

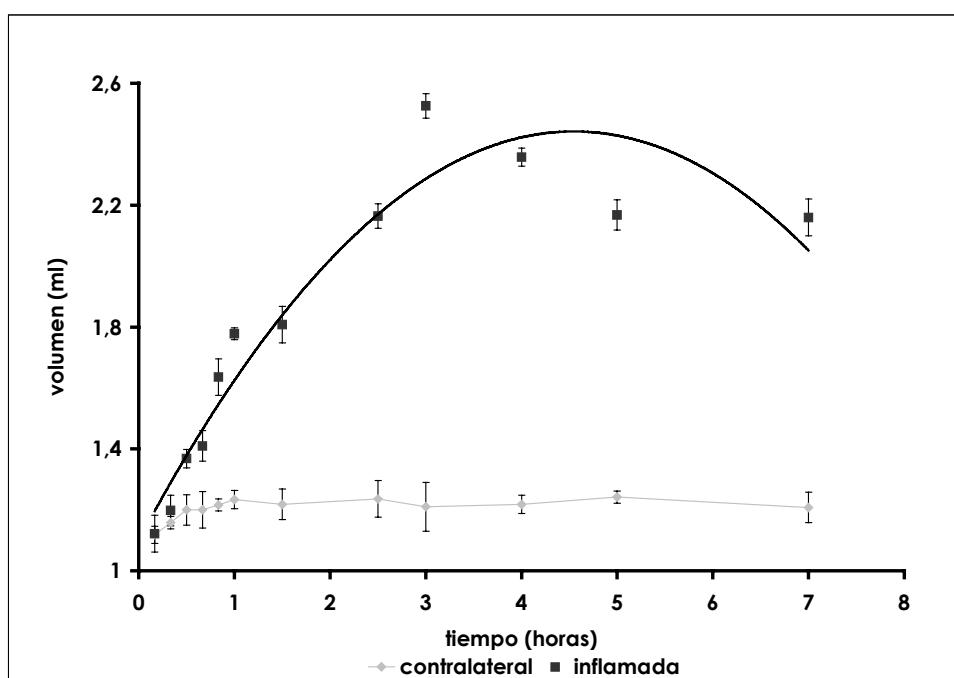
## **1. RESPUESTA INFLAMATORIA AGUDA A LA ADMINISTRACIÓN DE CARRAGENINA (CA) EN LA PATA DE LA RATA.**

### **1.1. Evolución del edema y de la extravasación plasmática.**

#### **1.1.1. Edema.**

La administración s.p. de CA indujo una inflamación localizada en la zona articular de la pata. A lo largo de las siete horas que duró el experimento se fueron registrando los aumentos de volumen de la pata inflamada (figura 7). Como control basal del edema se utilizó la pata contralateral a la inflamada, cuantificando los volúmenes de ambas en los mismos tiempos.

**Figura 7.** Evolución del edema, representado en ml, durante la inflamación aguda inducida por carragenina, en un intervalo de tiempo de siete horas.



Los valores del edema se registraron a intervalos de 10 minutos durante la primera hora y posteriormente a intervalos de una hora. Cada punto representa la media ± E.E.M. de 6 animales.

Tal como se aprecia en la figura 7, a lo largo de las siete horas que duró el experimento, se detectaron diferencias significativas ( $P<0.001$ ) al comparar los valores de volumen (expresados en ml) de las patas inflamadas con sus correspondientes contralaterales, consideradas estas últimas controles. Cabe destacar que en los primeros 10 minutos no hubo diferencia alguna entre ellas. Las

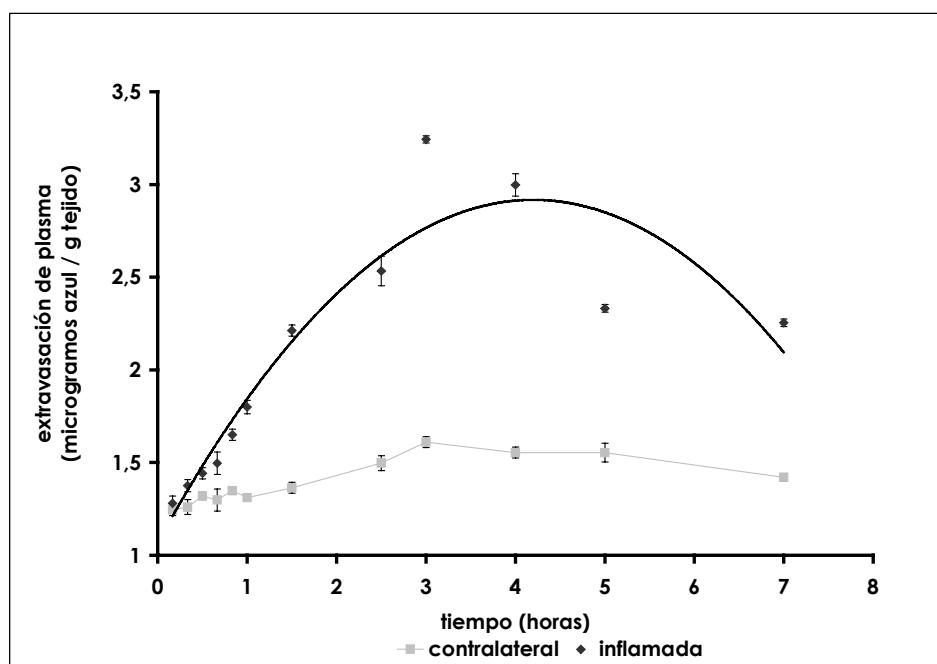
medias de los valores iniciales para ambas patas, inyectada con CA y contralateral, fueron de 1.12 ml. A partir de los 20 minutos del inicio del experimento los valores de volumen en las patas inflamada y su contralateral variaron significativamente ( $P<0.05$ ;  $P<0.001$ ; ANOVA de un factor, C de Dunnett). Los valores medios de la pata contralateral oscilaron entre 1.16 y 1.24 ml, mientras que los de las inflamadas lo hicieron entre 1.20 y 2.53 ml. En la pata inflamada los aumentos cuantificados en los distintos tiempos de evaluación fueron significativamente distintos ( $P<0.05$ , C de Dunnett), no soló entre ellos sino al compararlos con sus correspondientes contralaterales, alcanzándose el máximo de volumen (2.5 ml) a las tres horas del inicio del experimento. En la pata contralateral los incrementos de volumen no fueron diferentes entre ellos durante las siete horas que duró el experimento. A partir de las cuatro horas, y hasta el final del experimento, el volumen de la pata inflamada disminuyó significativamente ( $P<0.001$ , test  $t$  de Student), pero de una manera paulatina, al compararlo con el volumen máximo obtenido a las tres horas del inicio del experimento.

En todo momento, los resultados experimentales obtenidos al valorar el incremento de volumen (edema) fueron comparables a los descritos por Winter et al. (1962).

### 1.1.2. Extravasación plasmática.

En los mismos animales y a los mismos tiempos de evaluación, se determinó la extravasación de proteína plasmática a los tejidos inflamados durante las siete horas que duró el experimento. En la figura 8 se representan los puntos experimentales obtenidos, expresados en  $\mu\text{g}$  de azul de Evans / g de tejido (pata).

**Figura 8.** Evolución del exudado plasmático, representado en  $\mu\text{g}$  azul de Evans/g de tejido, durante la inflamación aguda inducida por carragenina, en un intervalo de siete horas.



La extravasación de azul de Evans se registró, durante la primera hora a intervalos de 10 minutos, y posteriormente a intervalos de una hora. Cada punto representa la media  $\pm$  E.E.M. de 6 animales.

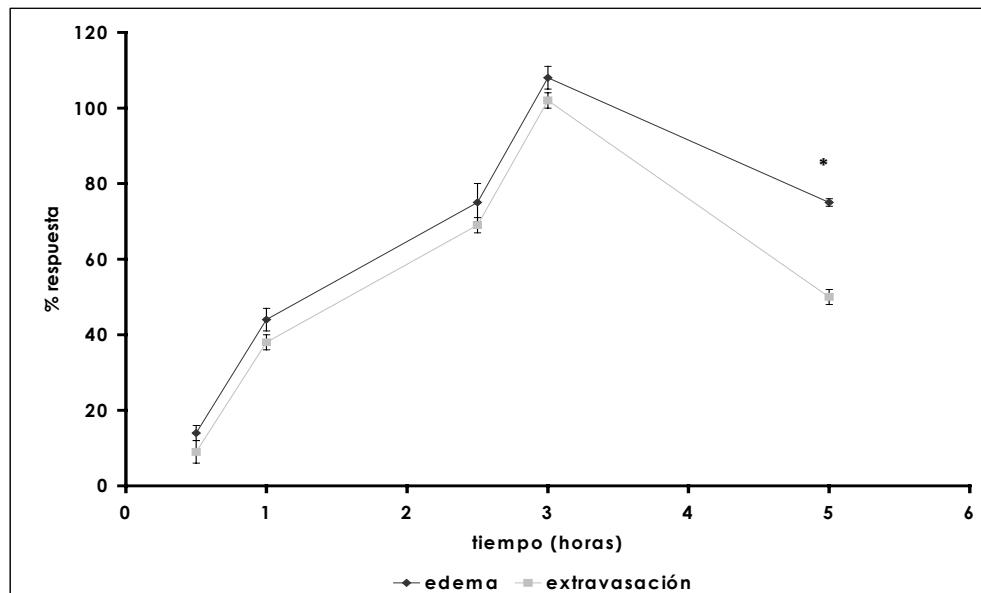
Al igual que con el edema, se apreciaron diferencias significativas ( $P<0.001$ ) entre las patas inflamadas y sus contralaterales al comparar los  $\mu\text{g}$  de colorante exudados al tejido inflamado y no inflamado (contralateral).

Los valores iniciales del marcador proteico en el tejido no inflamado (pata contralateral o control) fueron de  $1.24 \mu\text{g}$  de azul de Evans hasta alcanzar el valor máximo de  $1.61 \mu\text{g}$  de colorante a las tres horas de haberse iniciado el experimento, manteniéndose inalterados hasta el fin al del mismo. Este incremento de exudado plasmático fue significativamente distinto ( $P<0.05$ ; ANOVA, C de Dunnett) a los valores obtenidos con las anteriores muestras. El contenido de exudado proteico en la pata inflamada comenzó a variar de manera significativa

( $P<0.05$ ; ANOVA, C de Dunnett) a partir del minuto 40. Se alcanzó un valor máximo de 3.24 µg de colorante a las tres horas del inicio del experimento, coincidiendo con el máximo volumen (edema) registrado en la pata inflamada. A partir de este momento la disminución de exudado fue significativa ( $P<0.01$  y  $P<0.001$ ;  $t$  de Student) respecto al valor obtenido a las tres horas del inicio del experimento hasta el final del experimento, alcanzándose valores de 2.29 µg de colorante. Siguiendo la metodología descrita en el apartado de Material y Métodos se calcularon los porcentajes de edema y de extravasación, a partir de los volúmenes y el azul de Evans cuantificados como ml y µg, respectivamente.

