

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-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); 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-diethyl-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.

<i>Compuesto</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>Solución vehículo</i>	<i>Molaridad</i>
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

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.

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} . Las 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.

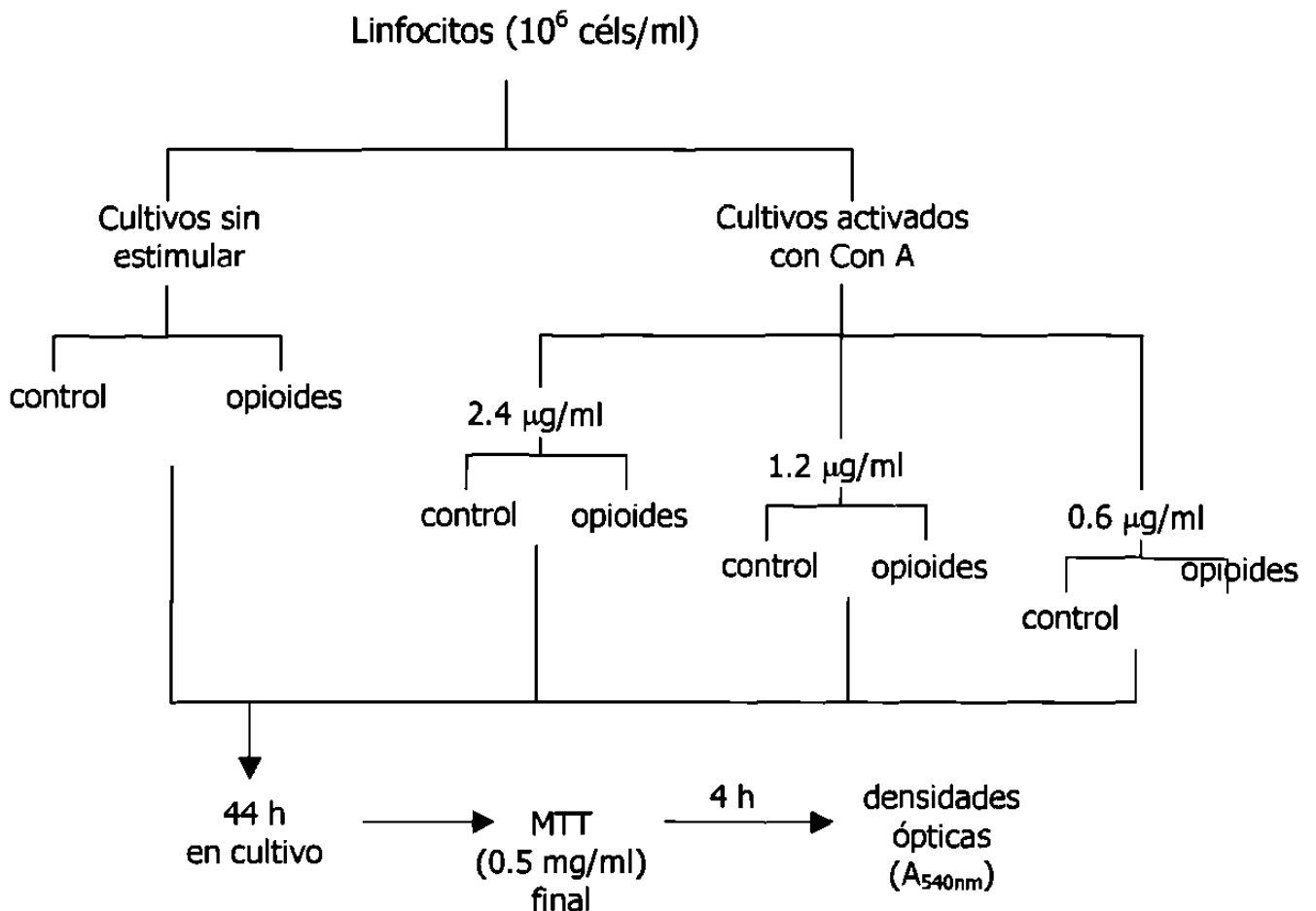
6. RESULTADOS

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.

Protocolo experimental 1



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).

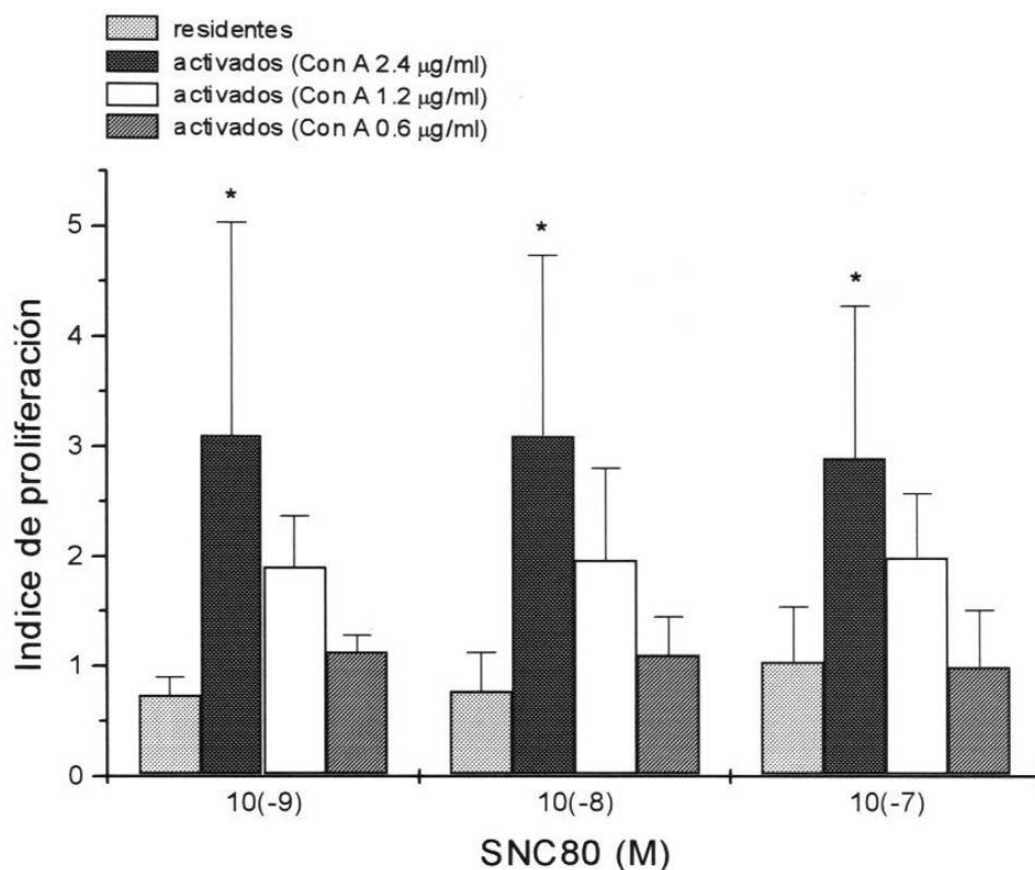


Figura 15. Efecto del SNC80 sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos de timo de rata. Después de matar al animal por asfixia con CO₂, el timo se removió inmediatamente. Se prepararon suspensiones unicelulares al disgregar el timo en medio RPMI 1640, las células finales se resuspendieron y ajustaron 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

