

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

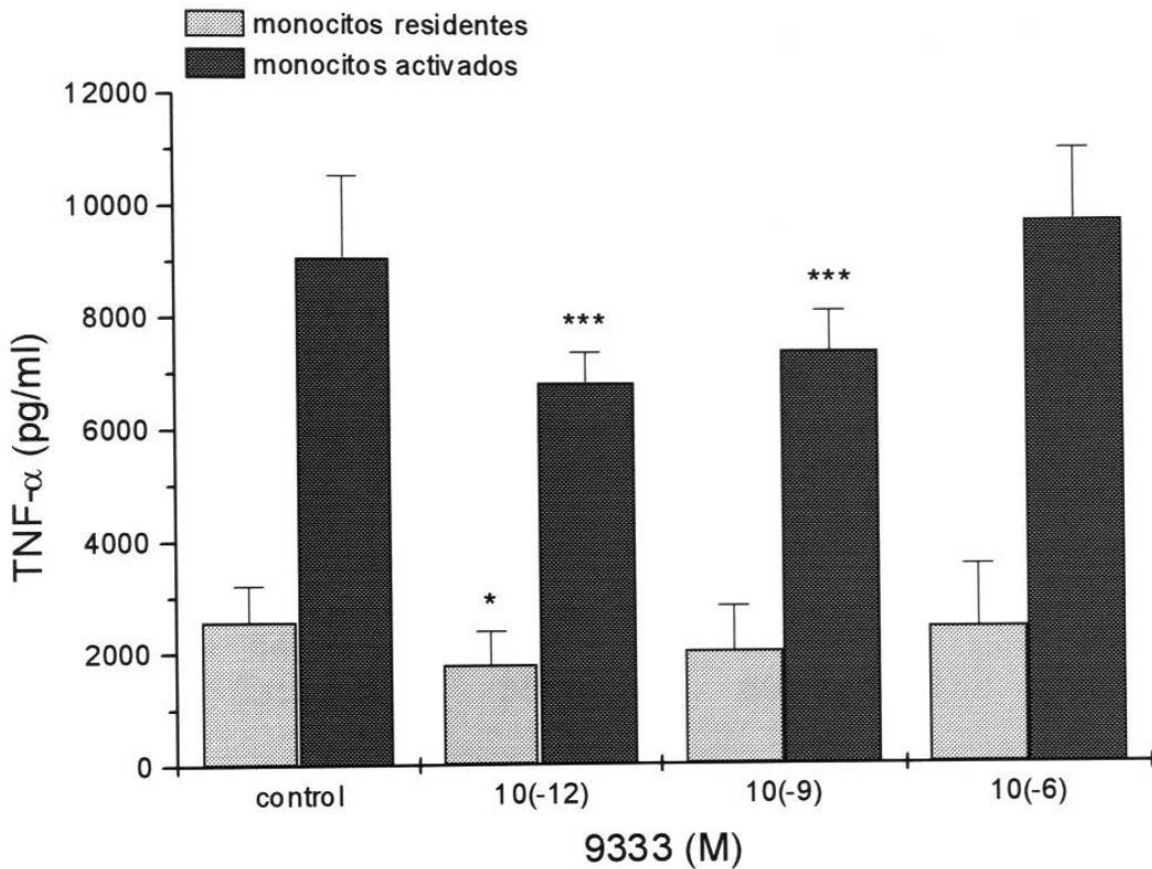


Figura 24. Efecto del 9333 sobre la producción de TNF- α por monocitos humanos. Monocitos obtenidos a partir de sangre periférica humana se cultivaron en presencia de opioides durante 16h, después de lo cual se lavaron y se ajustaron en medio AIM-V o bien medio AIM-V con LPS (0.01 μ g/ml) a un volumen 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	
	LPS	10542 \pm 181	7659 \pm 119	9100 \pm 1441	
10 ⁻¹²	---	1213 \pm 205	2397 \pm 42	1805 \pm 591	0.682 *
	LPS	7382 \pm 71	6337 \pm 59	6859 \pm 522	0.763 ***
10 ⁻⁹	---	1188 \pm 18	2850 \pm 109	2019 \pm 830	0.746
	LPS	8150 \pm 107	6677 \pm 94	7413 \pm 736	0.822 ***
10 ⁻⁶	---	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	
	LPS	10542 \pm 181	7659 \pm 119	9100 \pm 1441	
10 ⁻¹²	---	1528 \pm 285	2925 \pm 65	2227 \pm 698	0.845
	LPS	9170 \pm 48	8125 \pm 107	8647 \pm 522	0.965
10 ⁻⁹	---	1465 \pm 0	3177 \pm 44	2321 \pm 856	0.868
	LPS	8439 \pm 23	7306 \pm 95	7873 \pm 566	0.877
10 ⁻⁶	---	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).

