhibió el crecimiento *in vitro* de cinco líneas celulares, L5178Y, Jurkat, U937, J774A.1 y L929, y su efecto abarcó un amplio rango de concentraciones, las cuales se encuentran principalmente entre 10^{-9} y 10^{-6} M. Los índices de inhibición son marginales en todos los casos, en un rango que va del 10 al 22% de inhibición.

Es interesante notar que este compuesto tuvo un efecto estimulador de la proliferación de células normales mientras que para células transformadas se observó el efecto contrario, esto es mas evidente en el caso de la línea L5178Y, el cual es un linfoma murino con una alta tasa de proliferación, esta inhibición selectiva podría tener su origen en las diferencias metabólicas entre células normales y transformadas que pueden incluir entre otras cosas la tasa de incorporación de la droga a la célula (Hohenwarter y cols., 1992). Además, en experimentos recientes *in vivo* desarrollados en nuestro laboratorio, se ha demostrado que el SNC80 incrementa la sobrevivencia de ratones Balb/c luego

de una administración letal del linfoblastoma L5178Y-R, así como también disminuye el peso y volumen del tumor (no se muestran estos datos).

El efecto contradictorio del SNC80 no ha sido elucidado aún, sin embargo, la activación de ciertos receptores en células normales y tumorales puede conducir a vías intracelulares divergentes que producen estimulación, inhibición o muerte. Respecto a esto, se ha demostrado que las células normales son resistentes a la apoptosis inducida por el ligando inductor de apoptosis asociado al factor de necrosis tumoral (TRAIL) el cual ha sido relacionado con la expresión de dos receptores TRAIL (Zhang y cols, 2000). Además, se ha reportado que la proteína inflamatoria 1-alfa de macrófagos es capaz de proteger células normales, pero no a las células de una leucemia crónica mieloide, de los efectos citotóxicos de la droga citosina arabinosa sobre el ciclo celular (Durig y cols, 1999). Los opioides pueden ser solo tóxicos para las células tumorales ya que estas células, en comparación con las células normales, probablemente carezcan de un sistema de protección similar a los descritos arriba contra la muerte inducida por opioides.

Un caso aparte lo constituyen las líneas Jurkat y H9, ya que ambas son de origen linfocítico y humano, y sin embargo, la primera es susceptible a la actividad antitumoral del SNC80 mientras que la segunda no, esta diferencia podría explicarse por el diferente estadio de maduración de estos tipos celulares, ya que las fases de maduración de los linfocitos se caracterizan precisamente por la expresión de ciertos genes y de receptores en su superficie (Akashi y cols, 2000). En forma específica para este estudio, se ha demostrado que existe diferente expresión de receptores opioides tipo *kappa* en los

diferentes estadios de maduración de linfocitos de ratón (Ignatowski y Bidlack, 1999). Otros detalles observados han sido el de la mayor sensibilidad que presentaron las líneas murinas y adherentes (J774A.1 y L929), en contraste con las líneas humanas y las que crecen en suspensión, esto puede tener su origen en diferencias de acuerdo a especie o bien compartimento celular de origen (Lysle y cols., 1993).

El compuesto 9332 por su parte se caracterizó por una marcada actividad inhibitoria, la cual no es selectiva, pero además posee actividad estimuladora de la proliferación celular. Ambas propiedades parecen ser dependientes de la concentración del opioide. De los compuestos derivados del NTI (9332 y 9333) existe un reporte único sobre su actividad sobre la proliferación de linfocitos (Riley y cols., 1998), donde también se observó la estimulación de la proliferación de linfocitos de rata, sin embargo, a pesar de emplear el mismo rango de concentraciones que este trabajo, el estudio de Riley y cols. (1998) no menciona actividad citotóxica del 9332 a la concentración de 10^{-5} M. La causa de esta discrepancia podría ser la línea de rata empleada, que en el caso del estudio mencionado fue la línea Fisher 344N, ya que la edad y el peso aproximado coinciden con el de este trabajo; al respecto debe mencionarse que se ha reportado la existencia de notables diferencias en la respuesta a opioides dependiendo de la línea de animal empleada. Por ejemplo, las líneas de rata F344, Sprague Dawley, Long Evans y Lewis difieren considerablemente en su respuesta a varios opioides en términos de potencia y efectividad analgésica (Morgan y cols., 1999); es posible también que estas diferencias se deban a variaciones a nivel intracelular en

cuanto a la eficiencia de los mecanismos de acoplamiento entre el receptor y las proteínas de señalización.

La acción del 9332 sobre la producción del óxido nítrico es también de inhibición (en la concentración de 10^{-5} M); se observó una disminución hasta del 60% en el índice de producción de óxido nítrico con respecto al control para macrófagos residentes. Esta disminución es menor, de alrededor del 40 %, en macrófagos activados; en ambos casos la disminución en los niveles de óxido nítrico producidos está acompañado por disminuciones en los índices de viabilidad de los cultivos correspondientes. Sin embargo, los índices de viabilidad (67.56 y 78.36, respectivamente) no explican por completo la supresión observada, por lo que ésta podría ser ocasionada a nivel post-transcripcional, a diferencia de lo sugerido por Kowalski (1998), sin descartar un posible efecto citotóxico sobre las células que se reflejaría en niveles menores de óxido nítrico en los cultivos.

Un detalle más por destacar, es la diferencia en la magnitud de la inhibición entre macrófagos residentes y activados, los primeros son más afectados que los segundos, las condiciones del experimento fueron las siguientes; los macrófagos se pre-sensibilizaron con el opioide durante 16 horas y después fueron o no activados con LPS, y además la exposición no fue simultánea. Iuvone y cols. (1995) mencionan la importancia del período de activación con LPS, ellos observaron que los macrófagos activados por al menos 8 horas no eran afectados por la exposición a opioides, en este caso la morfina.

El 9332 tiene también efecto inhibitorio de la proliferación de CMH tanto residentes como activadas; esta es una observación inédita ya que no existen estudios previos sobre células humanas con estos opioides. En cuanto a la producción de TNF- α por monocitos humanos se encontró que las tres concentraciones empleadas de este opioide inhibieron la producción de TNF- α por monocitos residentes. La inhibición de la producción de TNF- α por opioides podría ser de beneficio en varias situaciones clínicas donde elevadas concentraciones de esta citocina se asocian a padecimientos como la artritis reumatoide y SIDA, entre otros.