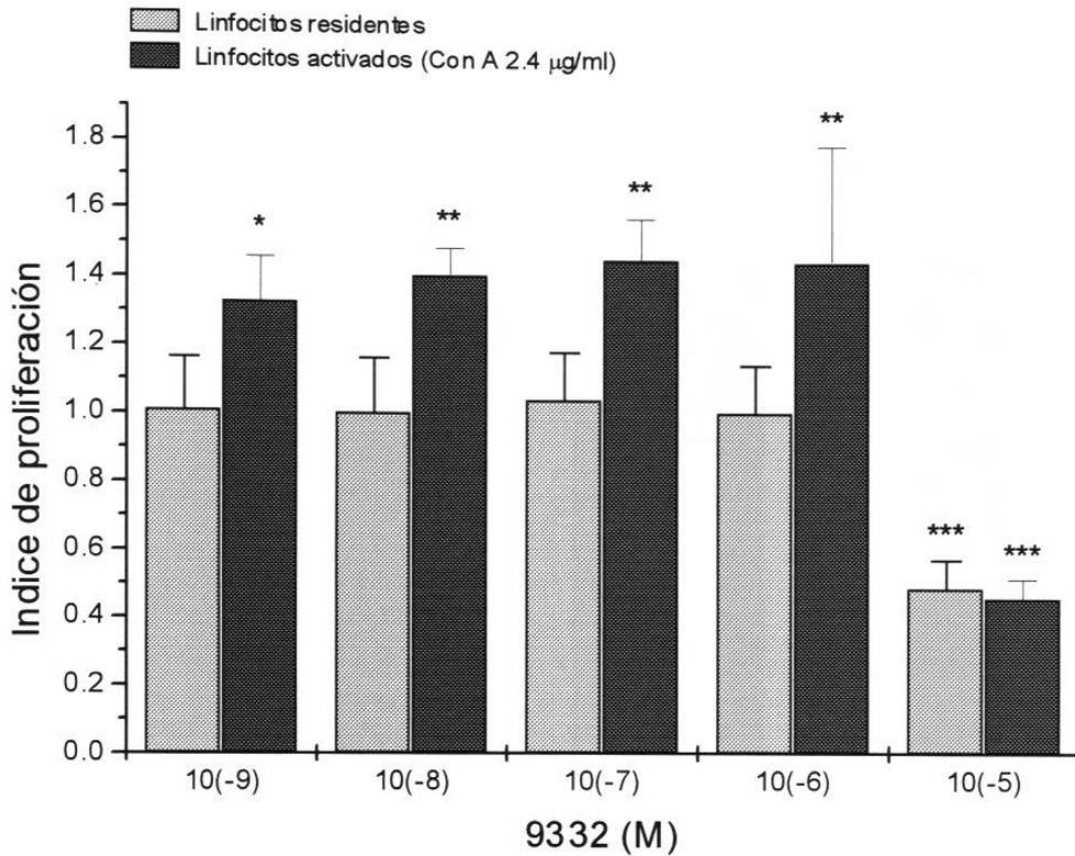


Figura 16. Efecto del 9332 sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos de timo de rata. Después de matar al animal por asfixia con CO₂, el timo se removió inmediatamente. Se prepararon suspensiones unicelulares al disgregar el timo en medio RPMI 1640, las células finales se resuspendieron y ajustaron 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

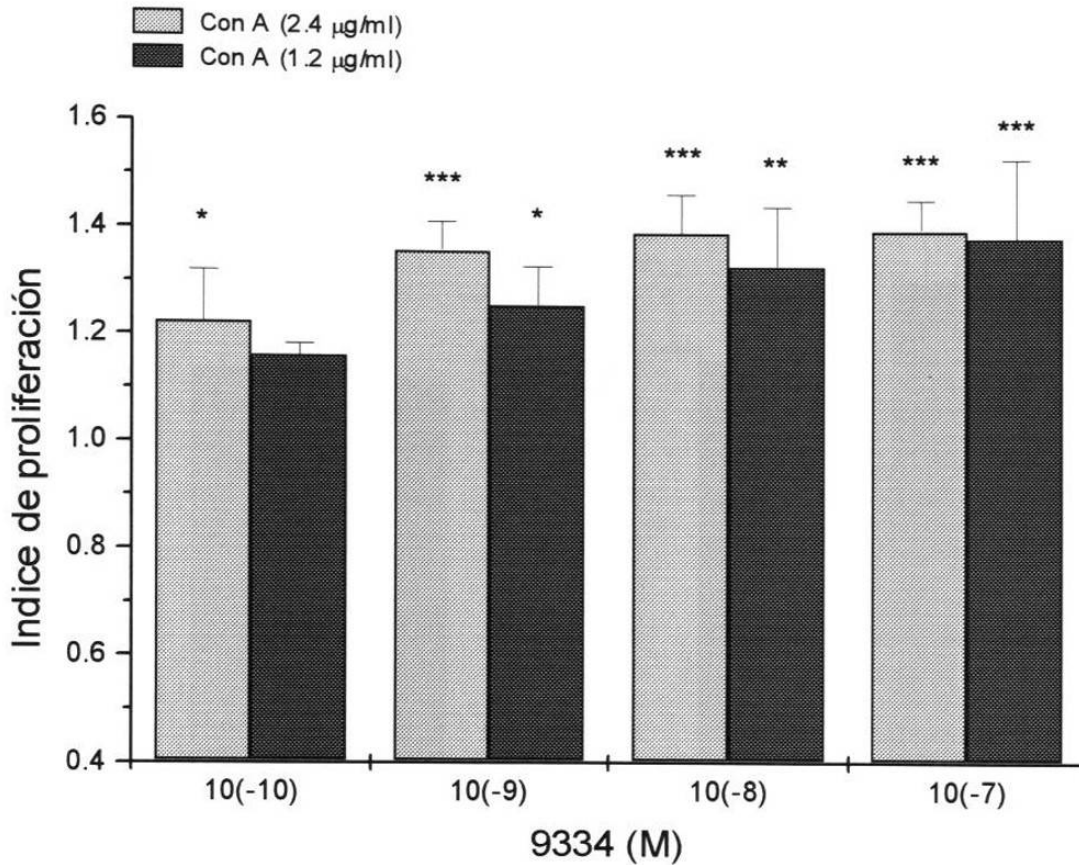


Figura 17. Efecto del 9334 sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos de timo de rata.