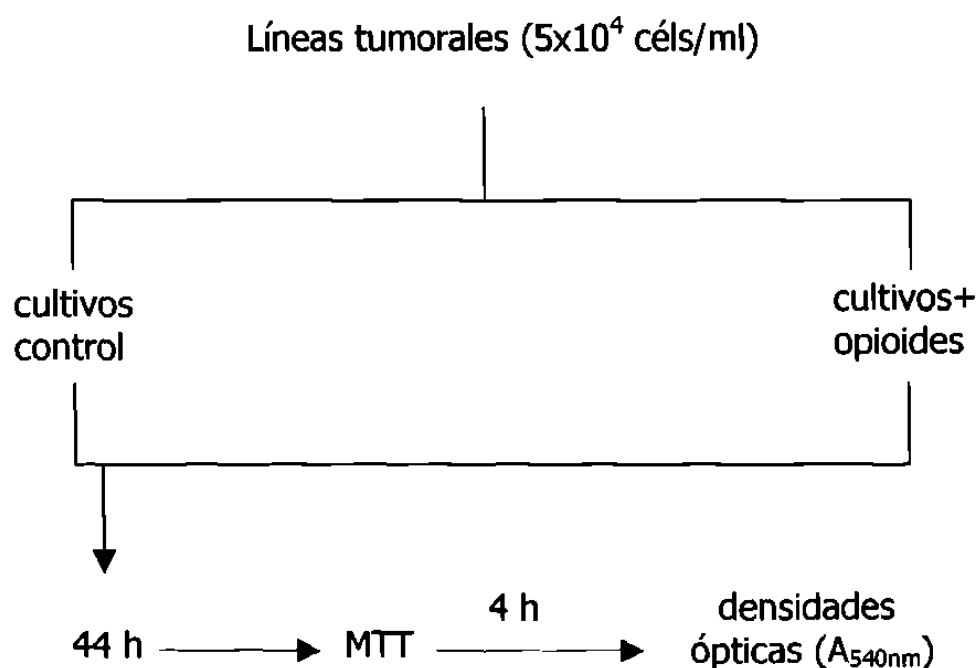
^{d,e} Representa la media \pm el error estándar de dos experimentos representativos.

^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 mas altas y mas bajas, con porcentajes de inhibición de 14-20% ($p < 0.01$) (Figura 26 y Tabla 7.1).

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 ($p < 0.01$).