Por otro lado, el efecto del 9332 sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares, es un reflejo de lo que se observó con células normales; posee una gran capacidad de inhibición del crecimiento de la línea L5178Y-R en la concentración de 10^{-5} M, y también presentó un comportamiento bimodal con respecto a la concentración del opioide ya que se observó que a concentraciones menores se estimuló el crecimiento de dicha línea celular.

La posible causa de este comportamiento bimodal con respecto a la concentración del opioide puede estar en las características farmacológicas de este compuesto, el 9332 es un derivado del NTI, que es un antagonista opioide tipo delta. Numerosos derivados de la naltrexona (NTX) cuya actividad es análoga a la del NTI se han caracterizado como agonistas mu/antagonistas delta, es decir son opioides mixtos en cuando a su eficacia y afinidad, estos derivados han ganado importancia últimamente puesto que se cree que dicho perfil permite que el opioide tenga capacidad analgésica sin propiedades

adictivas (Wells y cols., 2001; Anathan y cols., 1998; Anathan y cols., 1999), pero además un perfil de esa naturaleza puede presentar variaciones en cuanto a la respuesta obtenida a una concentración dada; esto puede deberse a que las drogas que son relativamente selectivas en concentraciones estándar (10^{-7} - 10^{-9} M) pueden interactuar con subtipos adicionales de receptores cuando se administran en dosis suficientemente altas, lo que da por resultados posibles cambios en su perfil farmacológico.

Los compuestos 9333 y 9334 son derivados del NTI y el BNTX respectivamente, su actividad inmunomoduladora y antitumoral no mostró un patrón de acción que sugiera un potencial en terapia. El compuesto 9333 es capaz de estimular la proliferación de linfocitos de rata activados en forma puntual y marginal, no tiene efecto sobre las funciones de macrófagos de rata, no tiene efecto sobre la proliferación de CMH y su efecto supresor sobre la producción de $\text{TNF-}\alpha$ por monocitos, aunque estadísticamente significativo, es marginal. En líneas celulares presenta efecto inhibitorio sobre las líneas de origen murino, su propiedad más relevante es el efecto inhibitorio sobre la línea L5178Y, proporcional a la concentración de opioide.

El compuesto 9334, por su parte, posee la propiedad de estimular la proliferación de linfocitos de rata activados en un amplio rango de concentraciones del opioide, y en forma proporcional a la concentración del opioide, su mayor actividad se observa sobre linfocitos activados con $2.4 \mu\text{g/ml}$ de Con A. Afecta los niveles de óxido nítrico producidos por macrófagos de rata en una forma puntual y marginal, ya que la supresión puede deberse a la

disminución observada de la viabilidad de los cultivos de macrófagos (índice de producción de nitritos=0.775, índice de viabilidad=88.93). No posee actividad sobre las CMH y su actividad sobre líneas tumorales es bimodal con respecto al tipo u origen celular, inhibe en forma marginal el crecimiento de la leucemia humana Jurkat y estimula el crecimiento de la línea L929 en un amplio rango de concentraciones del opioide.

Las diferentes respuestas obtenidas en diferentes tipos celulares en respuesta a la activación de diferentes receptores opioides o incluso al mismo receptor probablemente reflejan las diferencias en la expresión de proteínas G y los sistemas efectores entre las células más que las diferencias inherentes a las propiedades de los receptores o de las drogas (Gavériaux-Ruff y cols, 2001).

El compuesto 9336 posee propiedades estimuladoras de la proliferación que no distinguen especie, estatus células o naturaleza tumoral. El 9336 es capaz de estimular la proliferación de linfocitos de rata residentes y activados, estimula la proliferación de CMH residentes y activadas y estimula el crecimiento *in vitro* de líneas tumorales murinas en un amplio rango de concentraciones del opioide. No posee propiedades que modulen las funciones de macrófagos de rata o monocitos humanos. El 9336 posee características que sugieren que no sólo estimula si no que es capaz de activar la proliferación de linfocitos residentes, además su acción sobre células humanas muestra potencial para posteriores estudios clínicos.

Los agonistas opioides no peptídicos carecen de las desventajas de los opioides peptídicos y derivados de alcaloides, no se degradan, pueden

atravesar la barrera hematoencefalica, no producen dependencia, no son inmunosupresores y en algunos casos pueden estimular las respuestas inmunes y tener actividad antitumoral. Pueden servir como agentes terapéuticos con uso potencial en el tratamiento de enfermedades infecciosas, incluyendo al SIDA, y cáncer. Además el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales los opioides producen sus efectos en el sistema inmune, así como el estudio de la relación estructura-función, pueden ayudar al descubrimiento, diseño y síntesis de nuevos opioides que tengan propiedades inmunomoduladoras y antitumorales específicas. Así, la diversidad de fármacos opioides puede ser una fuente de nuevos compuestos con potencial inmunoterapéutico y antitumoral, también pueden ser herramientas farmacológicas para la investigación de como el sistema inmune es controlado y regulado en forma natural a través de mecanismos opiotérgicos.

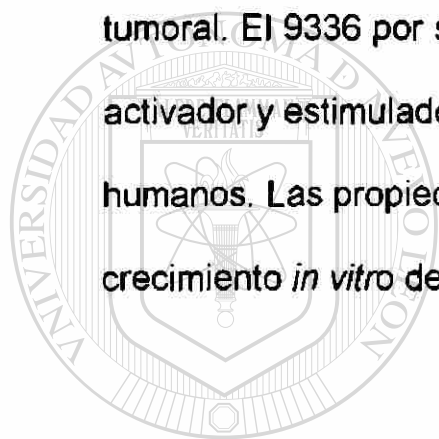
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