En la figura 9 se muestra la evolución del edema y de la extravasación plasmática, expresados como porcentajes y cuantificados durante las cinco primeras horas. Como se puede apreciar, el edema y la extravasación de plasma siguen la misma tendencia, aumentando los dos paralelamente en el tiempo, llegando a valores máximos de 108 y 102 %, respectivamente, a las tres horas del inicio del experimento. Los porcentajes de edema y de extravasación de plasma se compararon estadísticamente, mostrando diferencias ( $P<0.001$ ,  $t$  de Student) a partir de la quinta hora del inicio del experimento.

**Figura 9.** Evolución del edema y de la extravasación de plasma, expresados como porcentajes de respuesta, en un intervalo de tiempo de cinco horas.



Primero, se registraron los valores del edema y a continuación se sacrificaron los animales para poder cuantificar la extravasación plasmática. Cada punto representa la media ± E.E.M. de 6 animales. Se compararon los porcentajes de edema y de extravasación de plasma en un determinado momento de evaluación. \* $P<0.001$  (test  $t$  de Student).

## **1.2. Obtención de los controles basales para el edema y la extravasación plasmática.**

Para calcular los porcentajes tanto del edema como de la extravasación plasmática era necesario disponer de un valor inicial, considerado como control basal. En el caso del edema se disponía del valor  $V_0$  obtenido en la pata del animal previamente a la inducción de la inflamación con CA (ver el apartado de Material y Métodos). En cuanto a la extravasación plasmática se pensó utilizar la pata contralateral a la inflamada como control, ya que a tiempo cero resultaba imposible disponer de un valor de extravasación de plasma en el mismo animal, porque para cuantificarse este parámetro debe sacrificarse.

Con el fin de establecer si existían diferencias entre la pata contralateral y la pata inyectada se emplearon 16 animales, distribuidos en dos grupos. En el grupo a) se administró solución salina (SS) en la pata posterior izquierda de cada animal, mientras que en el grupo b) se inyectó la CA.

### **1.2.1. Efecto de la administración de solución salina (SS), por vía s.p.**

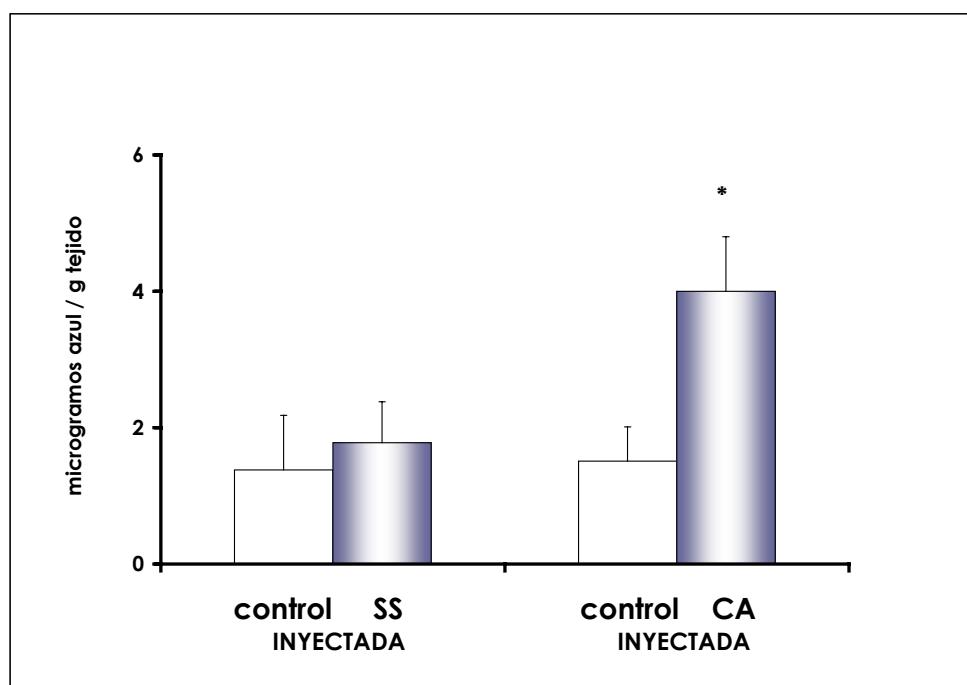
La administración de SS, por vía s.p., en la pata posterior izquierda del animal provocó a las tres horas de su administración un valor medio de exudado de 1.51  $\mu\text{g}$  colorante/g de tejido. En el mismo animal y en la pata contralateral a la inyectada con SS, se cuantificó una media de 1.38  $\mu\text{g}/\text{g}$  de tejido. Estadísticamente no hubo diferencias significativas entre ambos valores. Estos resultados permitían emplear el valor obtenida en la pata contralateral del mismo animal como valor basal para cuantificar el azul de Evans exudado a tejidos antes de ser inflamados. De esta manera se evitaba no sólo la utilización de un mayor número de animales sino también la variabilidad interindividual. Los resultados se representan gráficamente en la figura 10.

### **1.2.2. Efecto de la administración de carragenina (CA), por vía s.p.**

La administración de CA, por vía s.p., en la pata posterior izquierda de la rata, provocó un incremento significativo ( $P<0.001$ ) de la extravasación de plasma, alcanzándose valores de 4  $\mu\text{g} / \text{g}$  de tejido. En la pata contralateral del mismo animal se mantenían valores de colorante de aproximadamente 1.78  $\mu\text{g}/\text{g}$  de

tejido. Los valores se representan en la figura 10. Al compararlos con los obtenidos tras la administración de SS, tanto en la pata contralateral como la inyectada no se detectaron diferencias significativas.

**Figura 10.** Valores de azul de Evans, expresados en  $\mu\text{g}$  de colorante/g de tejido, obtenidos a las tres horas de la administración de SS o CA, por vía s.p., en una de las patas posteriores.



La pata contralateral a la inyectada no recibió ningún tratamiento (control). Los valores de colorante exudado obtenidos se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. de 8 animales.

\* $P<0.001$  (test *t* de Student).

### 1.3. Coeficientes de variación (CV) de las técnicas pleismografía y espectrofotometría.

Se validaron las dos técnicas empleadas, la **pleismografía** y la **espectrofotometría**, utilizadas para cuantificar el **edema** y la **extravasación de plasma**, respectivamente. Para ello, se realizaron una serie de experimentos, empleando un total de 30 animales, distribuidos en tres grupos, de 10 animales por grupo. Según la metodología descrita en el apartado de Material y Métodos, cada día se cuantificaron los valores del edema y de la extravasación plasmática a tiempo cero y a las tres horas después de haber administrado CA. Los resultados obtenidos en el primer día fueron utilizados para establecer la repetibilidad de las técnicas y los de los tres días consecutivos la reproducibilidad. Los resultados (tabla

## Resultados

---

17) se expresaron como porcentajes de los coeficientes de variabilidad interindividual (CV).

**Tabla 17.** Resultados de los ensayos de repetibilidad (día 1) y reproducibilidad (días 1 al 3) para el edema y la extravasación de plasma mediante pleismografía y espectrofotometría, respectivamente, así como los CV para cada uno de ellos.

|       | % Edema | % CV | % Extravasación plasmática | % CV |
|-------|---------|------|----------------------------|------|
| Día 1 | 109 ± 3 | 10   | 100 ± 6                    | 18   |
| Día 2 | 98 ± 4  | 12   | 102 ± 6                    | 20   |
| Día 3 | 108 ± 4 | 10   | 99 ± 4                     | 14   |

Valores medios ± E.E.M. de edema, extravasación de plasma y sus correspondientes coeficientes de variabilidad. % C.V. : porcentaje del coeficiente de variación. Grupo de 10 animales/día.

La evaluación estadística de los resultados anteriores se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor. Se demostró que no existían diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre los tres grupos de resultados obtenidos a lo largo de los días en que se realizaron estos experimentos, considerando validado el modelo de estudio.

## 2. EFECTO DE LOS AGONISTAS Y ANTAGONISTAS OPIOIDES SOBRE EL EDEMA Y LA EXTRAVASACIÓN.

Para determinar los efectos de los opioides sobre el edema y la extravasación plasmática se emplearon agonistas específicos para los diferentes tipos de receptores opioides (RO), según se muestra en la tabla 6 del apartado de Material y Métodos. El rango de dosis estudiadas para cada fármaco fue distinto, empleándose una media de ocho animales por dosis. Los animales del grupo control recibieron SS, por la misma vía. Para cada agonista se obtuvieron ocho curvas experimentales.

**Tabla 18.** Fármacos agonistas y antagonistas opioides empleados en el estudio, agrupados en función de su afinidad por los distintos receptores opioides (RO).

| RO                  | $\mu$                          | $\delta$  | $\kappa$  |
|---------------------|--------------------------------|---|-----------|
| <b>AGONISTAS</b>    | Morfina<br>Fentanilo<br>PL017* | DPDPE*<br>SNC 80                                    | U-50,488H |
| <b>ANTAGONISTAS</b> |                                | Clorhidrato de Naloxona<br>Metilyoduro de Naloxona* |           |
|                     | CTOP*                          | Naltrindol  | MR2266    |

\* Fármacos con acción predominantemente periférica.

## 2.1. Efecto de los agonistas opioides $\mu$ , $\delta$ y $\kappa$ sobre el edema inducido por CA.

La administración de cada uno de los agonistas opioides, inyectados por vía s.c., a distintas dosis, demostró que ninguno de ellos presentaba una relación dosis-respuesta sobre la inhibición del edema. No obstante, morfina (MS), DPDPE (DP) y SNC 80 (SN), a determinadas dosis, fueron capaces de inducir cambios estadísticamente significativos, cuando se compararon con los valores basales.

A continuación se presentan los resultados obtenidos tras la administración de cada uno de los agonistas sobre el porcentaje de edema.