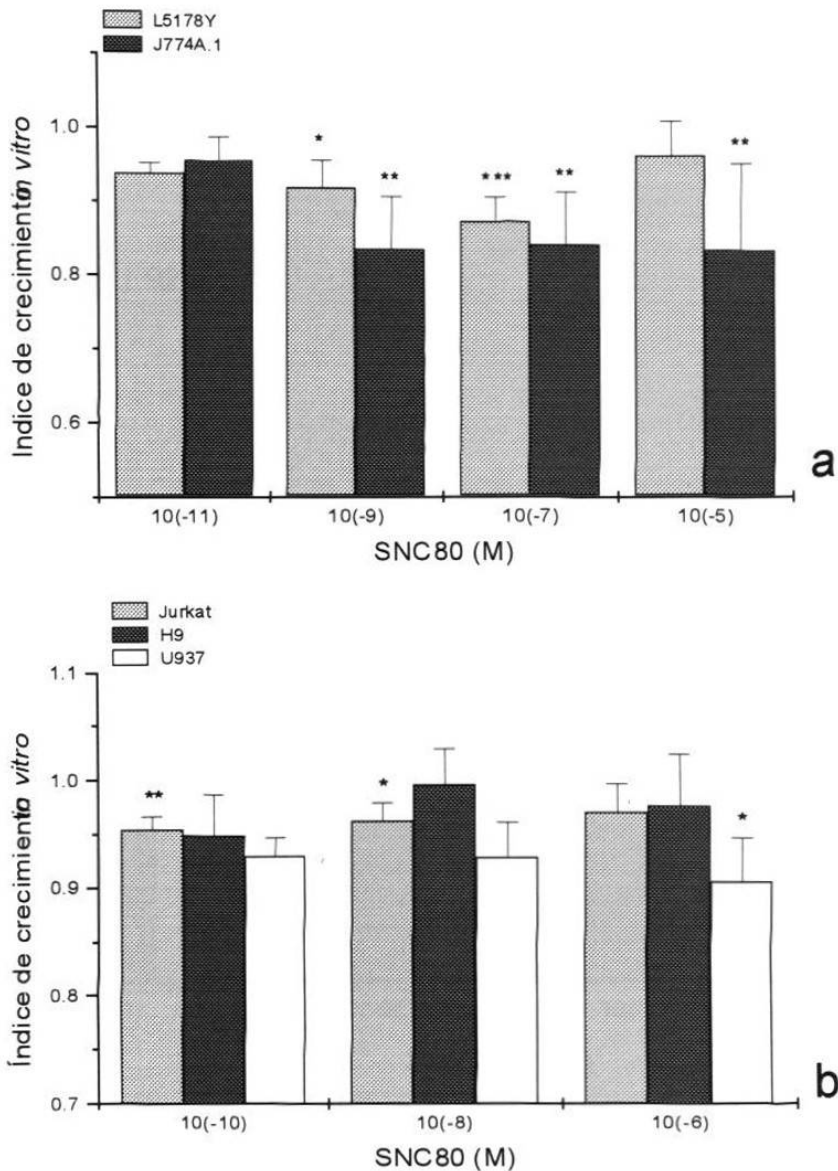


Figura 25. Efecto del SNC80 sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares (a) murinas y (b) humanas. Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI suplementado con SFB. Se añadieron 100 μ l/pozo de SNC80 en concentraciones que van de 10^{-5} M a 10^{-11} M. Se incubaron 44 horas a 37°C y 5% de 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

