

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POST-GRADO
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



**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
.02
C3
2002
c.1



1080124327

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA E INMUNOPATOLOGÍA
LABORATORIO DE INMUNOPATOLOGÍA Y VIROLOGÍA



EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS AGONISTAS NO PEPTIDICOS
DEL TIPO DELTA EN LAS FUNCIONES INMUNOLOGICAS
MACROFAGICAS EN EL HOMBRE Y RATA, Y SUS EFECTOS
ANTITUMORALES EN CONTRA DE LINEAS MIELOIDES Y LINFOCITOS

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

DIANA ELIA CABALLERO HERNÁNDEZ

AGOSTO DE 2011

TM

QP921

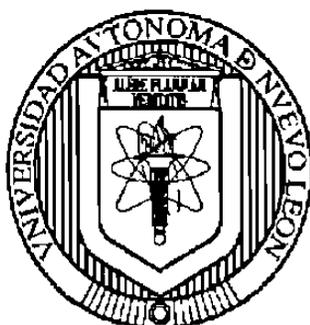
.02

C3

2002



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.

Handwritten signature of Dr. Reyes S. Tamez Guerra in black ink.

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Presidente

Handwritten signature of Dr. Ricardo A. Gómez Flores in black ink.

Dr. Ricardo A. Gómez Flores
Secretario

Handwritten signature of Dr. Patricia Tamez Guerra in black ink.

Dr. Patricia Tamez Guerra
Vocal

Handwritten signature of Dr. Juan Manuel Alcocer Gonzalez in black ink.

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.

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.

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 | proopiomelacorticon |
| 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 |

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 |

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.