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

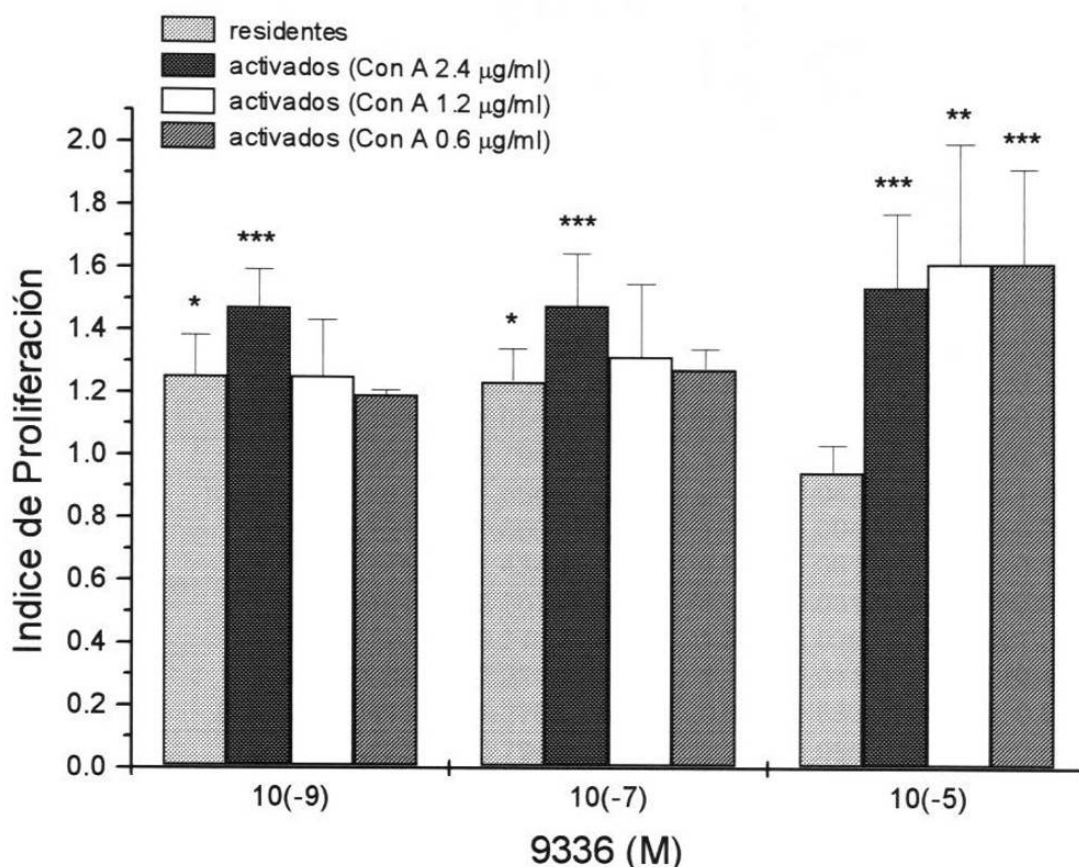


Figura 18. Efecto del 9336 sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos de timo de rata. Después de matar al animal por asfixia con CO₂, el timo se removió inmediatamente. Se prepararon suspensiones unicelulares al disgregar el timo en medio RPMI 1640, las células finales se resuspendieron y ajustaron 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 ($\mu\text{g/ml}$)	E1 ^b	E2 ^b	E3 ^b	Índice de proliferación ^c
control (D.O.) ^d	---	0.010 \pm 0.004	0.013 \pm 0.010	0.380 \pm 0.001	
	2.4	0.091 \pm 0.008	0.042 \pm 0.021	0.451 \pm 0.001	
	1.2	0.088 \pm 0.022	0.435 \pm 0.153	0.855 \pm 0.006	
	0.6	0.023 \pm 0.008	0.117 \pm 0.015	0.739 \pm 0.011	
10 ⁻¹¹	---	0.258 \pm 0.140	1.256 \pm 0.067	1.207 \pm 0.010	1.271 \pm 0.303
	2.4	0.695 \pm 0.079	5.070 \pm 4.438	1.638 \pm 0.018	2.186 \pm 1.442
	1.2	0.366 \pm 0.125	1.201 \pm 0.489	0.913 \pm 0.018	0.844 \pm 0.248
	0.6	0.281 \pm 0.134	0.872 \pm 0.076	1.013 \pm 0.012	0.705 \pm 0.213
10 ⁻¹⁰	---	1.225 \pm 0.741	1.179 \pm 0.402	1.259 \pm 0.048	1.133 \pm 0.070
	2.4	0.915 \pm 0.259	2.023 \pm 0.737	1.925 \pm 0.153	1.263 \pm 0.380
	1.2	0.864 \pm 0.139	1.882 \pm 0.105	0.852 \pm 0.008	1.222 \pm 0.330
	0.6	1.295 \pm 0.332	1.056 \pm 0.206	0.871 \pm 0.062	1.110 \pm 0.095
10 ⁻⁹	---	1.322 \pm 0.264	0.794 \pm 0.067	1.174 \pm 0.029	1.034 \pm 0.154
	2.4	1.219 \pm 0.363	4.554 \pm 1.107	2.182 \pm 0.042	2.230 \pm 1.165 *
	1.2	1.641 \pm 0.128	1.866 \pm 0.328	1.060 \pm 0.004	1.466 \pm 0.294
	0.6	1.126 \pm 0.348	1.434 \pm 0.178	1.020 \pm 0.061	1.177 \pm 0.135
10 ⁻⁸	---	1.903 \pm 0.161	2.307 \pm 2.00	1.121 \pm 0.031	1.734 \pm 0.388
	2.4	1.963 \pm 0.123	5.273 \pm 0.481	1.343 \pm 0.039	2.708 \pm 1.319 *
	1.2	1.169 \pm 0.084	2.224 \pm 0.045	1.122 \pm 0.011	1.432 \pm 0.403
	0.6	0.957 \pm 0.418	1.278 \pm 0.300	0.987 \pm 0.033	1.080 \pm 0.099
10 ⁻⁷	---	2.838 \pm 2.135	0.794 \pm 0.168	1.257 \pm 0.056	1.555 \pm 0.645
	2.4	1.714 \pm 0.253	4.601 \pm 0.082	1.881 \pm 0.106	2.378 \pm 1.140 *
	1.2	1.520 \pm 0.445	2.068 \pm 0.128	1.202 \pm 0.019	1.505 \pm 0.329
	0.6	0.535 \pm 0.134	1.559 \pm 0.851	1.027 \pm 0.046	1.009 \pm 0.298
10 ⁻⁶	---	1.806 \pm 1.246	1.743 \pm 0.487	1.195 \pm 0.008	1.556 \pm 0.218
	2.4	1.194 \pm 0.457	2.179 \pm 0.529	1.632 \pm 0.019	1.333 \pm 0.453
	1.2	1.000 \pm 0.203	0.704 \pm 0.279	0.624 \pm 0.134	0.809 \pm 0.095
	0.6	0.478 \pm 0.149	0.491 \pm 0.194	0.870 \pm 0.002	0.606 \pm 0.121
10 ⁻⁵	---	1.225 \pm 0.987	0.717 \pm 0.295	1.112 \pm 0.007	1.556 \pm 0.146
	2.4	0.311 \pm 0.268	1.476 \pm 0.169	1.659 \pm 0.030	0.798 \pm 0.349
	1.2	0.381 \pm 0.111	0.153 \pm 0.071	0.806 \pm 0.005	0.338 \pm 0.097
	0.6	0.521 \pm 0.092	0.369 \pm 0.113	0.873 \pm 0.027	0.555 \pm 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 \pm el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones.