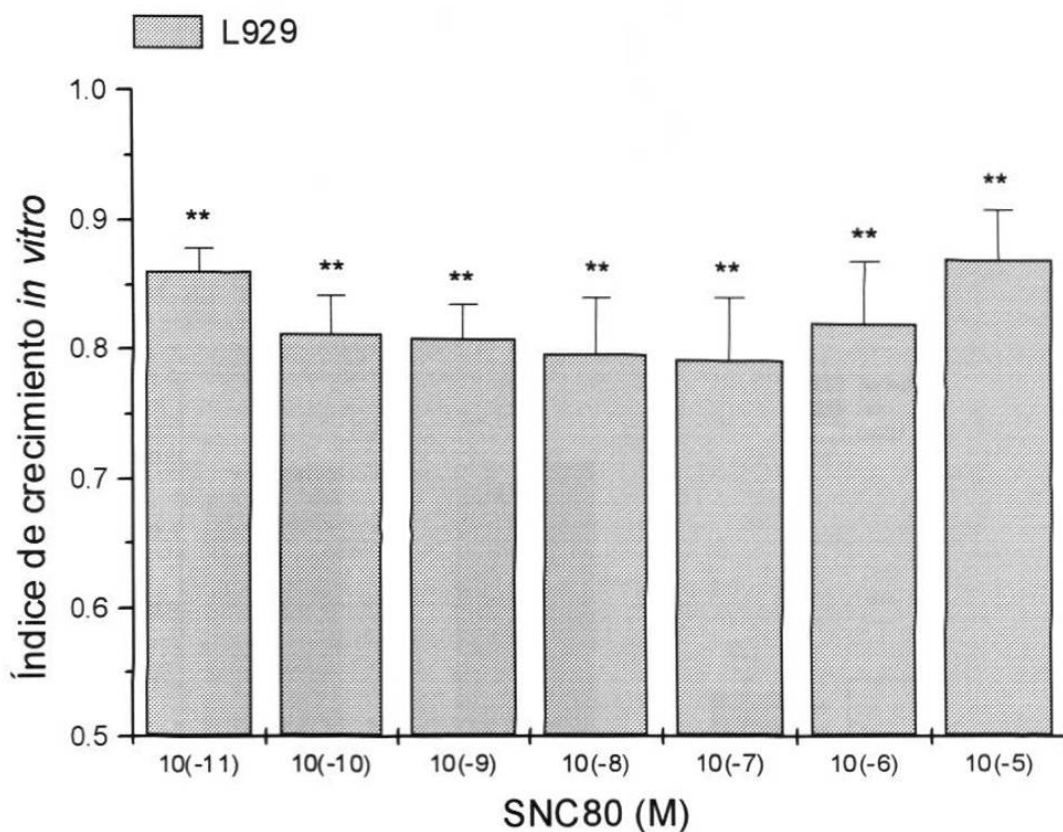


Figura 26. Efecto del SNC80 sobre el crecimiento *in vitro* de la línea celular L929.

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

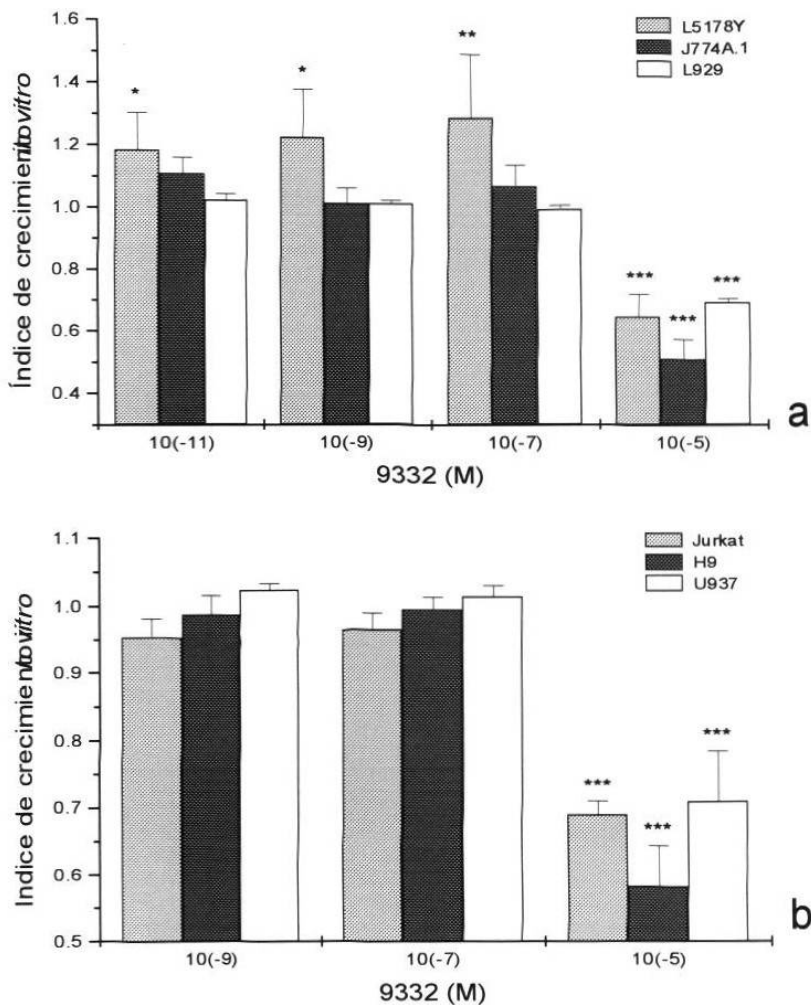


Figura 27. Efecto del 9332 sobre el crecimiento in vitro de líneas celulares (a) murinas y (b) humanas. Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI suplementado con SFB. Se añadieron 100 μ l/pozo de 9332 en concentraciones que van de 10^{-5} M a 10^{-11} M. Se incubaron 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