8. CONCLUSIONES

1. El compuesto SNC80 estimuló la proliferación de linfocitos y suprimió en forma marginal las funciones de macrófagos en rata. No alteró las funciones de linfocitos y macrófagos humanos, además posee actividad antitumoral *in vitro* sobre líneas tumorales murinas y humanas.
2. El compuesto 9332 se destacó por sus propiedades inmunomoduladoras de tipo bimodal con respecto a la concentración de opioide empleada. A la concentración de 10^{-5} M mostró una gran capacidad de inhibición de la respuesta *in vitro* de linfocitos, macrófagos y células tumorales. A dosis por debajo de 10^{-5} M (10^{-6} - 10^{-11} M) fue capaz de estimular la proliferación *in vitro* de linfocitos de rata
3. El compuesto 9333 presentó limitada actividad inmunomoduladora, y una mas amplia actividad antitumoral. Fue capaz de suprimir en forma marginal la producción de TNF- α por monocitos humanos activados con LPS, mientras que su actividad antitumoral consistió en la capacidad de inhibir el crecimiento de líneas tumorales murinas más no humanas.
4. El compuesto 9334 presentó propiedades inmunomoduladoras de tipo bimodal con respecto al tipo celular. Estimuló la proliferación de linfocitos de rata activados con mitógeno, mientras que suprimió los niveles de

óxido nítrico producidos por macrófagos de rata. No afectó las funciones de linfocitos y macrófagos humanos. Presentó un amplio rango de actividad antitumoral también de tipo bimodal ya que inhibió el crecimiento de una línea linfoide y estimuló el de una fibroblastoide, ambas de origen murino.

5. El compuesto 9336 presentó actividad inmunomoduladora con potencial terapéutico, además, posee propiedades moduladoras del crecimiento tumoral. El 9336 por sus efectos sugiere la capacidad de actuar como un activador y estimulador de la respuesta proliferativa de linfocitos de rata y humanos. Las propiedades estimuladoras de este compuesto alteraron el crecimiento *in vitro* de líneas tumorales murinas, mas no humanas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

9. LITERATURA CITADA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. 1999. *Inmunología Celular y Molecular*. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.
- Adams, D.O. and Snyderman, R. (1979). Do macrophages destroy nascent tumours? *J Natl Cancer Inst* 62: 1341-1345
- Adams, D.O., Johnson, W.J. and Marino, P.A. (1982). Mechanisms of target destruction in macrophage mediated tumour cytotoxicity. *Fed Proc* 41: 2212-2221
- Agarwal D., Glasel J.A. (1999). Differential effects of opioid and adrenergic agonists on proliferation in a cultured cell line. *Cell Prolif* Aug;32(4):215-29
- Albina, J.E., Cui, S., Mateo, R.B., Reichner, J.S. (1993). Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol* 150:5080-5085
- Arakawa, K., Akami, T., Okamoto, M., Akioka, K., Nakai, I., Oka, T., Nagase, H. 1993. Immunosuppression by delta opioid receptor antagonist. *Transplant Proc* 27-738
- Akashi, K., Reya T., Dalma-Weiszhausz, D., Weissman, I. (2000). Lymphoid precursors. *Curr Op Immunol* 12:144-150
- Ananthan S., Johnson C.A., Carter R.L., Clayton S.D., Rice K.C., Xu H., Davis P., Porreca F., Rothman R.B. 1998. Synthesis, opioid receptor binding, and bioassay of naltrindole analogues substituted in the indolic benzene moiety. *J Med Chem*; 41(15):2872-81
- Ananthan S., Kezar H.S., Carter R.L., Saini S.K., Rice K.C., Wells J.L., Davis P., Xu H., Dersch C.M., Bilsky E.J., Porreca F., Rothman R.B. 1999. Synthesis, opioid receptor binding, and biological activities of naltrexone-derived pyrido- and pyrimidomorphinans. *J Med Chem*; 42(18):3527-38

- Audhya, T., Jain, R., and Hollander, C.S. (1991). Receptor-mediated immunomodulation by corticotropin-releasing factor. *Cell. Immunol.* 134, 77-84.
- Becjerman, K.P., Rogers, H.W., Corbett, J.A., Schreiber, R.D., McDaniel, M.L. and Unanue, E.R. (1993). Release of nitric oxide during T cell-independent pathway of macrophage activation. Its role in resistance to *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 150:888-895
- Bermudez, L.E.M. and Young, L.S. (1989). Oxidative and non-oxidative intracellular killing of *Mycobacterium avium* complex. *Microb Pathog* 7:289-298
- Bidlack, J.M., Saripalli, L.D.; Lawrence, D.M. (1992). Kappa-Opioid binding sites on a murine lymphoma cell line. *Eur J Pharmacol.* Nov 2;227(3):257-65
- Bidlack, J.M., Lawrence, D.M., Ignatowski, T.A. (1996). Kappa-Opioid receptors on immune cells as studied by fluorescent ligands. *Adv Exp Med Biol.* 402:13-22.
- Bilsky, E.J., Calderon S.N., Wang, T., Bernstein, R.N., Davis P., Hruby, V.J., McNutt, R.W., Rothman, R.B.; Rice, K., Porreca, F. (1995). SNC80, a selective, nonpeptidic and systemically active opioid delta agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 273:1 359-66
- Brinkman, W.J., Hall, D.M., Suo, J.L., Weber, R.J. (1998). Centrally-mediated opioid-induced immunosuppression. Elucidation of sympathetic nervous system involvement. *Adv Exp Med Biol* 437:43-9
- Brownstein, M.J. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5391-5393
- Brush, F.R. and Nagase Shain C. Chapter 8th. Endogenous Opioids and Behavior. In *Psychoendocrinology*. 1989. Edited by F. Robert Brush and Seymour Levine. Academic Press, Inc. United States of America.
- Calderon, S.N., Rothman, R.B., Porreca, F., Flippen-Anderson, J.L., McNutt, R.W., Xu, H., Smith, L.E., Bilsky, E.J., Davis, P., Rice, K.C. (1994). Probes for narcotic receptor mediated phenomena. 19. Synthesis of (+) (+)-4-((alpha R)9-alpha-((2S, 5R)-4-allyl-2, 5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-

methoxybenzyl)-*N*, *N*-diethyl-benzamide (SNC80): A highly selective, nonpeptide δ opioid receptor. *J Med Chem* **37**:2125-2128