^c Representa la media \pm 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 timo 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

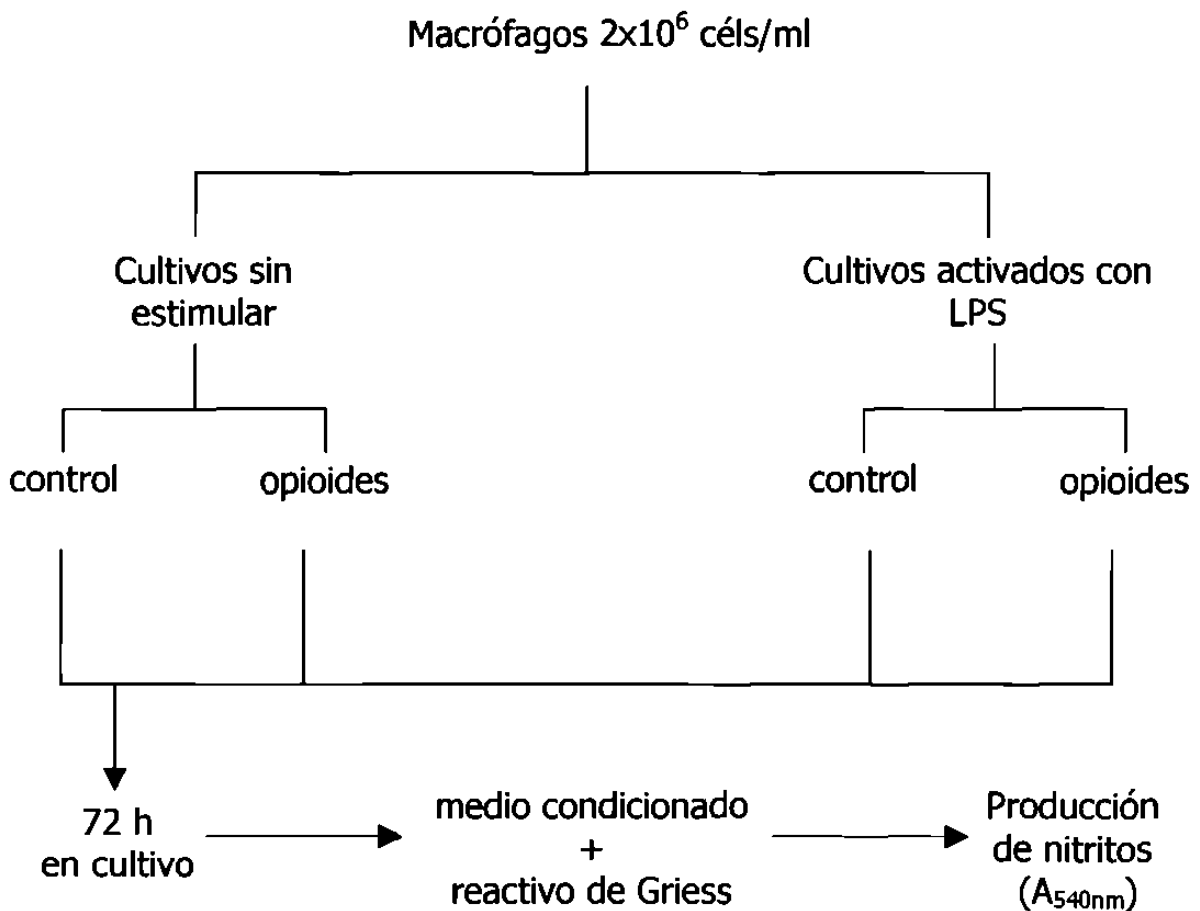
** p<0.01 comparado con el control no tratado

*** 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.

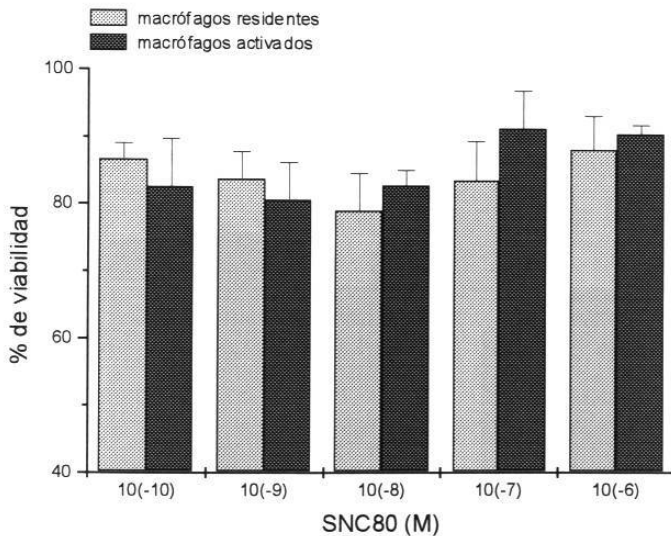
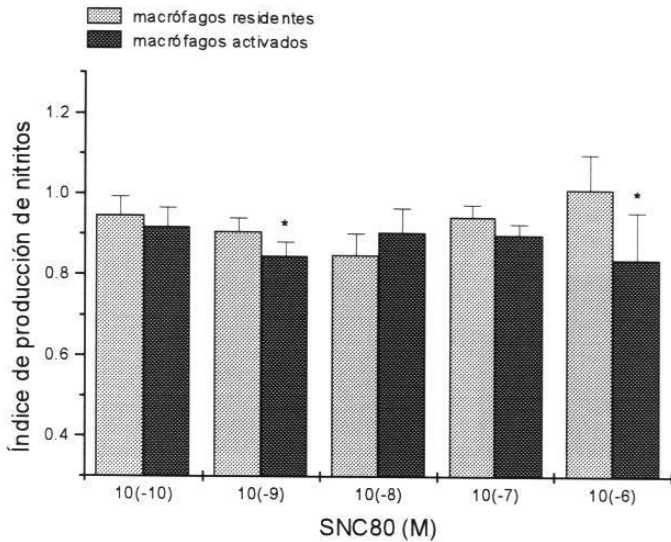