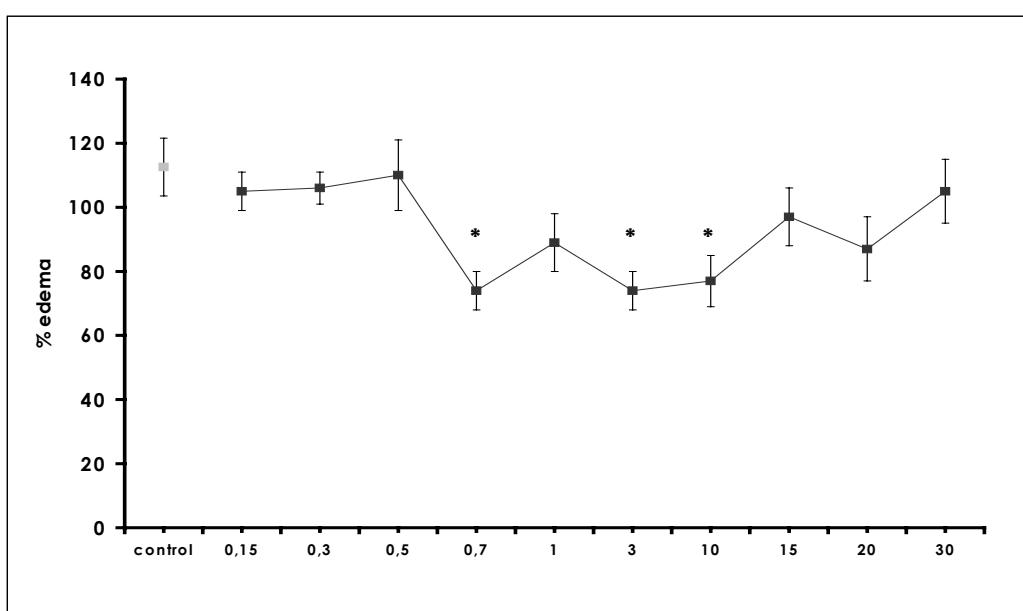
- **Morfina:** Los porcentajes de edema obtenidos tras la administración de este agonista  $\mu$  selectivo, en un rango de dosis comprendido entre 0.15 y 30 mg.kg<sup>-1</sup>. oscilaron entre el 74 y el 110%. Mientras que el valor medio correspondiente al grupo control fue de 112% de edema. Las comparaciones estadísticas entre el grupo control (SS) y las de morfina a las dosis de 0.7, 3 y 10 mg.kg<sup>-1</sup>, empleando el test *t* de Student para datos no apareados, demostraron que este agonista opioide

## Resultados

inducía una disminución del volumen de la pata de aproximadamente un 30% ( $P < 0.05$ ), corroborándose resultados obtenidos previamente por nuestro grupo (Planas *et al.*, 1995). La comparación múltiple de varianzas (ANOVA) de un factor estableció que entre las tres dosis anteriores no había diferencias significativas, demostrando que no existía una relación dosis-respuesta.

En la figura 11 se representa gráficamente el efecto del fármaco administrado a las diferentes dosis, apreciándose la tendencia de la morfina a disminuir el edema, sobre todo, a las dosis intermedias, pero sin guardar relación dosis-efecto.

**Figura 11.** Efecto de la administración de morfina ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), por vía s.c., sobre el edema, expresado en porcentaje (%), a las tres horas de la inducción de la inflamación por carragenina.

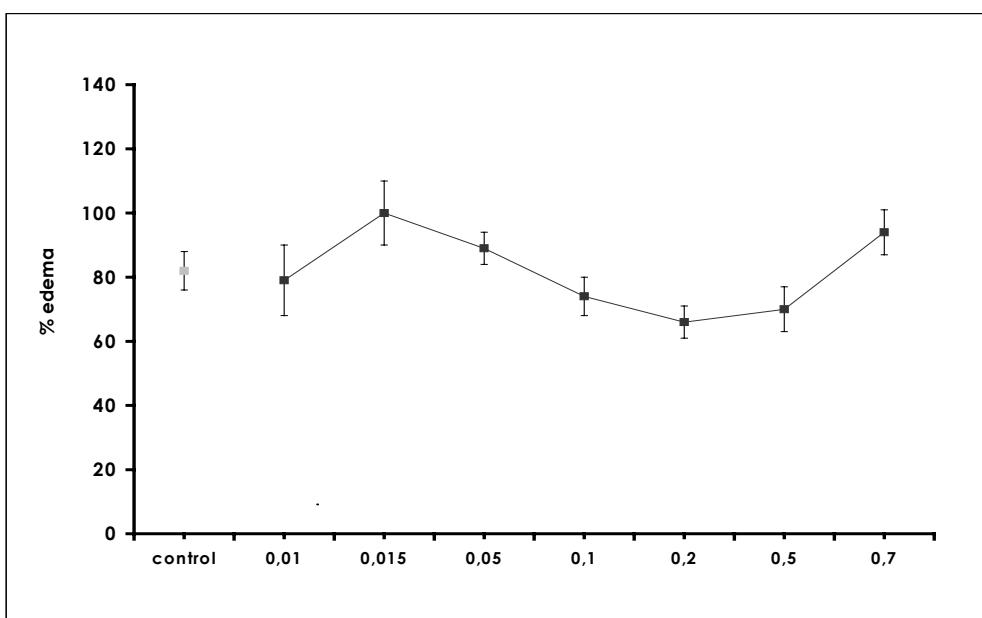


El rango de dosis empleadas está comprendido entre 0.15 y 30  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Cada punto representa la media  $\pm$  E.E.M. de 8 animales. \* $P < 0.05$  respecto al grupo control (SS) (test  $t$  de Student).

- **Fentanilo:** Los porcentajes de edema obtenidos tras el empleo de fentanilo oscilaron entre el 66 y el 100% de edema. En el grupo control (SS) el porcentaje medio de edema fue del 82%. La administración de este agonista  $\mu$  selectivo, en un rango de dosis comprendido entre 0.01 y 0.7  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , no modificó los valores del edema, en ninguna de las dosis empleadas. Estos resultados se representan gráficamente en la figura 12.

No se detectaron diferencias significativas en el edema a ninguna de las dosis empleadas, tanto al realizar comparaciones múltiples buscando posibles diferencias entre las dosis mediante un ANOVA, como empleando el test *t* de Student al comparar cada dosis vs. el grupo control (SS). Por lo tanto, los resultados mostraron que el fentanilo no modifica el edema inducido en este modelo de inflamación aguda periférica.

**Figura 12.** Efecto de la administración de fentanilo ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), por vía s.c., sobre el edema, expresado en porcentaje (%), a las tres horas de la inducción de la inflamación por carragenina.



El rango de dosis empleadas está comprendido entre 0.01 y 0.7  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de fentanilo. Cada punto representa la media  $\pm$  E.E.M. de 8 animales.

- **DPDPE:** Tras la administración del agonista  $\delta_1$  selectivo, DPDPE, en un rango de dosis comprendido entre 0.01 y 3  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , indujo porcentajes de edema que oscilaron entre el 83 y el 144%. En cuanto al grupo control (SS) el porcentaje de edema obtenido fue de 105%. En la figura 13 se representan gráficamente estos valores experimentales. Tampoco se observó relación alguna entre la dosis administrada y el porcentaje de edema obtenido.

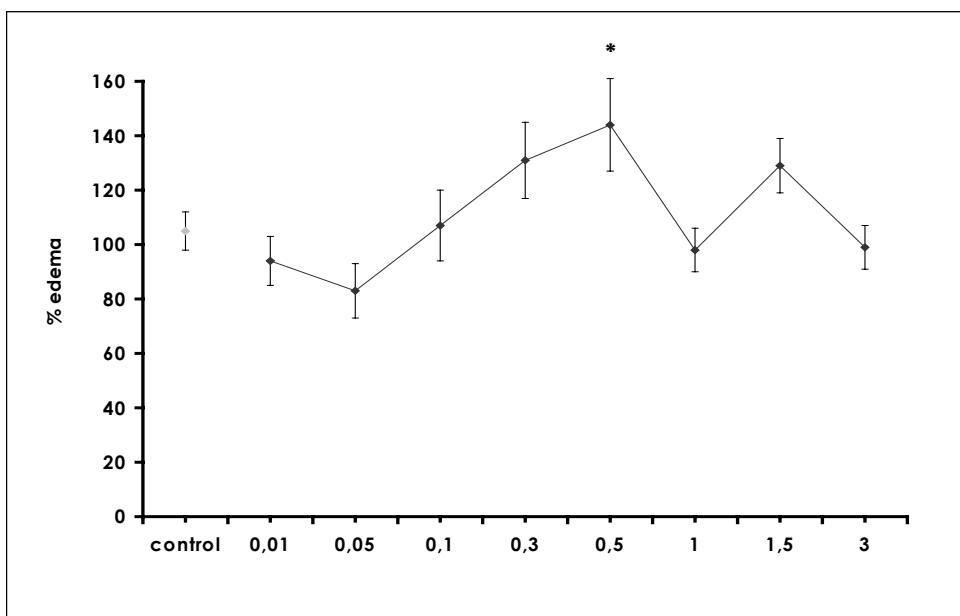
Las comparaciones múltiples de varianzas (ANOVA) demostraron la existencia de diferencias significativas entre las dosis utilizadas ( $P<0.01$ ). El test *t* de Student para pares de datos no apareados reveló que la dosis de 0.5  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de DPDPE provocaba un aumento del volumen de la pata del animal,

## Resultados

---

es decir, que a esta dosis el agonista  $\delta_1$  inducía un efecto pro-edematoso de aproximadamente un 40% ( $P<0.05$ ).

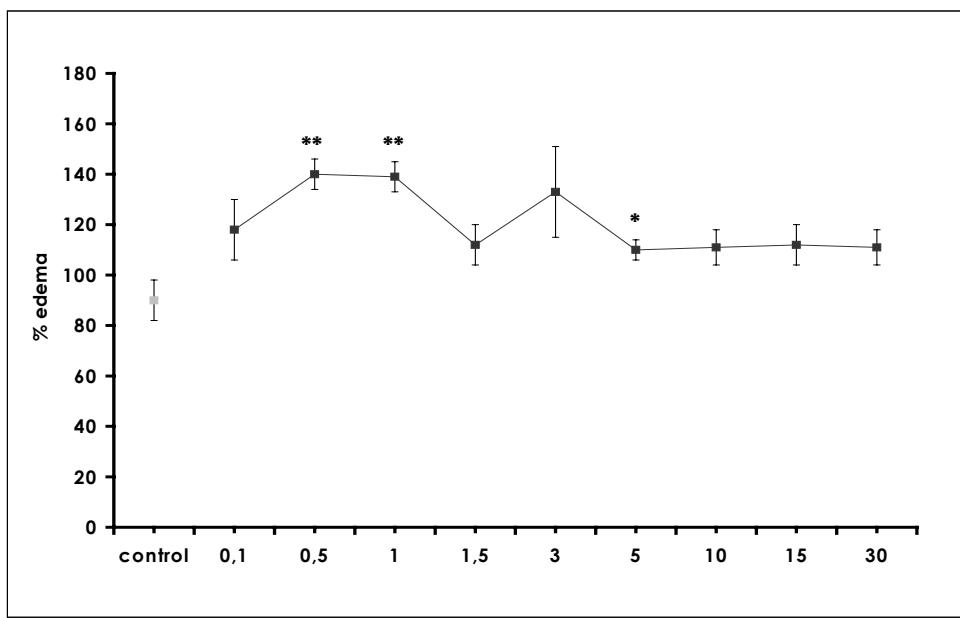
**Figura 13.** Efecto de la administración de DPDPE ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), por vía s.c., sobre el edema, expresado en porcentaje (%), a las tres horas de la inducción de la inflamación por carragenina.



El rango de dosis empleadas está comprendido entre 0.01 y 3  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Cada punto representa la media  $\pm$  E.E.M. de 8 animales. \* $P< 0.05$  respecto al grupo control (SS) (test  $t$  de Student).