- Cameron, D.J. (1987). Effect of neuropeptides on macrophage mediated cytotoxicity in normal donors and cancer patients. *Jpn. J. Exp. Med.* **57**, 31-39
- Campa, M.J., Schreiber, G., Bepler, G., Bishop, M.J., McNutt, R.W., Chang, K.J. and Patz, E.F. Jr. (1996). Characterization of δ opioid receptors in lung cancer using a novel nonpeptidic ligand, *Cancer Res*, **56**, 1695
- Carpenter, G.W., Garza, H.H. Jr, Gebhardt, B.M., Carr, D.J. (1994). Chronic morphine treatment suppresses CTL-mediated cytotoxicity, granulation, and cAMP responses to alloantigen. *Brain Behav Immun* Sep;**8**(3):185-203
- Carr, D.J., Klimpel, G.R. (1986). Enhancement of the generation of cytotoxic T cells by endogenous opiates. *J Neuroimmunol* Jul; **12** (1):75-87
- Carr, D.J., Kim, C.H., DeCosta, B.R., Jacobson, A.E., Rice, K, Blalock, J.E. (1988). Evidence for a delta-class opioid receptor on cells of the immune system. *Cell Immunol* Oct 1; **116**(1):44-51
- Carr, D.J., DeCosta, B.R., Kim, C.H., Jacobson, A.E., Guarcello, V., Rice, K, Blalock, J.E. (1989). Opioid receptors on cells of the immune system: evidence for delta- and kappa classes. *J Endocrinol* Jul; **122**(1): 161-8
- Carr, D.J., Radulescu, R.T., deCosta, B.R., Rice, K.C., Blalock, J.E. (1990). Differential effect of opioids on immunoglobulin production by lymphocytes isolated from Peyer's patches and spleen. *Life Sci* **47**(12):1059-69
- Carr, D.J., France, C.P. (1993) Immune alterations in morphine-treated rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* Oct; **267**(1):9-15
- Carr, D.J., Woolley, T.W., Clarke, B.L. (1994). The relationship between the hypothalamic-pituitary adrenal axis and oral-induced immunosuppression. *Int J Neurosci* May; **76**(1-2): 151-64
- Carr, D.J., Baker, M.L., Holmes, C., Brockunier, L.L., Bagley, J.R., France, C.P. (1994). OHM3295: a fentanyl-related 4-heteroanilido piperidine with

- analgesic effects but not suppressive effects on splenic NK activity in mice. *Int J Immunopharmacol* Oct; 16(10):835-44
- Carr, D.J., Carpenter, G.W., Garza, H.H.Jr., France, C.P., Prakash, O.M. (1995). Chronic & infrequent opioid exposure suppresses IL-R2 expression on rhesus monkey peripheral blood mononuclear cells following stimulation with pokeweed mitogen. *Int J Neurosci* Mar;81(1-2):137-48
- Carr, D.J., Scott, M., Brockunier, L.L., Bagley, J.R., France, C.P. (1995). The effect of novel opioids on natural killer activity and tumor surveillance in vivo. *Adv. Exp. Biol. Med.* 405-5
- Carr, D.J., Serou, M. (1995). Exogenous and endogenous opioids as biological response modifiers. *Immunopharmacology* Nov;31(1):59-71
- Carr, D.J., Rogers, T.J., Weber, R.J. (1996). The relevance of opioids and opioid receptors on immunocompetence and immune homeostasis. *Proc Soc Exp Biol Med* 213:3 248-57
- Carrera, J., Catala, J.C., Monedero, P., Carrascosa, F., Arroyo, J.L., y Subira, M.L. (1992). Depression of the mononuclear phagocyte system caused by high doses of narcotics. *Rev Med Univ Navarra*, 37, 119-125
- Casellas, A.M., Guardiola, H., y Renaud, F.L. (1991). Inhibition by opioids of phagocytosis in peritoneal macrophages. *Neuropeptides* 18, 35-40
- Cecelin, F. (1995). Opioid and anti-opioid peptides. *Fundam Clin Pharmacol* 9:5 409-33
- Chao, C.C., Gekker, G., Sheng, W.S., Hu, S., Tsang, M. y Peterson, P.K. (1994). Priming effect of morphine on the production of tumor necrosis factor- α by microglia: implications in respiratory burst activity and human immunodeficiency virus-1 expression. *J Pharmacol Exp Ther* 269, 198-203
- Chang, K.J., Rigdon, G.C., Howard, J.L., and McNutt R.W. (1993) A novel, potent and selective non-peptidic *delta*-opioid receptor agonist BW 373U86. *J Pharmacol Exp Ther* 267: 852-857

- Chen, T., Scott, E., Morrison, D.C. (1994). Differential effects of serum on lipopolysaccharide receptor-directed macrophage activation for nitric oxide production. *Immunol Lett* 40 179-187
- Cherny, N.I. (1996) Opioid analgesics: comparative features and prescribing guidelines. *Drugs* 51:5 713-37
- Chuang, L.F., Chuang, T.K., Killam, K.F.J., Chuang, A.J., Kung, H.F., Yu, L., Chuang, R.Y. (1994). Delta opioid receptor gene expression in lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 202, 1291-1299
- Conti A. (2000). Oncology in neuroimmunomodulation. What progress has been made?. *Ann N Y Acad Sci* 917:68-83
- Dafny, N., Prieto-Gómez, B., Reyes-Vázquez, C. (1985). Does the immune system communicate with the central nervous system? Interferon modifies central nervous activity. *J Neuroimmunol* 9(1): 1-12
- Dafny, N., Lee J.R., Dougherty, P.M. (1988). Immune response products alter CNS activity: interferon modulates central opioid functions. *J Neurosci Res* 19(1):130-9
- Dantzer, R., Kelley, K.W. (1989). Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sci* 1995-2008
- Deitch, E.A., Xu, D., Bridges, E.M. (1988). Opioids modulate human neutrophil and lymphocyte function: thermal injury alters plasma beta-endorphin levels. *Surgery* 104: 1 41-8
- Dickenson, A.H. (1997). Plasticity: implication for opioid and other pharmacological interventions in specific pain states. *Behav Brain Sci* 20:3 392-403
- Downing, J.E.G., and Kendall, M.D. (1996). Peripheral and central neural mechanisms for immune regulation through the innervation of immune effector sites. In: *The Physiology of Immunity*, 103-126. Edited by J.A.Marsh and M.D.Kendall, New York, CRC Press.
- Durig J., Testa, N.G., Lord, B.I., Kasper, C., Chang, J., Telford, N., Dexter, T.M., Heyworth, C.M. (1999). Characterization of the differential