Figura 19. Efecto del SNC80 sobre la activación de macrófagos de rata.

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

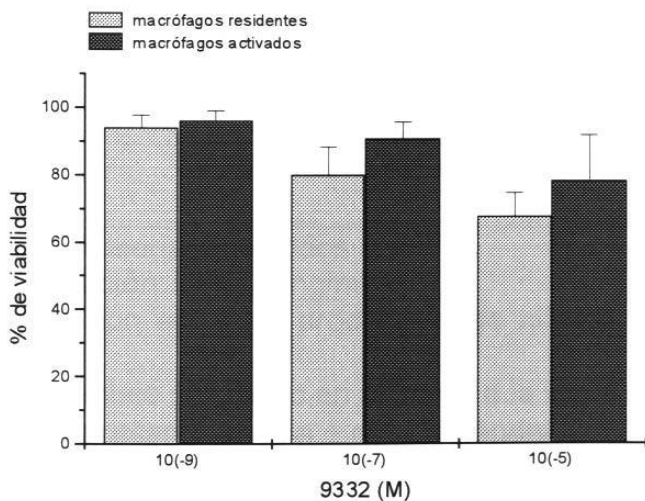
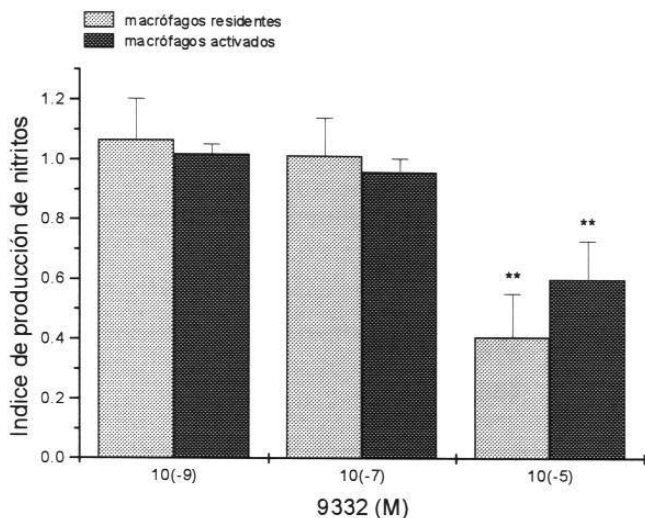


Figura 20. Efecto del opioide 9332 sobre la activación de macrófagos peritoneales de rata.

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.

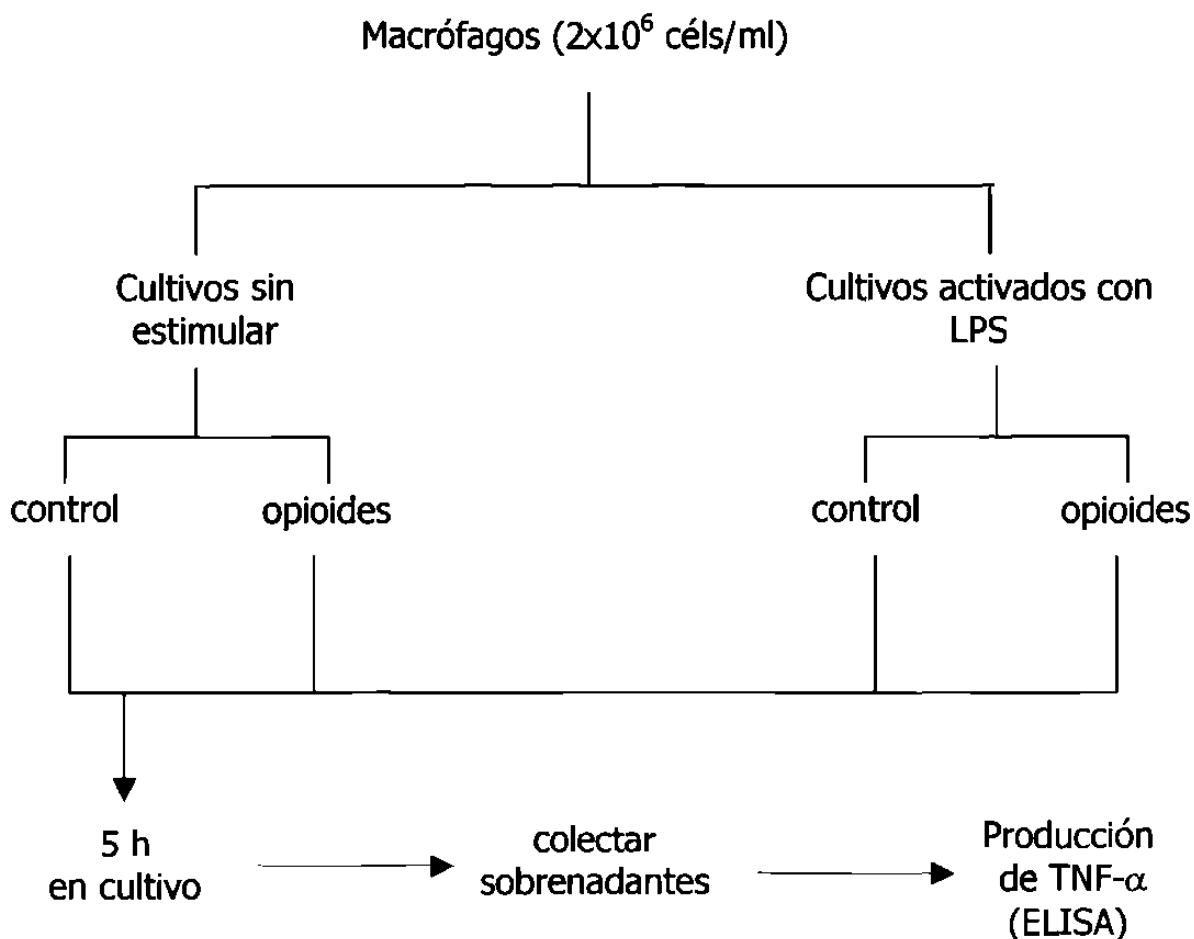
* p<0.05 comparado con el control no tratado