- **SNC 80:** La administración de este agonista  $\delta_{1-2}$  selectivo, en el rango de dosis de 0.1 a 30  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , provocó fluctuaciones en los porcentajes de edema tal como se muestra en la figura 14. Estos valores, que variaron desde 110 a 140% de edema, no mostraron relación dosis-respuesta. El porcentaje medio de edema obtenido en el grupo control (SS) fue de aproximadamente un 90%. La comparación múltiple de varianzas (ANOVA) demostró la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre alguna dosis ( $P<0.001$ ). El test a posteriori C de Dunnett, detectó diferencias entre el grupo control (SS) y el grupo de animales tratados con las dosis de 0.5 y 1  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de SNC 80 ( $P<0.001$ ). El estudio comparativo entre grupos, utilizando el test  $t$  de Student aportó una nueva diferencia ( $P<0.05$ ) entre el grupo control (SS) y el grupo 5  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de SNC 80.

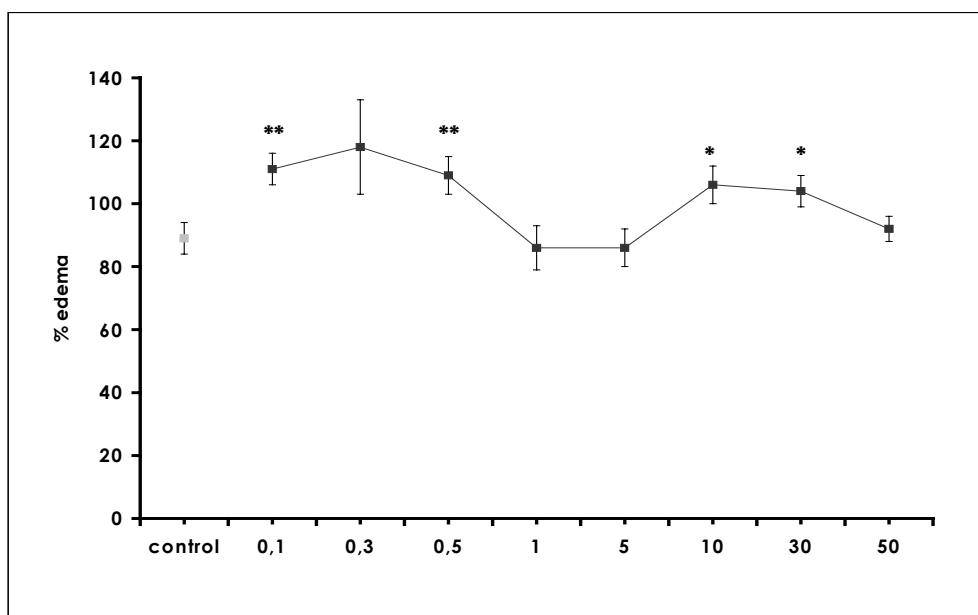
**Figura 14.** Efecto de la administración de SNC 80 ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), por vía s.c., sobre el edema, expresado en porcentaje (%), a las tres horas de la inducción de la inflamación por carragenina.



El rango de dosis empleadas está comprendido entre 0.1 y 30  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Cada punto representa la media  $\pm$  E.E.M. de 8 animales. \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.001$  respecto al grupo control (SS) (test *t* de Student).

- **U-50,488H:** Tras la administración de las diferentes dosis de este agonista  $\kappa$ , en un rango comprendido entre 0.1 y 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , se cuantificaron porcentajes de edema que oscilaron entre el 86 y 118%. En el grupo control (SS) el porcentaje medio de edema registrado fue de un 89% (figura 15). El análisis estadístico mediante la comparación múltiple de varianzas (ANOVA), reveló diferencias significativas entre dosis. Esto es, tras la administración de 0.1, 0.3 y 0.5  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , el fármaco fue capaz de aumentar un 20%, aproximadamente, el porcentaje de edema. Utilizando el test *t* de Student se demostró que las dosis 0.1, 0.5, 10 y 30 fueron significativamente diferentes ( $P<0.05$  y  $P<0.01$ ) del grupo control (SS). Sin embargo, la tendencia general del fármaco no mostró relación alguna dosis-respuesta.

**Figura 15.** Efecto de la administración de U-50,488H ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), por vía s.c., sobre el edema, expresado en porcentaje (%), a las tres horas de la inducción de la inflamación por carragenina.



El rango de dosis empleadas está comprendido entre 0,1 y 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Cada punto representa la media  $\pm$  E.E.M. de 8 animales. \* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ; respecto al grupo control (SS) (test *t* de Student).

## **2.2. Efecto de los agonistas opioides $\mu$ , $\delta$ y $\kappa$ sobre la extravasación plasmática inducida por carragenina.**

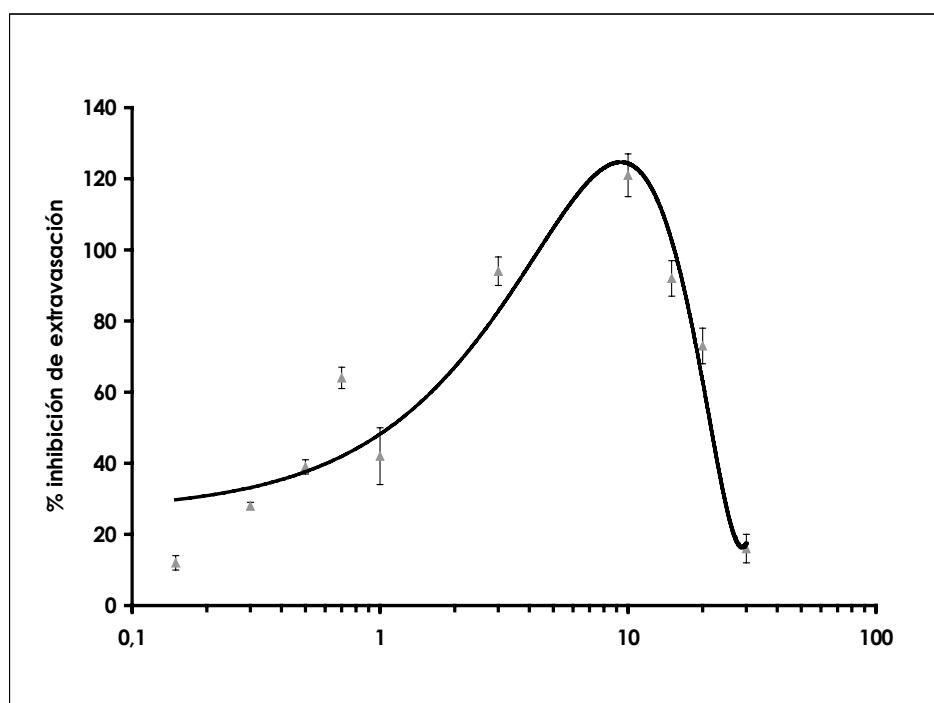
Contrariamente a los resultados obtenidos sobre el edema, los agonistas opioides  $\mu$  y  $\delta$  utilizados en este estudio indujeron una inhibición de la extravasación plasmática dosis-dependiente. En cada uno de los experimentos con los distintos agonistas se utilizó un grupo control (animales a los que se les administró solución salina, SS) cuyos porcentajes de extravasación oscilaron entre 84 y 96%.

Los fármacos morfina, fentanilo, DPDPE y SNC 80, administrados a dosis crecientes mostraron un comportamiento bifásico. Es decir, a dosis bajas se produjeron disminuciones significativas de la extravasación plasmática, pero a partir de una determinada dosis este efecto inhibidor desapareció, llegándose a valores de extravasación plasmática comparables a los porcentajes obtenidos en los grupos control (SS).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los agonistas opioides empleados, representados gráficamente como curvas de inhibición de la extravasación plasmática.

- **Morfina:** La administración de morfina, en un rango de dosis comprendido entre  $0.15$  y  $30$   $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , provocó un efecto inhibidor sobre la extravasación plasmática, dosis-dependiente (figura 16). Su obtuvo una curva bifásica, caracterizada por una zona ascendente (dosis entre  $0.15$  y  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), con un máximo del 120% de inhibición (dosis de  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). A partir de la dosis de  $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  se produjo un cambio de pendiente, disminuyendo paulatinamente el efecto inhibidor de este opioide al incrementar las dosis, llegándose casi a porcentajes basales de exudación plasmática.

**Figura 16.** Efecto bifásico de la morfina sobre la inhibición de la extravasación plasmática, expresada en porcentajes (%), a las tres horas de la inducción de la inflamación por carragenina.



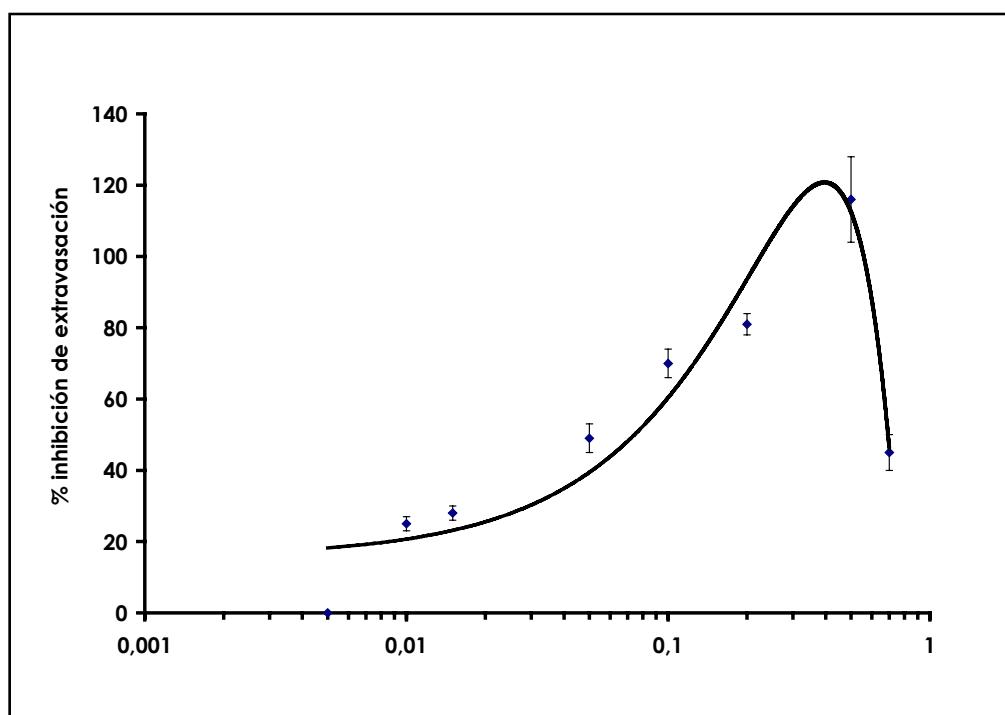
El rango de dosis del opioide, administradas por vía s.c., está comprendido entre  $0.15$ - $30$   $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Cada punto representa la media  $\pm$  E.E.M. de 8 animales.