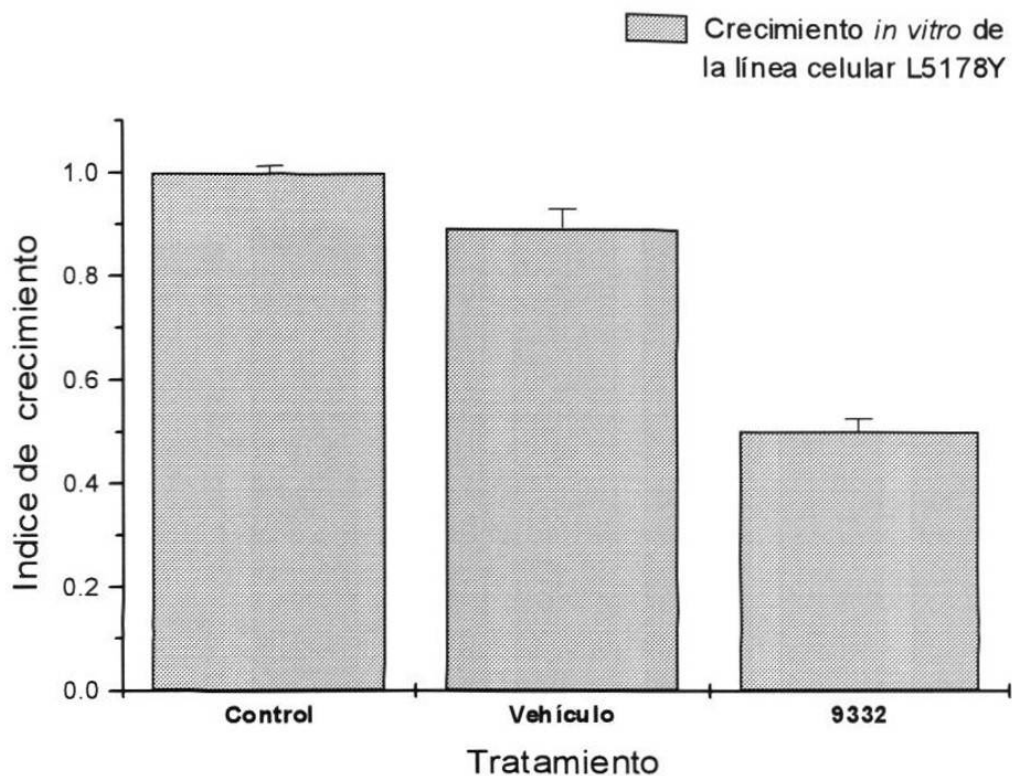


Figura 28. Efecto del 9332 y su vehículo sobre el crecimiento *in vitro* de la línea celular L5178Y. Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI suplementado con SFB. Se añadieron 100 μ l/pozo de cada tratamiento (control, vehículo y 9332 a una concentración de 10^{-5} 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.