* 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	
	LPS	2362 \pm 946	895 \pm 48	1628 \pm 733	
10 ⁻¹¹	---	655 \pm 93	868 \pm 140	761 \pm 106	0.746
	LPS	2205 \pm 605	749 \pm 10	1476 \pm 728	0.885
10 ⁻⁹	---	636 \pm 201	921 \pm 72	778 \pm 142	0.754
	LPS	2463 \pm 68	921 \pm 72	1692 \pm 771	1.036
10 ⁻⁷	---	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 \pm 164	490 \pm 12	608 \pm 117	
	LPS	15120 \pm 343	310 \pm 29	911 \pm 600	
10 ⁻¹¹	---	752 \pm 80	464 \pm 9	608 \pm 144	0.991
	LPS	1254 \pm 378	913 \pm 99	1083 \pm 170	1.884
10 ⁻⁹	---	572 \pm 19	591 \pm 29	582 \pm 9	0.997
	LPS	1519 \pm 24	711 \pm 110	1115 \pm 404	1.646
10 ⁻⁷	---	595 \pm 26	516 \pm 176	555 \pm 39	0.936
	LPS	14635 \pm 77	512 \pm 51	988 \pm 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	
	LPS	1512±343	310±29	911±600	
10 ⁻¹¹	---	670±145	789±283	730±59	1.266
	LPS	1096±242	789±283	943±153	1.633
10 ⁻⁹	---	984±123	778±185	881±102	1.471
	LPS	1108±17	778±185	943±164	1.619
10 ⁻⁷	---	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).

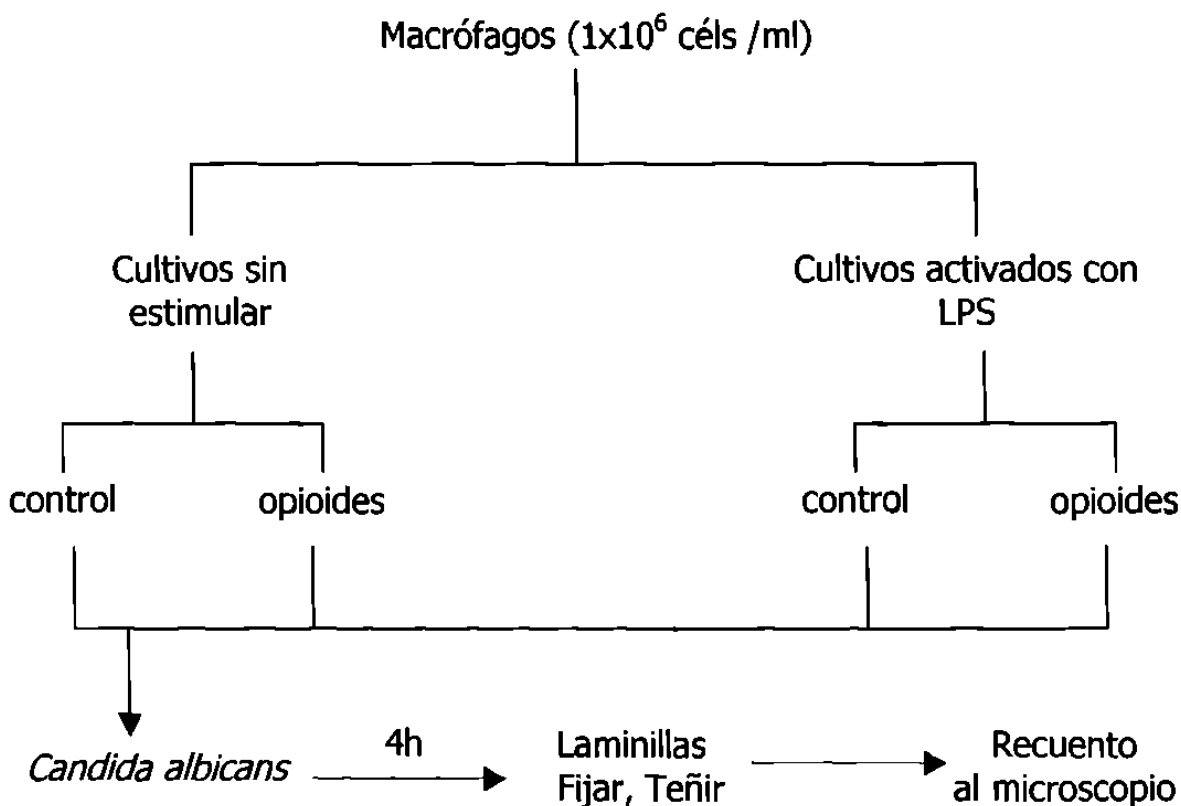
^d Representa la media \pm el error estándar de dos experimentos representativos.

^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

6.1.4 Fagocitosis de la levadura *Candida albicans* por macrófagos peritoneales de rata.

Se determinó el efecto de opioides no peptídicos sobre la capacidad fagocítica tanto de macrófagos residentes como de macrófagos activados con LPS, de acuerdo al esquema presentado a continuación (Protocolo experimental 4)

Protocolo Experimental 4



Ninguno de los opioides utilizados alteró los porcentajes de fagocitosis de *Candida albicans* por por macrófagos peritoneales (Tabla 4.1-4.5)