- response of normal and CML haemopoietic progenitor cells to macrophage inflammatory protein-1alpha. *Leukemia* 13:2012-2022
- Eisenstein, T.K., Meissler, J.J., Rogers, T.J., Geller, E.B., Adler, M.W. (1995). Mouse strains differences in immunosuppression by opioids *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther* 275:3 1485-1489
- Eisenstein, T.K., Hilburger, M.E. (1998). Opioid modulation of immune responses: effects on phagocyte and lymphoid cell populations. *J Neuroimmunol* 83: 1-2 36-44
- Fecho, K., Maslonek, K.A., Dykstra, L.A., Lysle, D.T. (1996). Evidence for sympathetic and adrenal involvement in the immunomodulatory effects of acute morphine treatment in rats. *J Pharmacol Exp Ther* May; 277(2): 633-45
- Freudenberg, M.A. and Galanos, C. (1991). Tumor necrosis factor alpha mediates lethal activity of killed gram-negative and gram-positive bacteria in D-galactosamine-treated mice. *Infect Immun* 59:2110-2115
- Froehlich, J.C. 1997. Opioid Peptides. *Alcohol Health & Research World*, 21, 2, 132-136
- Garza, H.H. Jr., Prakash, O., Carr, D.J. (1994). Immunologic characterization of TAT72-transgenic mice: effects of morphine on cell-mediated immunity. *Int J Immunopharmacol* Dec; 16(12):1061-70
- Gaveriaux-Ruff, C., Peluso, J., Simonin, F., Laforet, J., Kieffer, B. (1995). Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells. *FEBS Lett.* 369, 272-276
- Gavériaux-Ruff, C.; Filliol, D., Simonin, F., Matthes, H.D., Kieffer, B.I. (2001). Immunosuppression by δ -Opioid antagonist naltrindole: δ - and triple $\mu/\delta/\kappa$ -opioid receptor knockout mice reveal a nonopioid activity. *J Pharm Exp Ther* 298:1193–1198
- Gómez-Flores, R., Tucker, S.D., Kansal, R., Tamez-Guerra, R., Mehta, R.T. (1997a). Enhancement of antibacterial activity of clozimina against *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex infection induced by IFN-gamma is mediated by TNF-alpha. *J antimicrob*

Chemoter 39(2):189-97

- Gómez-Flores, R.; Tamez-Guerra, R.; Tucker, S.D.; Metha, R.T. (1997a). Bidirectional effects of IFN- γ on growth of *Mycobacterium avium* complex in murine peritoneal macrophages. *J Cytokine Interferon Res* 17:331-336
- Gómez-Flores, R., Rodríguez-Padilla, C., Mehta, R.T., Wong, L., Mendoza-Gamboa, E., Tamez-Guerra, R. (1997b). Nitric Oxide and TNF- α production by murine peritoneal macrophages activated with a novel 20-kDa protein isolated from *Bacillus thuringensis* var. *thuringensis* parasporal bodies. *J Immunol* 158: 3796-3799
- Gomez-Flores, R., Suo, J.L., y Weber, R.J. (1998a) Supression of splenic macrophage functions after acute morphine action in the rat mesencephalon periaqueductal gray. *Brain Behav Immun* (enviado)
- Gomez-Flores, R., Weber, R.J. (1998b) Immunomodulation of macrophage functions by opioids. *Adv Exp Med Biol* 437 13-9
- Gómez-Flores, R., Weber, R.J. (1999a). Inhibition of interleukin-2 production and downregulation of IL-2 and transferrin receptors on rat splenic lymphocytes following PAG morphine administration: a role in natural killer and T cell supresion. *J Interferon Cytokine Res* 19:6 625-30
- Gómez-Flores, R., Weber, R.J. (1999b). Opioids, opioid receptors, and the immune system. In *Cytokines, Stress and Immunity*. Edited by N.P. Plotnikoff, R.E. Faith, A.J. Murgó and R. A. Good. CRC Press LLC.
- Gómez-Flores, R., Weber, R.J. (2000). Differential effects of buprenorphine and morphine on immune and neuroendocrine functions following acute administration in the rat mesencephalon periaqueductal gray *Immunopharmacology* 20;48(2):145-56
- Gomez-Flores R, Rice KC, Zhang X, Weber RJ. 2001. Increased tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production by rat macrophages following *in vitro* stimulation and intravenous administration of the delta-opioid agonist SNC80. *Life Sci* 4;68(24):2675-84

- Hagi, K., Uno, K., Inaba, K., Muramatsu, S. (1994). Augmenting effect of opioid peptides on murine macrophage activation. *J. Neuroimmunol.* 50, 71-76
- Hall, D.M., Suo, J.L., Weber, R.J. (1998). Opioid mediated effects on the immune system; sympathetic nervous system involvement. *J Neuroimmunol* mar 15 83:1-2 29-35
- Hatzoglou A., Ouafik L., Bakogeorgou E., Castanas E. (1995). Morphine cross-reacts with somatostatin receptor SSTR2 in the T47D human breast cancer cell line and decreases cell growth. *Adv Exp Med Biol*;480:55-63
- Hatzoglou, A., Gravanis, A., Margioris, A.N., Zoumakis, E. and Castanas, E. (1995b). Identification and characterization of opioid-binding sites present in the Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cell line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 418
- Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Kampa M, Panagiotou S, Martin PM, Loukas S, Castanas E. (2000). Somatostatin and opioid receptors in mammary tissue. Role in cancer cell growth. *Adv Exp Med Biol*;480:55-63
- Hibbs Jr., J.B., Taintor, R.R., Vavrin, Z. and Rachlin, E.M. (1988). Nitric Oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157:87-94
- Hicks ME, Gomez-Flores R, Wang C, Mosberg HI, Weber RJ. (2001). Differential effects of the novel non-peptidic opioid 4-tyrosylamido-6-benzyl-1,2,3,4 tetrahydroquinoline (CGPM-9) on *in vitro* rat T lymphocyte and macrophage functions. *Life Sci* 68(24):2685-94
- Hohenwarter O, Strutzenberger, K., Katinger, H., Liepins, A., Nowicky, J.W. (1992). Selective inhibition of *in vitro* cell growth by the anti-tumour drug ukrain. *Drugs Exptl Clin Res* XVIII/Supple(1-4)
- House, R.V., Thomas, P.T., Kozak, T. Bhargava, H.N. 1995. Suppression of immune function by non-peptidic delta opioid receptor antagonists. *Neurosci Lett* 198:119
- Ignatowski, T.A., Bidlack J.M. (1999). Differential κ -Opioid Receptor Expression on Mouse Lymphocytes at Varying Stages of Maturation and on Mouse Macrophages after Selective Elicitation. *J Pharm Exp Ther* 290:863-870