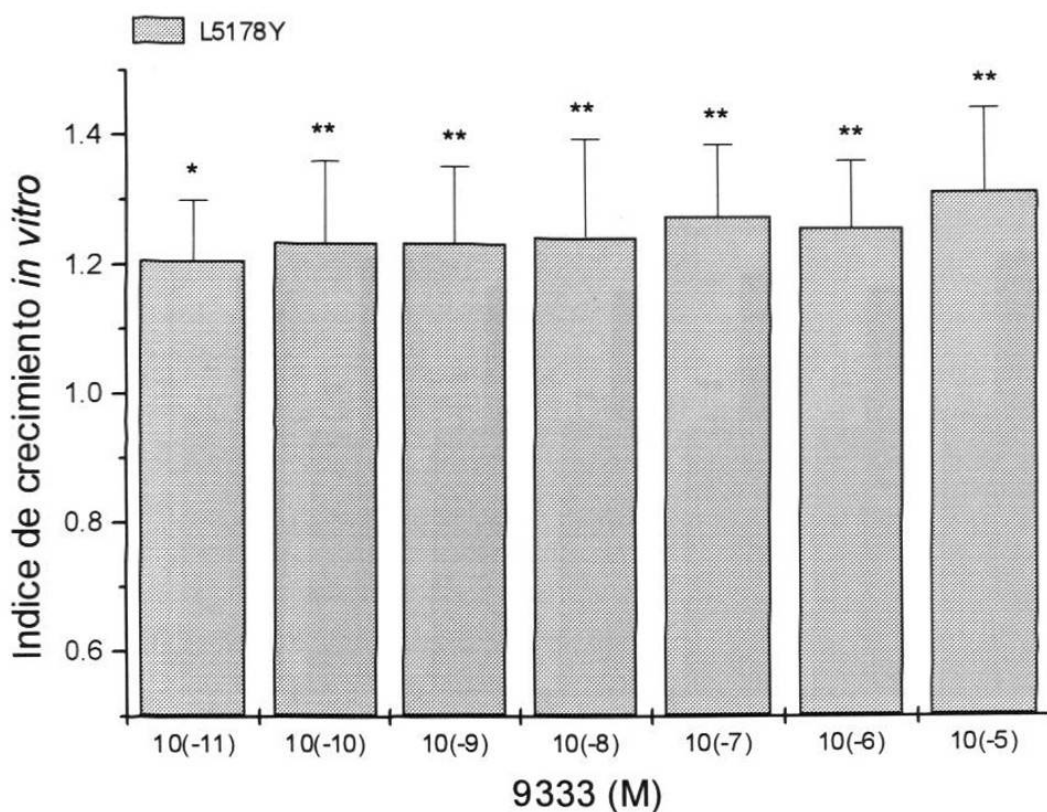


Figura 29. Efecto del 9333 sobre el crecimiento *in vitro* de la línea celular L5178Y. Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI suplementado con SFB. Se añadieron 100 μ l/pozo de 9333 en concentraciones que van de 10^{-5} M a 10^{-11} M. Se incubaron 44 horas a 37°C y 5% de 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

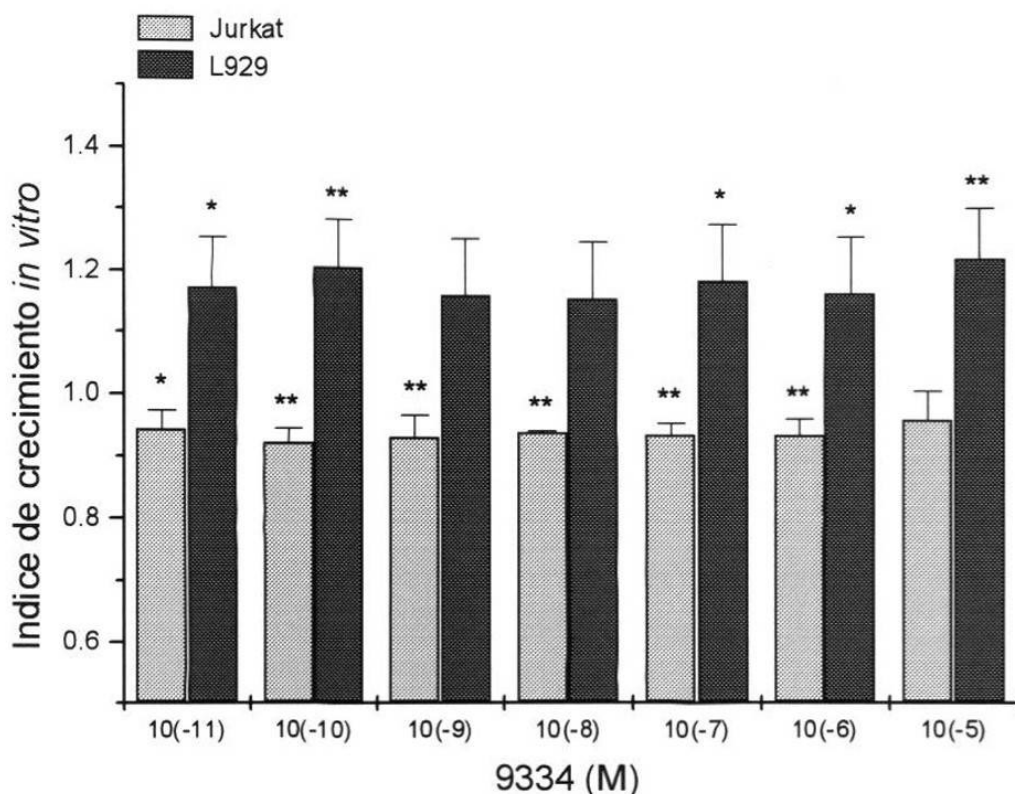


Figura 30. Efecto del 9334 sobre el crecimiento *in vitro* de las líneas celulares Jurkat y L929.