## Resultados

---

- **Fentanilo:** Al igual que con la morfina, la administración de este agonista  $\mu$ -selectivo en un rango de dosis comprendido entre  $0.01$  y  $0.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , provocó una respuesta bifásica, caracterizada por una zona ascendente (dosis comprendidas entre  $0.01$  y  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) con un máximo del 116% de inhibición del exudado plasmático, a la dosis de  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . A partir de esta dosis se produjo un cambio de pendiente perdiéndose el efecto anti-exudativo. No se emplearon dosis superiores a  $0.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  debido a la depresión respiratoria que induce el fentanilo. En la figura 17 se representa la tendencia bifásica de este fármaco, anteriormente descrita.

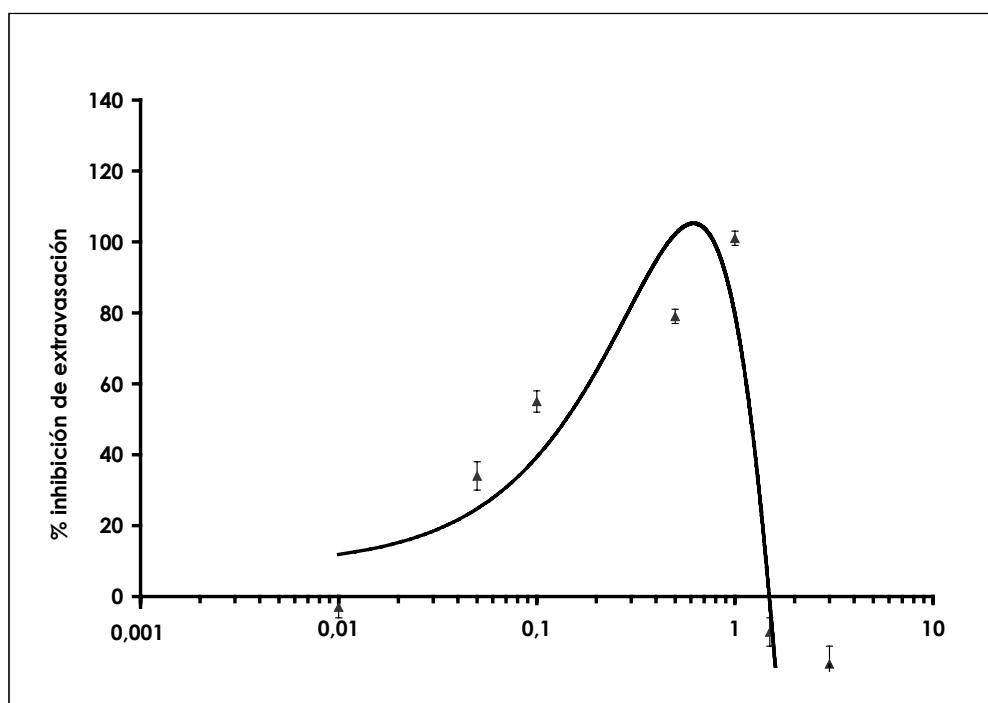
**Figura 17.** Efecto bifásico del fentanilo sobre la inhibición de la extravasación plasmática, expresada en porcentajes (%), a las tres horas de la inducción de la inflamación por carragenina.



El rango de dosis administrado de fentanilo, por vía s.c., está comprendido entre  $0.01$ - $0.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Cada punto representa la media  $\pm$  E.E.M., de 8 animales.

- **DPDPE:** La administración de este agonista  $\delta_1$ -selectivo, en un rango de dosis comprendido entre  $0.01$  y  $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , manifestó, al igual que los anteriores agonistas, un efecto bifásico sobre la inhibición exudativa (figura 18). Dicha curva se caracterizó por una pendiente ascendente que incluía las dosis de  $0.01$  a  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , llegando a un valor máximo de inhibición del 101% con la última dosis empleada ( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Al incrementar ésta ( $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) se obtuvo una pérdida total de la inhibición sobre la extravasación plasmática, tendencia que se mantuvo al administrar  $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  del agonista opioide  $\delta_1$ .

**Figura 18.** Efecto bifásico del agonista  $\delta_1$ -selectivo DPDPE sobre la inhibición de la extravasación plasmática, expresada en porcentajes (%), a las tres horas de la inducción de la inflamación por carragenina.



El rango de dosis de DPDPE, administradas por vía s.c., está comprendido entre  $0.01$  y  $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Cada punto representa la media  $\pm$  E.E.M., de 8 animales.

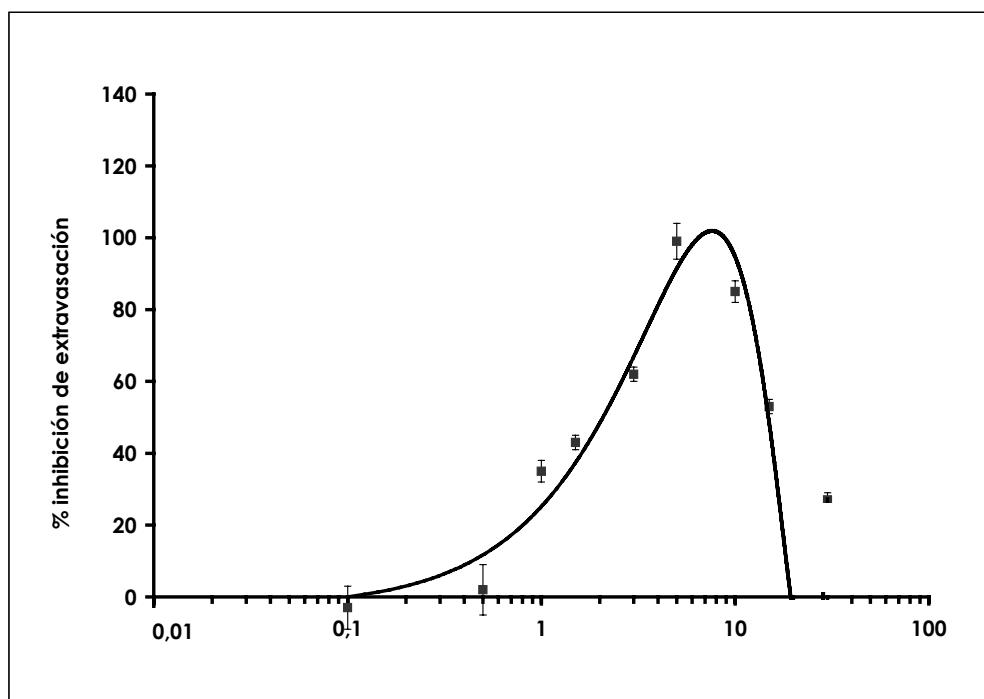
Las dosis  $0.01$ ,  $1.5$  y  $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de DPDPE no modificaban los niveles basales de exudado, no difiriendo de los obtenidos en el grupo control (animales a los que se les había administrado SS).

## Resultados

---

- **SNC 80:** En el caso del SNC 80, agonista sintético  $\delta_{1-2}$  selectivo, el rango de dosis administradas estuvo comprendido entre  $0.1$  y  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . La tendencia de los valores experimentales obtenidos siguieron, al igual que con los anteriores opioides, una curva bifásica (figura 19). La administración de las dos primeras dosis de fármaco ( $0.1$  y  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) no modificó los valores de extravasación de plasma, siendo comparables a los porcentajes obtenidos en el grupo control (SS). A partir de la administración de  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de SNC 80 se obtuvieron porcentajes de inhibición significativos ( $P < 0.05$ ). Tal como se aprecia en la figura 19, el efecto inhibidor máximo se obtuvo a la dosis de  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  con un 99% de inhibición de la exudación plasmática. Al administrar dosis superiores a  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  se observó un cambio de pendiente de la curva con un claro efecto pro-exudativo (zona descendente de la misma).

**Figura 19.** Efecto bifásico del agonista  $\delta_{1-2}$ -selectivo SNC 80 sobre la inhibición de la extravasación plasmática, expresada en porcentajes (%), a las tres horas de la inducción de la inflamación por carragenina.

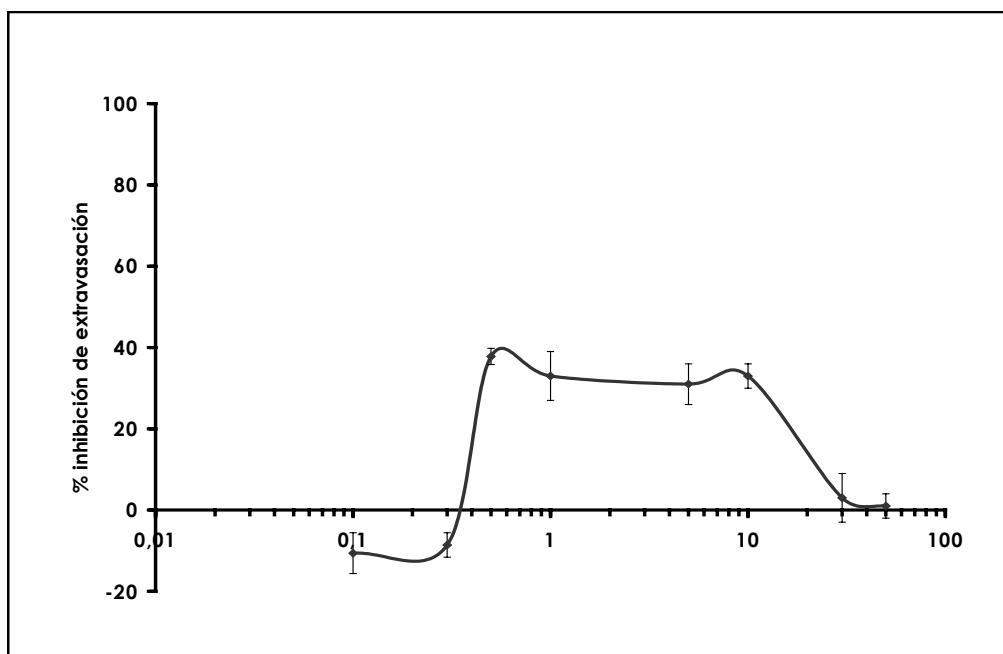


El rango de dosis de SNC 80, administradas por vía s.c., está comprendido entre  $0.1$  y  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Cada punto representa la media  $\pm$  E.E.M., de 8 animales.

- **U-50,488H:** La administración de este agonista opioide provocó una disminución en los porcentajes de extravasación obtenidos durante la inflamación aguda. En el grupo control (SS) se obtuvieron porcentajes del 91% de extravasación. El rango de dosis empleado para este agonista  $\kappa$ -selectivo estuvo comprendido entre 0.1 y 50 mg.kg<sup>-1</sup>, tras cuya administración se obtuvieron efectos antiexudativos, que en ningún caso llegaron a superar el 35%.