- Ishikawa, M., Tanno, K., Kamo, A., Takayanagi, Y., Sasaki, K.L. (1993). Enhancement of tumor growth by morphine and its possible mechanism on mice. *Biol. Pharm. Bull.* 16, 762
- Iuvone, T., Capasso, A., D'Acquisto, F., Carnuccio, R. (1995). Opioids inhibit the induction of nitric oxide synthase in J774 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 212:3 975-80
- Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayami, S., Nakanishi, S., and Numa, S. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature (London)* 298, 245-249
- Kaldjian, E.P., Chen, G.H., Cease, K.B. (1992) Enhancement of lymphocyte proliferation assays by use of serum-free medium. *J Immunol Methods* 147: 189-195
- Kampa, M., Loukas, S., Hatzoglou, A., Martin, P.M. and Castanas, E. (1996). Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human α S1 casein (α S1-casomorphin, and α S1-casomorphin amide), *Biochem J.*, 319, 903
- Kent Teague, T., Hilderman, D., Kedl, R.M., Mitchell, T., Rees, W., Schaefer, B.C., Bender, J., Kappler, J., Marrack, P. (1999). Activation changes the spectrum but not the diversity of genes expressed by T cells. *PNAS* 96(22):12691-12696
- Kowalski, J. (1998). Augmenting effect of opioids on nitrite production by stimulated murine macrophages. *Neuropeptides* 32:3 287-91
- Kraut, R.P., Greenberg, A.H. (1986). Effects of endogenous and exogenous opioids on splenic natural killer cell activity. *Nat Immun Cell Growth Regul* 5:1 28-40
- Lang, M.E., Jourd'Heuil, D., Meddings, J.B., Swain, M.G. (1995). Increased opioid binding to peripheral white blood cells in a rat model of acute cholestasis. *Gastroenterology*, 108, 1479-1486

- Lissoni, P., Mandala, M., Brivio, F. (2000). Abrogation of the negative influence of opioids on IL-2 immunotherapy of renal cancer by melatonin. *Eur Urol* 38(1):115-8
- Loew, G.H. (1999). Molecular modeling of opioids analgesics. *Modern drug discovery* 2(6)24-26
- Lysle, D.T.; Coussons, M.E.; Watts, V.J.; Bennet, E.H.; Dykstra, L.A. (1993). Morphine-induced alterations of immune status: dose dependency, compartment specificity and antagonism by naltrexone. *J Pharmacol Exp Ther* 265: 1071-1078
- Mackaness, G.B. (1962). Cellular resistance to infection. *J Exp Med* 116: 381-407
- Maneckjee, R., Biswas, R., Vonderhaar, B.K. (1990a). Binding of opioids to human MCF-7 breast cancer cells and their effects on growth. *Cancer Research* 50:8 2234-2238
- Maneckjee, R. and Minna, J.D. (1990b). Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 3294
- Martin, W. (1983). Pharmacology of opioids. *Pharmacol Rev Dec*; 35(4):283-323
- McCarthy, L., Wetze, I M., Sliker, J.K., Eisenstein, T.K., Rogers, T.J. (2001). Opioid, opioids receptors and the immune response. *Drug Alcohol Depend* 1;62(2):111-123
- Mehrishi, J.N.; and Mills, I.H. 1983. Opiate receptors on lymphocytes and platelets in man. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 27, 240
- Meltzer, M.S., Ruco, L.P., Boraschi, D., Nacy, C.A. (1979). Macrophage activation for tumor cytotoxicity: analysis of intermediary reactions. *J. Reticuloendothel. Soc* 26:403-415
- Miller, A.H., Spencer, R.L., Pearce, B.D., Pisell, T.L., Azrieli, Y., Tanapat, P., Moday, H., Rhee, R., McEwen, B.S. (1998). Glucocorticoid receptors are differentially expressed in the cells and tissues of the immune system. *Cell. Immunol.* 186, 45-54.

- Morgan, D., Cook, C.D., Picker M.J. (1999). Sensitivity to the Discriminative Stimulus and Antinociceptive Effects of μ Opioids: Role of Strain of Rat, Stimulus Intensity, and Intrinsic Efficacy at the m Opioid Receptor. *J Pharm Exp Ther* 289:965–975
- Munck, A., Guyre, P.M., and Holbrook, N.J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr.Rev.* 5, 25-44.
- Murgo A.J., Faith, R.E. and Plotnikoff, N.P. (1999). Neuropeptides, cytokines, and cancer, interrelationships. In *Cytokines, Stress and Immunity*. Edited by Plotnikoff, N.P., Faith, R.E., Murgo, A.J., Good, R.A. CRC Press LLC. U.S.
- Nakanishi, S., Inour, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang A.C. Y., Sohen, S.N., and Numa, S. (1979). Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-B-LPH precursor. *Nature (London)* 278, 423-427
- Nathan, C. and Hibbs Jr. J.B. (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3:65-70
- Nathan, C.F. and Gabay, J. Antimicrobial mechanisms of macrophages. (1992) *In: Mononuclear phagocytes*, R. van Furth (ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London, p. 259-267
- Negus, S.S., Gatch, M.B., Mello, N.K., Zhang, X., and Rice K. (1998) Behavioral effects of the delta-selective opioid agonist SNC80 and related compounds in rhesus monkey. *J of Pharm Exp Ther* 286:1 362-375
- Nestler, E.J. 1997. Molecular mechanisms underlying opiate addiction: Implications for medications development. *Seminars in Neuroscience* 9, 84-93
- Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S., Nakanishi, S., and Numa, S. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal pre-proenkephalin. *Nature (London)* 295, 202-206