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

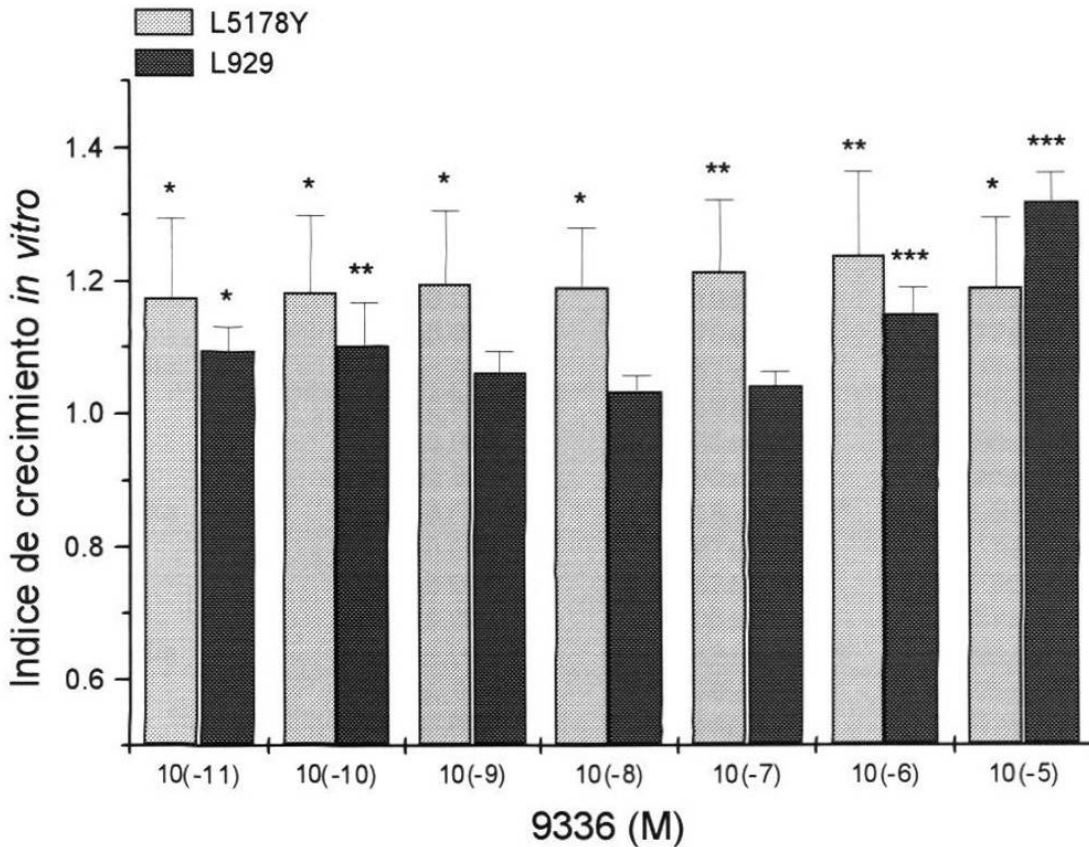


Figura 31. Efecto del 9336 sobre el crecimiento *in vitro* de las líneas celulares L5178Y y L929. Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI suplementado con SFB. Se añadieron 100 μ l/pozo de 9336 en concentraciones que van de 10^{-5} M a 10^{-11} M. Se incubaron 44 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 línea Jurkat y H9, ya que ambas son de origen linfoide 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 TNF- α 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 μ 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.

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.

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-piperaziny)-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*

- 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. Murgu 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/Suppl*(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 δ -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. *Il 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 infections 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 sustances 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). Supression 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