A diferencia de los anteriores agonistas, utilizando este fármaco  $\kappa$ -selectivo no se obtuvo una relación dosis-respuesta. Se observó cómo a partir de una dosis de 0.5 mg.kg<sup>-1</sup> y hasta una dosis no superior a los 10 mg.kg<sup>-1</sup>, el contenido de extravasación plasmática en el tejido inflamado se reducía hasta porcentajes de inhibición que oscilaban entre el 31 y el 38% (figura 20). A dosis superiores a los 10 mg.kg<sup>-1</sup> se perdió el efecto inhibidor.

**Figura 20.** Efecto del agonista kappa, U-50,488H, sobre la inhibición de la extravasación plasmática, expresada en porcentajes (%), a las tres horas de la inducción de la inflamación por carragenina.



El rango de dosis administradas de U-50,488H está comprendido entre 0.1 y 50 mg.kg<sup>-1</sup>. Cada punto representa la media  $\pm$  E.E.M., de 8 animales.

### **2.3. Potencia de los distintos agonistas opioides obtenidos a partir de las curvas dosis-respuesta.**

Los resultados obtenidos tras la administración de los diferentes agonistas opioides muestran que el efecto inhibidor de estos fármacos sobre la extravasación plasmática es de tipo bifásico. Para calcular la potencia (DE) de cada uno de los agonistas utilizamos sólo las dosis que producían inhibición de la extravasación plasmática correspondientes a la pendiente ascendente de cada una de las curvas. Empleando los porcentajes de inhibición de la extravasación de plasma para cada agonista se obtuvieron distintas curvas dosis-respuesta que se ajustaron, por regresión lineal simple, a una recta media, definida por su coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y pendiente. A partir de estas ecuaciones lineales, se obtuvieron las  $DE_{20}$ ,  $DE_{50}$ ,  $DE_{80}$ . Los valores medios obtenidos para cada agonista y nivel de efecto se muestran en la tabla 19, así como el valor máximo de inhibición de la extravasación plasmática.

**Tabla 19.** Dosis de agonistas ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) con las que se alcanza el 20, 50 y 80 % de inhibición de la extravasación plasmática, así como los porcentajes máximos de inhibición obtenidos con cada uno de ellos ( $E_{\max}$ ).

| <b>AGONISTAS<br/>OPIOIDES</b>                               | <b><math>DE_{20}</math></b>                 | <b><math>DE_{50}</math></b>                | <b><math>DE_{80}</math></b>               | <b><math>E_{\max} (%)</math></b>      |
|---|---|--|---|---------------------------------------|
| $\mu$<br><b>MORFINA</b><br><b>FENTANILO</b><br><b>PL017</b> | 0.22 ± 0.02<br>0.01 ± 0.001<br>0.03 ± 0.003 | 0.71 ± 0.10<br>0.04 ± 0.007<br>0.11 ± 0.02 | 1.92 ± 0.37<br>0.18 ± 0.06<br>0.36 ± 0.08 | 120 ± 5.57<br>116 ± 13.33<br>118 ± 10 |
| $\delta$<br><b>DPDPE</b><br><b>SNC 80</b>                   | 0.01 ± 0.005<br>0.58 ± 0.02                 | 0.10 ± 0.01<br>1.70 ± 0.10                 | 0.36 ± 0.04<br>5.03 ± 0.49                | 101 ± 1.79<br>99 ± 4.73               |

Como ya se comentó anteriormente el agonista  $\kappa$ , U-50488H, no manifestó una respuesta inhibidora sobre la extravasación plasmática como los agonistas  $\mu$  y  $\delta$ . Los porcentajes máximos de inhibición no superaron el 40%, de manera que no fue posible calcular DE por encima del 20%. Este es el motivo por el que en la tabla 19 no se presenta resultado alguno correspondiente al U-50,488H. En la tabla 20 que se muestra a continuación se recogen los valores medios de los coeficientes de correlación y las pendientes de las rectas de cada agonista.

**Tabla 20.** Coeficientes de correlación ( $R^2$ ) y pendientes obtenidas tras el ajuste por regresión lineal simple de los porcentajes de inhibición de extravasación plasmática inducidos por cada agonista opioide.

| AGONISTAS<br>OPIOIDES | COEFICIENTE DE<br>CORRELACIÓN ( $R^2$ ) | PENDIENTE DE LA CURVA |
|-----------------------|---|-----------------------|
| $\mu$                 | MORFINA                                 | 0.936                 |
|                       | FENTANILO                               | 0.962                 |
|                       | PL017                                   | 0.903                 |
| $\delta$              | DPDPE                                   | 0.992                 |
|                       | SNC 80                                  | 0.823                 |

\*P<0.05, test *t* de Student. Las comparaciones se realizaron en relación a la pendiente de la morfina.

#### 2.4. Comparación de potencias relativas de los agonistas opioides $\mu$ y $\delta$ sobre la extravasación de plasma.

La comparación mediante ANOVA de las pendientes demostró la existencia de diferencias significativas entre ellas. Mediante el test *t* de Student para datos no apareados se compararon las pendientes correspondientes a cada curva dosis-respuesta en relación a la morfina. Los resultados pusieron de manifiesto la existencia de diferencias significativas (P<0.05) entre los distintos fármacos, indicando una falta de paralelismo entre ellos. Esto significa que la potencia relativa entre los dos fármacos comparados no se mantiene constante. En la tabla 21 se muestran las potencias relativas de cada uno de los agonistas utilizados en este estudio respecto a la morfina. Para el cálculo de las potencias relativas de

## **Resultados**

---

cada uno de los agonistas opioides vs. morfina, se dividió la dosis de morfina vs. la dosis de cada uno de los agonistas opioides restantes, correspondientes, ambas, al mismo nivel de efecto.

Se demostró que la morfina, el PL017 y el SNC 80 mantenían una relación de potencias constante (rectas paralelas), siendo el PL017 entre cinco y siete veces más potente que la morfina y el SNC 80 0.4 veces menos potente que aquella. El fentanilo resultó ser entre 11 y 24 veces más potente que la morfina, mientras que el DPDPE fue entre 5 y 18 veces más potente.

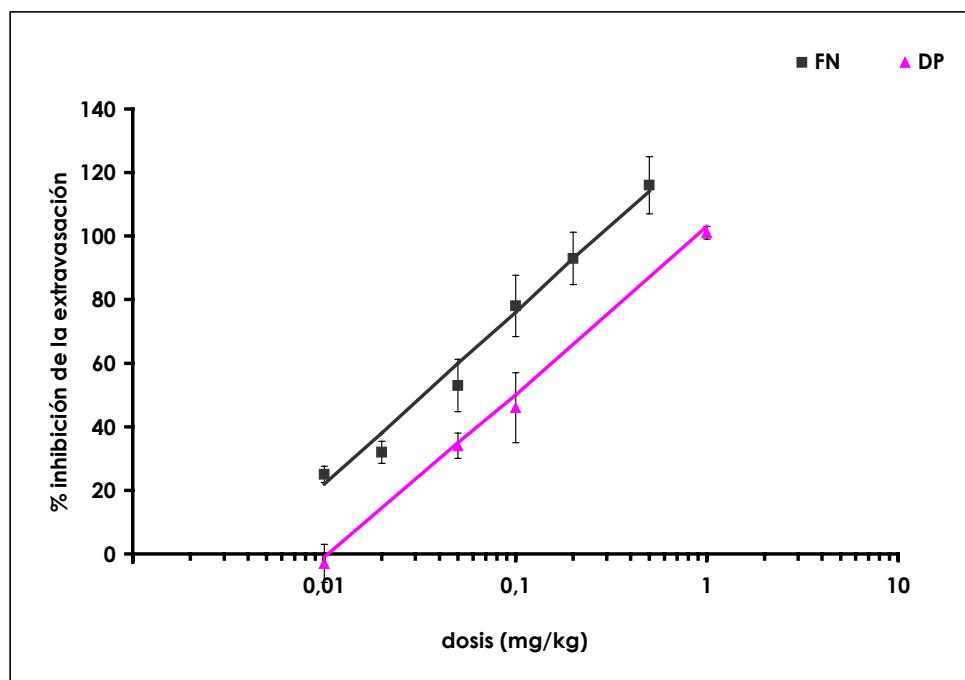
En la tabla 21, se representa la potencia relativa de morfina vs. fentanilo, PL017, DPDPE y SNC 80, respectivamente, a cada uno de los niveles de efecto (20, 50 y 80% de inhibición de extravasación de plasma).

**Tabla 21.** Potencia relativa respecto a morfina (1) de los agonistas opioides fentanilo, PL017, DPDPE y SNC80 al 20, 50 y 80% de efecto (% inhibición de la extravasación plasmática).

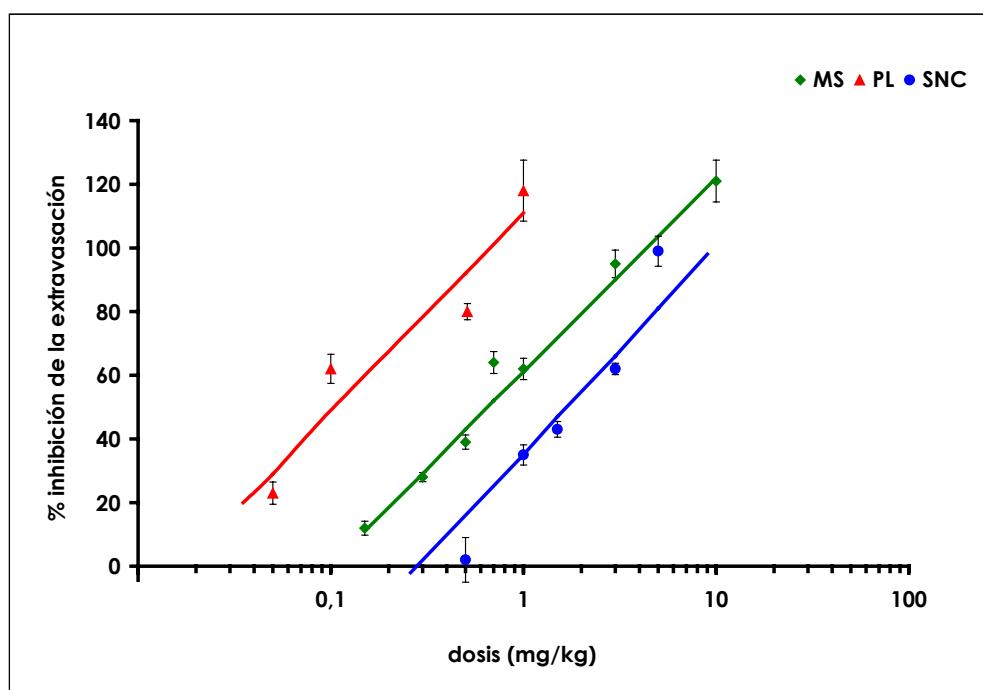
| FÁRMACOS                  | POTENCIA RELATIVA       |                        |                        |
|---------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
|                           | 20%                     | 50%                    | 80%                    |
| <b>MORFINA</b>            | 1                       | 1                      | 1                      |
| <b>FENTANIL<br/>PL017</b> | <b>24</b><br><b>7</b>   | <b>19</b><br><b>6</b>  | <b>11</b><br><b>5</b>  |
| <b>DPDPE<br/>SNC 80</b>   | <b>18</b><br><b>0,4</b> | <b>7</b><br><b>0,4</b> | <b>5</b><br><b>0,4</b> |

En las figuras 21 y 22 se representan gráficamente las curvas ajustadas a una recta y sólo la pendiente ascendente de las mismas, obtenidas tras la administración de morfina, fentanilo, PL017, DPDPE y SNC 80. Se han agrupado en una misma gráfica los fármacos con pendientes iguales.