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

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

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

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

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

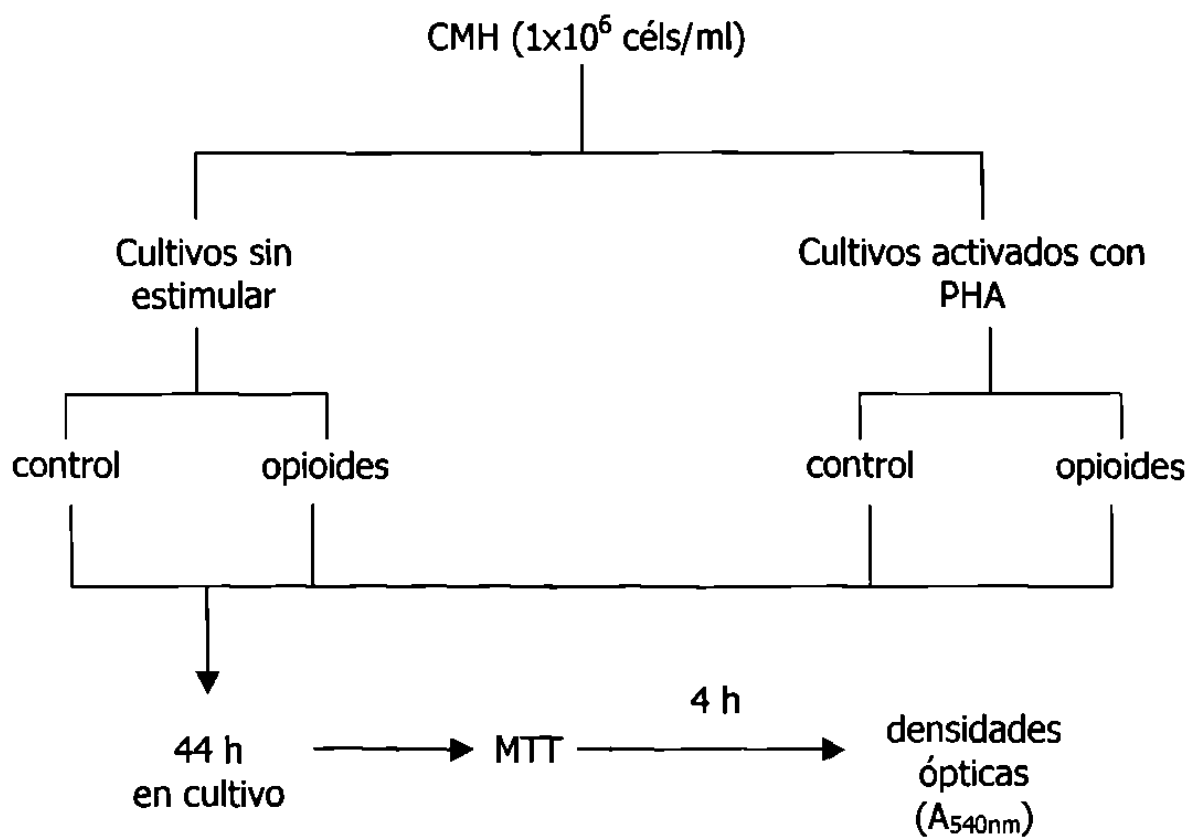
^c Representa la media ± el error estándar de un experimento representativo con 2 repeticiones

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).

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.

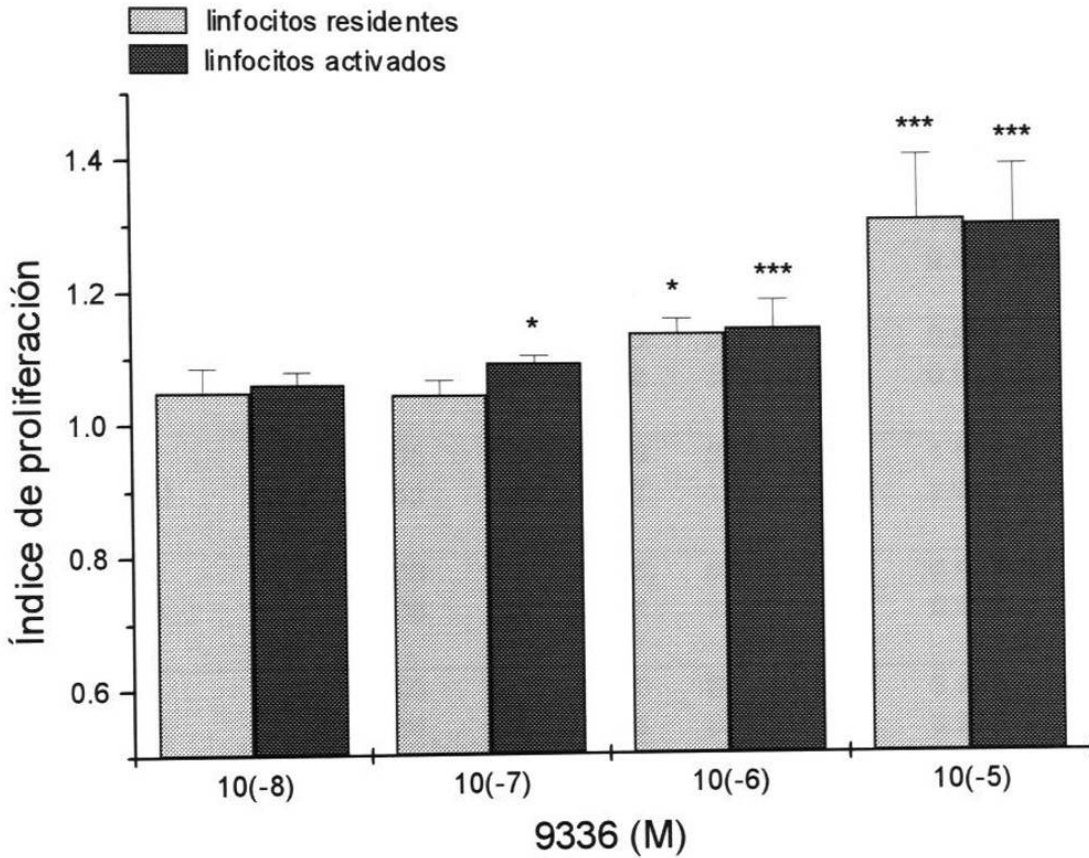


Figura 21. Efecto del 9336 sobre la proliferación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica humana.