- Norbiato, G., Bevilacqua, M., and Vago, T. (1997). Glucocorticoids and the immune system in AIDS. *Psychoneuroendocrinology* 22 Suppl 1, S19-S25
- Norbiato, G., Bevilacqua, M., Vago, T., and Clerici, M. (1998). Glucocorticoid resistance and the immune function in the immunodeficiency syndrome. *Ann. NY Acad. Sci.* 840, 835-845.
- Nowak, J.E., Gomez-Flores, R., Calderón, S.N., Rice, K.C., Weber, R.J. (1998). Rat Natural Cell, T Cell and macrophage functions after intracerebroventricular injection of SNC80. *J of Pharmacol Exp Ther* 286: 931-937
- Owens, M.J., and Nemeroff, C.B. (1991). Physiology and pharmacology of corticotrophin releasing factor. *Pharmacol. Rev.* 43, 425-473.
- Pacifici, R., Di Carlo, S., Bacosi, A., Zuccaro, P. (1993). Macrophage functions in drugs of abuse-treated mice. *Int. J. Immunopharmacol* 15, 711-716
- Pacifici, R., Patrini, G., Venier, I., Parolaro, D., Zuccaro, P., and Gori, E. (1994). Effect of morphine and methadone acute treatment on immunological activity in mice: pharmacokinetic and pharmacodynamics correlates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269, 1112-1116
- Page, G., Ben-Elihayu, S., Yirmiya, R., Liebeskind, J. (1993) Morphine attenuates surgery induced enhancement of metastatic colonization in rats. *Pain* 54, 21
- Panagiotou, S., Bakogeorgou, E., Papakonstanti, E., Hatzoglou, A., Wallet, F., Dussert, C., Stournaras, C., Martin, P.M., Castanas, E. (1999) Opioid agonists modify breast cancer cell proliferation by blocking cells to the G2/M phase of the cycle: involvement of cytoskeletal elements. *J Cell Biochem* May 1;73(2):204-11
- Prant, M., Parant, F., Vinit, M.A., and Chedid, L. (1987). Protective effect of tumour necrosis factor (TNF) obtained by genetic recombination against experimental bacterial or fungal infection. *C.R. Acad Sci III.* 304:1-4
- Patrini, G., Massi, P., Ricevuti, G., Mazzone, A., Fossati, G., Mazzucchelli, I., Gori, E., Parolaro, D. (1996). Changes in opioid receptor density on

- murine splenocytes induced by in vivo treatment with morphine and methadone. *J Pharmacol Exp Ther* 279, 172-176
- Payan, D.G., McGillis, J.P., Renold, F.K., Mitsuhashi, M., and Goetzl, E.J. (1987). Neuropeptide modulation of leukocyte function. *Ann. NY Acad. of Sci.* 496, 182-191.
- Peng, X., Mosser, D.M., Adler, M.W., Rogers, T.J., Meissler, J.J., Eisenstein, T.K. (2000). Morphine enhances interleukin-12 and the production of other pro-inflammatory cytokines in mouse peritoneal macrophages. *J Leuk Bio*, 68: Nov 2000
- Portoghese, P.S. 1993. The design of delta-selective opioid receptor antagonists. *II Farmaco*, 48:243
- Pruett, S.B., Han Y.C., Fuchs, B.A. (1992). Morphine suppresses primary humoral immune responses by a predominantly indirect mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 262:3 923-8
- Raybor, K., Kong, H., Chen, Y., Yasuda, K., Yu, L., Bell, G.I., Reisine, T. (1994). Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* Feb; 45(2):330-4
- Rege, A.A., Hueng, K. and Aggarwal, B.B. (1992). Tumor necrosis factor. *In: Cytokine therapy*, D.W. Galvani and J.C. Cawley (eds). Cambridge University Press, Great Britain, p. 152-176
- Reisine, T., Bell, G.I. (1993). Molecular biology of opioid receptors. *Trends Neurosci* Dec; 16(12): 506-10
- Reisine, T., Pasternak, G. (1996). Analgésicos Opioides y sus antagonistas. Capítulo 23. De Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Novena edición. Vol.1. Editores en jefe Hardman, J.G.; Limbird, L.E. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México.
- Reubi, J.C. (1985). Central nervous system-mediated growth inhibition of a rat prostate carcinoma by an opioid. *J. Endocrinol.* 107, 247
- Riley, M.E., Ananthan, S., Weber, R.J. 1998. Novel Non-peptidic opioid compounds with immunopotentiating effects. *Adv Exp Med Biol* 437:183-188

- Rojas, M. (1986). *Inmunología general*. Editorial Limusa México.
- Rojavin, M., Szabo, I., Bussiere, J.L., Rogers, T.J., Adler, M.W. & Eisenstein, T.K. (1993). Morphine treatment in vitro or in vivo decreases phagocytic functions of murine macrophages. *Life Sci*, 53, 997-1006
- Rouveix, B. (1992) Opiates and immune function. Consequences on infectious diseases with special reference to AIDS. *Therapie* 47:6 503-12
- Roy, S., Loh, H.H., Barke, R.S. (1995). Morphine-induced suppression of thymocyte proliferation is mediated by inhibition of IL-2 synthesis. *Adv Exp Med Biol*, 373:41-8
- Scott, M.; Carr, D.J. (1996). Morphine suppresses the alloantigen-driven CTL response in a dose-dependent and naltrexone reversible manner. *J Pharmacol Exp Ther* Aug; 278(2):980-8
- Schneider, G.M., and Lyle, D.T. (1996). Evidence for the involvement of CNS in the modulation of splenic nitric oxide production. *J Neuroimmunol* 69, 36-38
- Schurr, A., Rigor, B.M., Ho, B.T., Dafny, N. (1981). Periaqueductal gray neurons response to microiontophoretically injected morphine in naive and morphine-dependent rats. *Brain Res Bull* Jun;6(6):437-8
- Sedqi, M., Roy, S., Ramakrishnan, S., Elde, R., Loh, H.H. (1995). Complementary DNA cloning of a mu-opioid receptor from rat peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 209, 563-572
- Sergeeva, M.G., Grishina, Z.V., Varfolomoyev, S.D. (1993). Morphine effect on proliferation of normal and tumor cells of immune origin. *Immunol Lett* 36(2):215-8
- Shavit Y., Terman G.W., Martin, F.A., Lewis J.W., Liebeskind, J.C., Gale, R.P. 1985. Stress, opioid peptides, the immune system, and cancer. *The J Immun* 135:2
- Sibinga, N.E., Goldstein, A. (1988). Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system. *Ann Rev Immunol*, 6, 219-249