**Figura 21** . Representación gráfica de los valores medios ± E.E.M. de la dosis de los agonistas fentanilo (FN) y DPDPE (DP) respecto al porcentaje de efecto (% inhibición de la extravasación).



**Figura 22** . Representación gráfica de los valores medios ± E.E.M. de la dosis de los agonistas morfina (MS), PL017 (PL) y SNC 80 (SNC) respecto al porcentaje de efecto (% inhibición de la extravasación).



En cada una de las gráficas no hay diferencias estadísticas entre los pendientes de las rectas representadas.

## **2.5. Reversión del efecto inhibidor de los opioides sobre la extravasación plasmática mediante antagonistas específicos.**

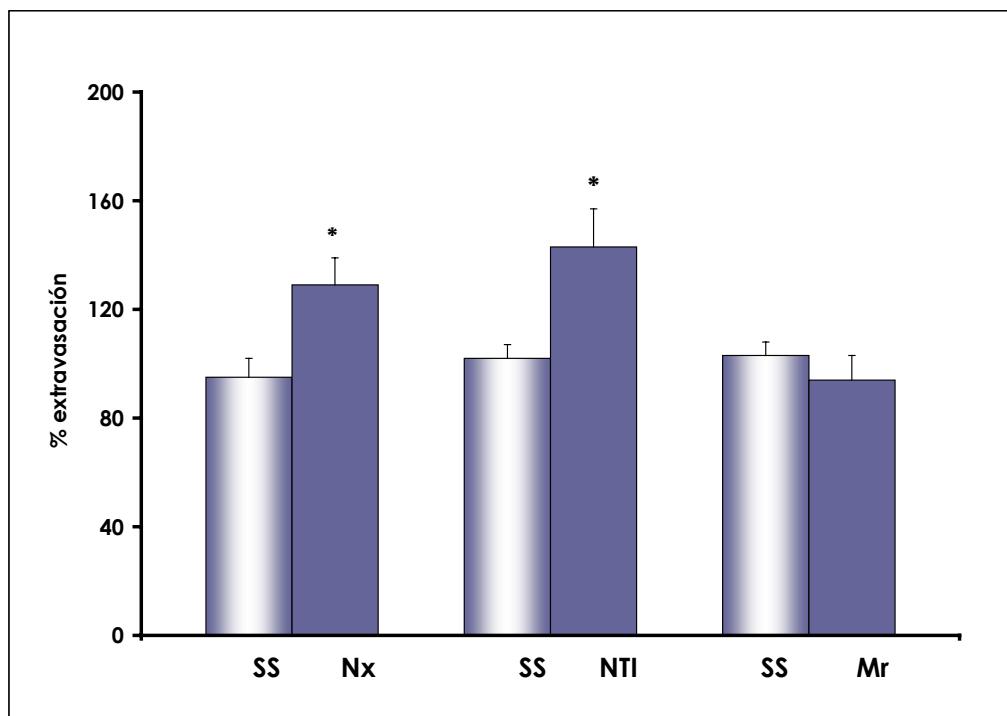
La capacidad casi nula de modificar el edema inflamatorio tras la administración de estos agonistas opioides nos llevó a centrar nuestro **interés** en el **efecto inhibidor** inducido por cada opioide sobre la **extravasación plasmática**.

Para confirmar la naturaleza opioide de este efecto anti-exudativo se administraron antagonistas opioides, específicos y no específicos para cada tipo de RO, con acciones tanto a nivel central como periférico (ver tabla 6 de Material y Métodos). Se utilizaron los siguientes antagonistas opioides: clorhidrato de naloxona (Nx), como antagonista no selectivo, a la dosis de  $1\text{mg}.\text{kg}^{-1}$ , naltrindol (NTI) como antagonista  $\delta$  y MR2266 (Mr) como antagonista  $\kappa$ , los dos últimos a dosis de  $3\text{ mg}.\text{kg}^{-1}$ . Los antagonistas se administraron por vía i.p., 15 minutos antes de los agonistas. El protocolo experimental se describe en el apartado de Material y Métodos.

Se valoraron los efectos de cada uno de los antagonistas, administrados individualmente (en ausencia de agonista) sobre la extravasación plasmática y se compararon con grupos control (animales que recibieron SS, por la misma vía, y al mismo volumen). Los resultados se representan en la figura 23 en forma de histogramas.

Tras la administración de los antagonistas clorhidrato de naloxona (Nx) y naltrindol (NTI) se observó que ambos inducían un aumento significativo de la extravasación plasmática durante la inflamación aguda. Estos porcentajes fueron significativamente distintos a los obtenidos por sus respectivos grupos control ( $P<0.01$ ). En el caso de naloxona, se llegaron a porcentajes del 129%, superando en más del 30 % a su correspondiente grupo control, mientras que con la administración de naltrindol se consiguió aumentar, en más de un 40%, el porcentaje de extravasación plasmática ( $P<0.01$ ).

**Figura 23.** Porcentajes de extravasación plasmática obtenidos tras la administración de clorhidrato de naloxona (Nx), naltrindol (NTI) y MR2266 (Mr), tres horas después de inducir la inflamación por carragenina.



Las dosis de antagonistas Nx, NTI o Mr administradas por vía i.p., fueron de 1, 3 y 3 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Cada columna representa la media ± E.E.M. de 10 animales. Cada antagonista se comparó estadísticamente con su correspondiente grupo control (SS).

\*P<0.01 (test t de Student).

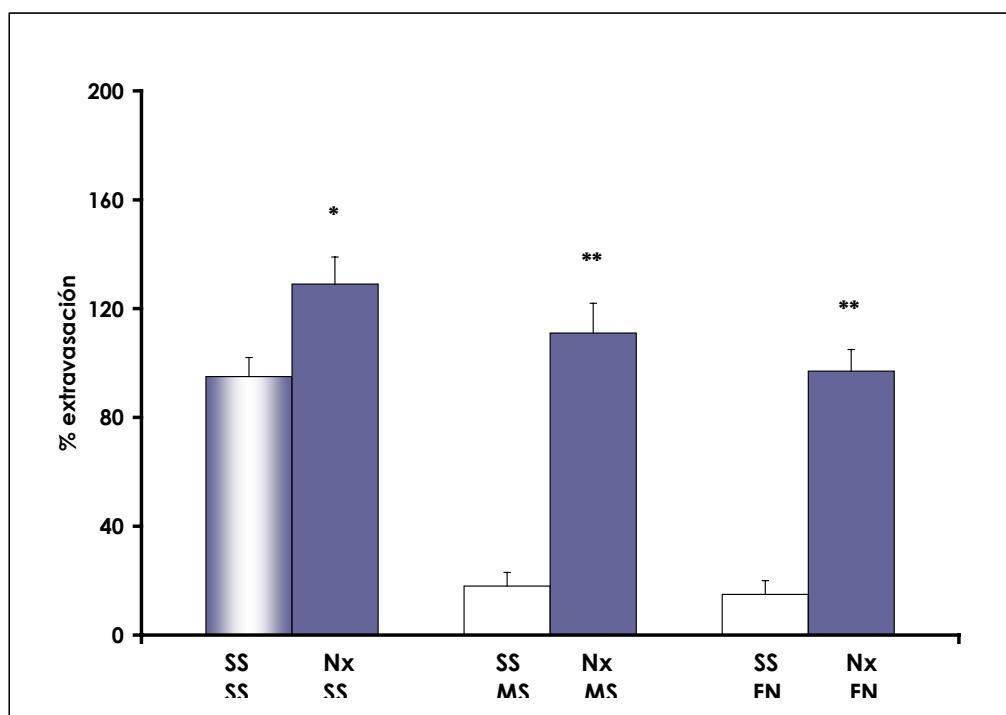
La administración del antagonista kappa, MR2266 (Mr), en las mismas condiciones experimentales, no alteró los porcentajes de extravasación plasmática con un valor medio del 94%, comparable al de su grupo control (103%). Estos resultados sugieren una mayor participación de opioides endógenos con acción  $\mu$  y  $\delta$  en la modulación inhibidora del proceso inflamatorio agudo.

A continuación se valoraron los efectos de cada uno de los agonistas en presencia del antagonista específico. Las dosis de antagonistas fueron las utilizadas en el anterior experimento, esto es: 1, 3 y 3 mg.kg<sup>-1</sup> para Nx, NTI y Mr, respectivamente, mientras que los agonistas morfina, fentanilo, DPDPE y SNC 80 se administraron a sus correspondientes DE<sub>80</sub>: 1.92, 0.18, 0.36 y 5.03 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente. En el caso concreto de U-50,488H se administraron 0.5 mg.kg<sup>-1</sup> de dicho fármaco. La vía y momento de administración fueron las descritas en la metodología de trabajo (ver el apartado de Material y Métodos). En la figura 24 se muestran los resultados correspondientes a la reversión de los efectos inhibidores de

## Resultados

morfina y fentanilo sobre la extravasación plasmática. En ambos casos, la administración de clorhidrato de naloxona (Nx) provocó la pérdida del efecto antiexudativo inducido por estos opioides en más del 80%. No se detectaron diferencias entre los grupos tratados con el antagonista, sólo o combinado con cada uno de los agonistas  $\mu$ .

**Figura 24.** Porcentajes de extravasación plasmática obtenidos al antagonizar con clorhidrato de naloxona (Nx) los efectos inhibidores de los agonistas  $\mu$  morfina (MS) y fentanilo (FN).