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

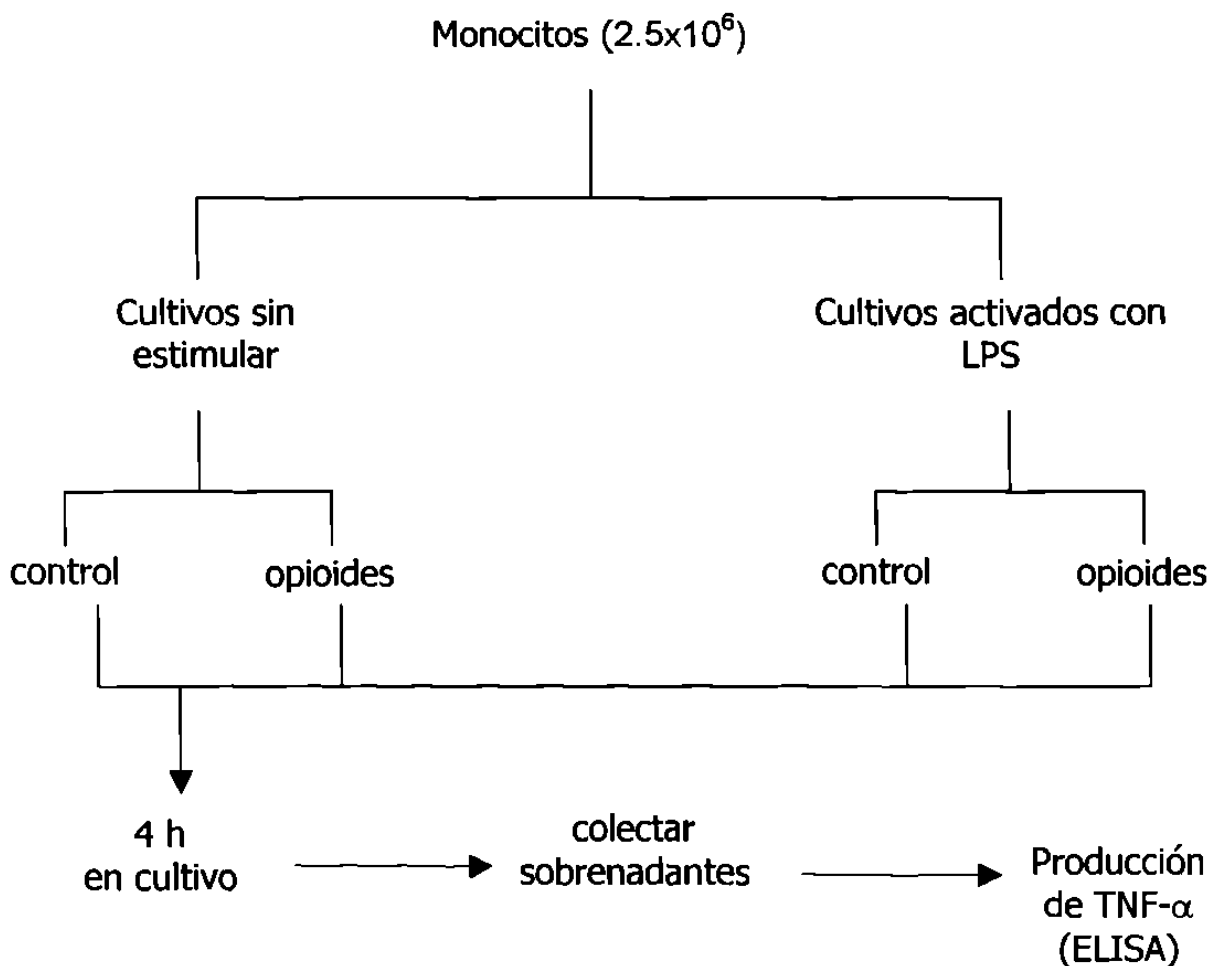
** p<0.01 comparado con el control no tratado

*** 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 μ 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 0814 respectivamente ($p<0.001$) (Figura 24 y Tabla 6.3).

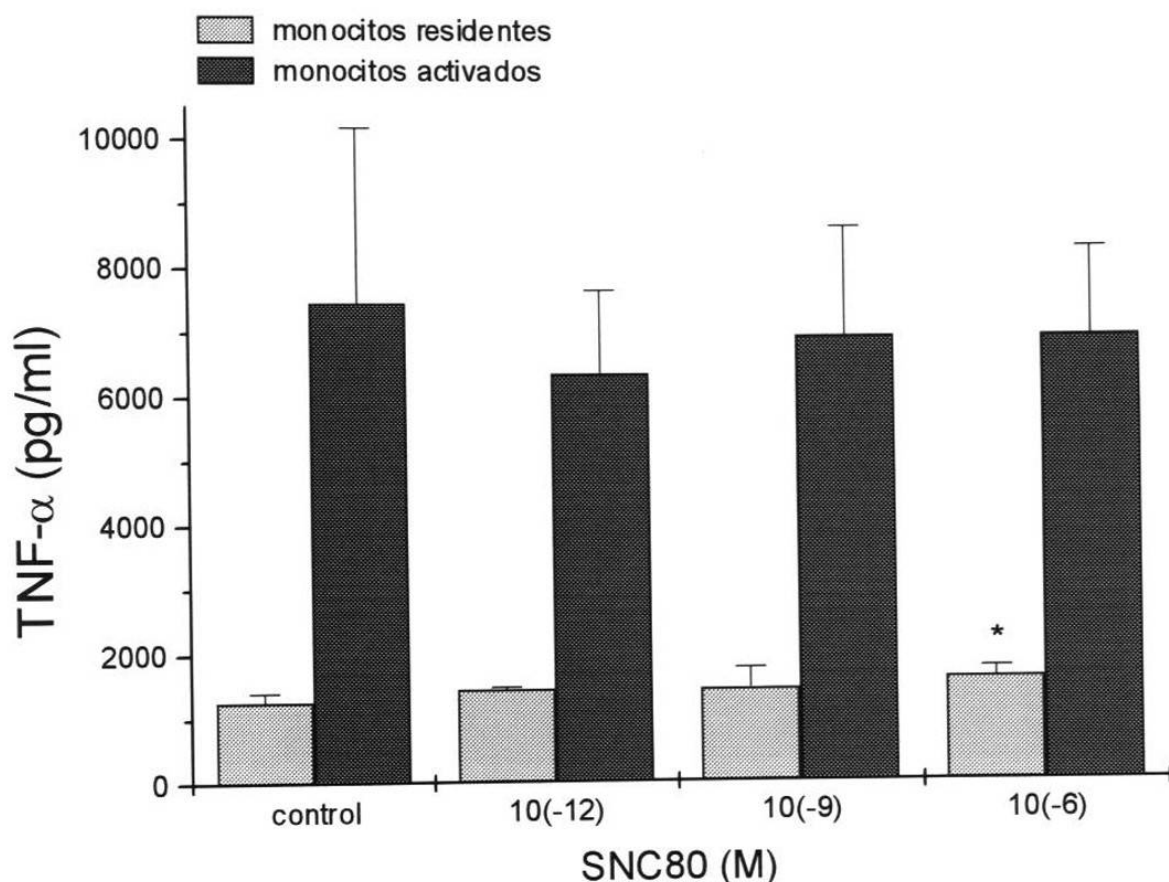


Figura 22. Efecto del SNC80 sobre la producción de TNF- α por monocitos humanos. Monocitos obtenidos a partir de sangre periférica humana se cultivaron en presencia de opioides durante 16h, después de lo cual se lavaron y se ajustaron en medio AIM-V o bien medio AIM-V con LPS (0.01 μ g/ml) a un volumen 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