- Singh, P., Owlia, A., Varro, A., Dai, B., Rajamaran, S., and Wood, T. (1996). Gastrin gene expression is required for the proliferation and tumorigenicity of human colon cancer cells. *Cancer Res.* 56, 4111
- Singhal, P.C., Kapasi, A.A., Reddy, K., Franki, N., Gibbons, N., Ding, G. J. (1999) Morphine promotes apoptosis in Jurkat cells. *J Leukoc Biol* Oct;66(4):650-8
- Solomon, H.S. 1996. Drugs and the brain. Scientific American Library. New Yor. U.S.A.
- Stefano, G.B., Digenis, A., Spector, S., Leung, M.K., Bilfinger, T., Makman, M.H., Scharrer, B., and Abumrad, N.N. 1993. Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11099
- Steigbigel, R.T., Lambert, L.H., and Remington, J.S. (1974). Phagocytic and bactericidal properties of normal human monocytes. *J Clin Invest* 53: 131-142
- Stuehr, D.J. and Marletta, M.A. (1985). Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 82:7738-7742
- Sueoka, E., Sueoka, N., Kai, Y., Okabe, S., Sukanuma, M., Kanematsu, K., Yamamoto, T., Fujiki, H. (1998) Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative, KT-90, mediated through apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun* Nov 27;252(3):566-70
- Suo, J.L., Weber, R.J. (1998). Immunomodulation mediated by microinjection of morphine into the periaqueductal gray matter of the mesencephalon. *Adv Exp Med Biol* 437:177-82
- Szabo, I., Rojavin, M., Bussiere, J.L., Eisenstein, T.K., Adler, M.W., y Rogers, T.J. (1993). Suppression of peritoneal macrophages phagocytosis of *Candida albicans* by opioids. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 267, 703-706

- Tanaka, J. Fujita H. Matsuda S. Toku K. Sakanaka M. Maeda N. (1997).
Glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors in microglial cells: the two
receptors mediate differential effects of corticosteroids. *Glia* 20, 23-37.
- Thomas, G.E., Szucs, M., Mamone, J.Y., Bem, W.T., Rush, M.D., Johnson,
F.E., and Coscia, C.J. (1990) Sigma and opioid receptors in human
brain tumours. *Life Sci*, 46, 1279
- Tubaro, E., Borelli, G., Croce. C., Cavallo, G., Santiangeli, C. (1983). Effect of
morphine on resistance to infection. *J Infec Dis* 148, 656-666
- Ueki, T., Koji, T., Tamiya, S., Nakane, P.K. and Tsuneyoshi, M. (1996).
Expression of basic fibroblast growth factor receptor in advanced
gastric carcinoma. *J Pathol*, 177, 353
- Vacchio, M.S., Ashwell, J.D., and King, L.B. (1998). A positive role for thymus-
derived steroids in formation of the T-cell repertoire. *Ann. NY Acad. Sci.*
840, 317-337.
- Valenta, D.C., Downing, J.E., and Role, L.W. (1993). Peptide modulation of ACh
receptor desensitization controls neurotransmitter release from chicken
sympathetic neurons. *J. Neurophysiol.* 69, 928-942.
- Van Furth, R. (1992). Production and migration of monocytes and kinetics of
macrophages. In: Mononuclear phagocytes, R. Van Furth (ed.).
Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London, p.3-12
- Villarejo-Diaz, M., Murillo-Zaragoza, J.R., Alvarado-Hernández, H. (2000).
Farmacología de los agonistas y antagonistas de los receptores
opioides. *Educación en Investigación Clínica* 1: 106-137
- Weber, R.J. and Pert, A. (1989) The periaqueductal gray matter mediates
opiate induced immunosuppression. *Science* 245(4914):188-90
- Webster, E.L., Tracey, D.E., Jutila, M.A., Wolfe, S.A., Jr., and De Souza, E.B.
(1990). Corticotropin-releasing factor receptors in mouse spleen:
identification of receptor-bearing cells as resident macrophages.
Endocrinology 127, 440-452.
- Wells, J.L., Bartlett, J.L., Ananthan, S., Bilsky, E.J. (2001) In Vivo
pharmacological characterization of SoRI 9409, a nonpeptidic opioid μ -

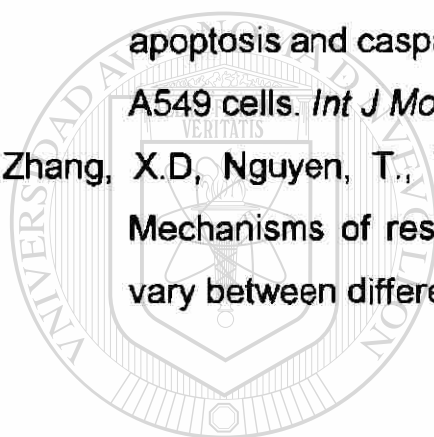
agonist/ δ -antagonist that produces limited antinociceptive tolerance and Attenuates Morphine Physical Dependence. *J Phar Exp Ther* 297:597–605

Wick, M.J., Minerath, S.R., Roy, S., Ramakrishnan, S., and Loh, H.H. 1995. Expression of alternate forms of brain opioid 'orphan' receptor mRNA in activated human peripheral blood lymphocytes and lymphocytic cell lines. *Mol. Brain Res.* 32, 342

Wild K.D., McCormick J., Bilsky E.J., Vanderah T., McNutt R.W., Chang K.J. and Porreca F. (1993) Antinociceptive actions of BW373U86 in mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 267: 858-865

Yoshida, A., Tokuyama, S., Iwamura, T., Ueda. (2000) Opioid analgesic-induced apoptosis and caspase-independent cell death in human lung carcinoma A549 cells. *Int J Mol Med Sep*;6(3):329-35

Zhang, X.D, Nguyen, T., Thomas, W.D., Sanders, J.E., Hersey, P. (2000). Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types. *FEBS Lett* 482:193-1999

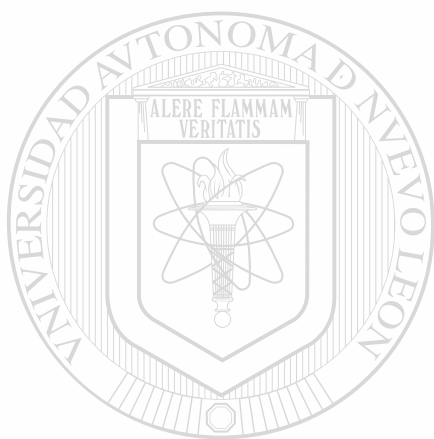


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