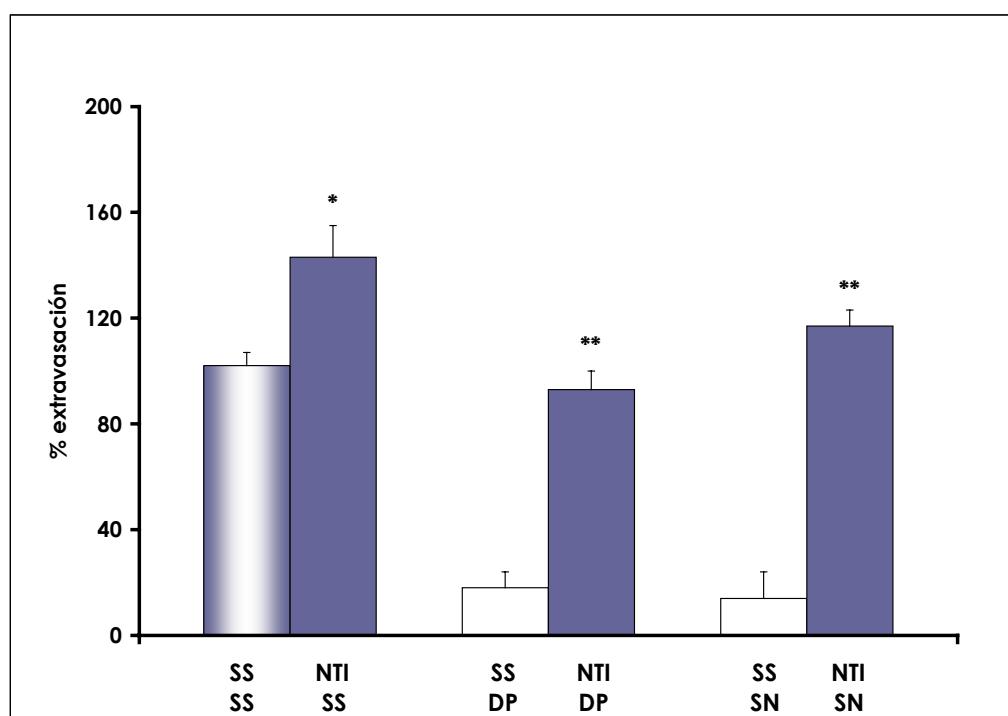


El antagonista Nx se administró por vía i.p. a la dosis de  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Las dosis de agonistas administrados fueron sus respectivas  $\text{DE}_{80}$ . Cada columna representa la media  $\pm$  E.E.M., de entre 6 y 10 animales. \* $P<0.01$ ; \*\* $P<0.001$  (test *t* de Student), en relación a los grupos control (SS).

Los efectos antiexudativos de los agonistas  $\delta$ , DPDPE y SNC 80, fueron revertidos mediante la administración de NTI (figura 25). A la dosis de  $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de NTI sólo se consiguió revertir el 40% del efecto inhibidor del DPDPE, (estos resultados no se muestran). Sin embargo los efectos fueron revertidos completamente al incrementar la dosis del antagonista a  $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . La reversión parcial del DPDPE (agonista  $\delta_1$ ) podría estar en relación con la afinidad de los fármacos por los distintos subtipos de RO  $\delta$ . La comparación estadística mediante el test *t* de Student demostró que no había diferencias entre el grupo control SS/SS y el grupo de tratamiento NTI/DP.

En cuanto a la combinación NTI/SNC 80, no fue necesario aumentar la dosis de antagonista, teniendo en cuenta que el agonista SNC 80 tiene una especificidad por los RO  $\delta$  no selectiva en cuanto a subtipos se refiere. Los resultados obtenidos revelaron la pérdida completa del efecto inhibidor sobre la extravasación de plasma que este agonista era capaz de provocar, no detectándose diferencias entre el grupo control SS/SS y el grupo tratado con la combinación NTI/SN.

**Figura 25.** Porcentajes de extravasación de plasma obtenidos al antagonizar con naltrindol (NTI) los efectos antiexudativos de los agonistas  $\delta$  DPDPE (DP) y SNC 80 (SN).



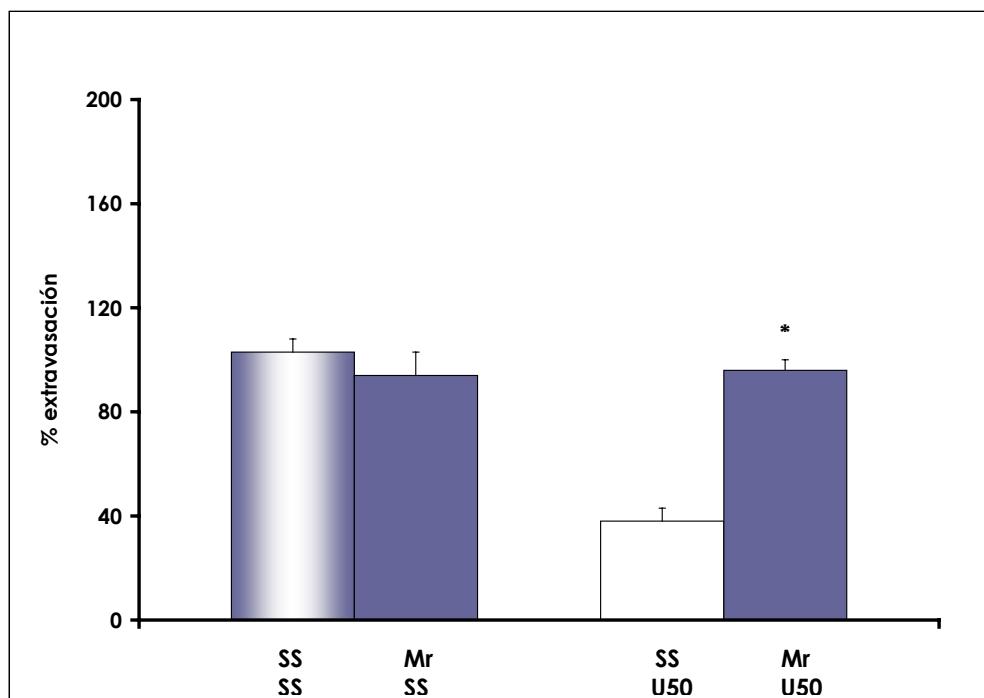
Se emplearon 6 y 3 mg.kg<sup>-1</sup> de NTI, administrado por vía i.p., para antagonizar el efecto del DPDPE y del SNC 80, respectivamente. Cada uno de los agonistas se administró, por vía s.c., a sus respectivas DE<sub>80</sub>. Cada columna representa la media  $\pm$  E.E.M., de entre 6 y 10 animales.\*P<0.05; \*\*P<0.01 (test t de Student), en relación a los grupos control (SS).

Por último, en la figura 26, se muestran los resultados obtenidos tras la administración del antagonista  $\kappa$ -selectivo, MR2266, en ausencia de agonista (Mr/SS) y en combinación con el agonista específico para este RO, U-50,488H (Mr/U50). El agonista  $\kappa$ , U-50,488H a la dosis de 0.5 mg.kg<sup>-1</sup> inhibió la extravasación plasmática en un 38%, y la administración previa del antagonista MR2266, revirtió este efecto hasta llegar a porcentajes de proteína en el tejido inflamado del 96% comparables a los obtenidos con el grupo control (SS, 103%).

## Resultados

---

**Figura 26.** Porcentajes de extravasación plasmática obtenidos al antagonizar el efecto inhibidor del agonista  $\kappa$  opioide U-50,488H (U50) con MR2266 (Mr).



El antagonista MR2266 (Mr) se administró, por vía i.p., a la dosis de  $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . La dosis de agonista U-50,488H, administrado por vía s.c., fue de  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Cada columna representa la media  $\pm$  E.E.M., de entre seis y 10 animales.\* $P<0.01$  (test *t* de Student), en relación a los grupos control (SS).

## **2.6. Efecto inhibidor de los opioides sobre la extravasación plasmática: valoración del componente periférico.**

Para evaluar la participación de los RO expresados en tejidos periféricos en el efecto inhibidor de los agonistas opioides sobre la extravasación plasmática se utilizaron fármacos de acción periférica, tanto agonistas como antagonistas.

Inicialmente, se valoró el efecto del agonista periférico  $\mu$  selectivo, PL017 (figura 27). Este fármaco tiene, por su elevado peso molecular y naturaleza peptídica, una capacidad limitada para atravesar la BHE. Por ese motivo permanece en el compartimento periférico tras haber sido administrado por vía s.c. Esto permite excluir la participación en la respuesta anti-exudativa de aquellos RO expresados en estructuras centrales como el cerebro y la médula espinal.

A continuación, se valoraron los efectos de los agonistas  $\mu$ , morfina, fentanilo y PL017, y los agonistas  $\delta$  DPDPE y SNC 80 en presencia 1) del antagonista opioide no selectivo, metilyoduro de naloxona (figuras 28 y 29), administrado por vía i.p. Su distribución es predominantemente periférica, ya que el grupo metilo presente en su estructura química reduce su capacidad para atravesar la BHE; y 2) el octapéptido sintético CTOP (figura 30), antagonista  $\mu$  selectivo que, por las mismas razones que PL017, ejerce una acción predominantemente periférica. Los efectos de morfina y PL017 fueron valorados al administrarse previamente este último antagonista, el CTOP.

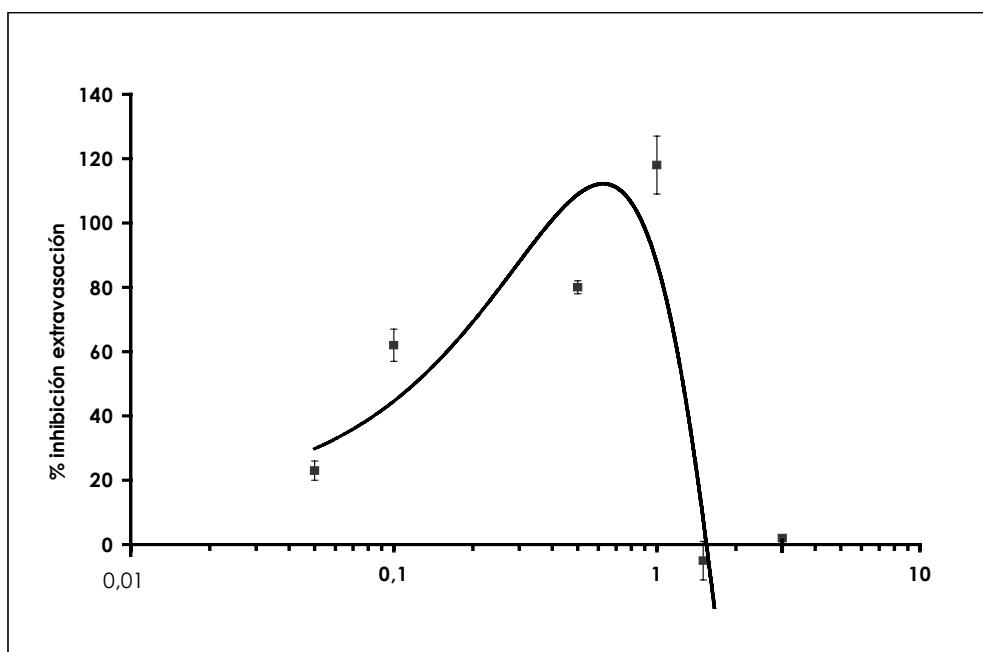
## **Resultados**

---

- **PL017:** El efecto obtenido tras la administración de este agonista selectivo sobre el edema y la extravasación plasmática fue el mismo que con los anteriores agonistas. Es decir, la administración de este fármaco, por vía s.c., en un rango de dosis comprendido entre 0.05 y 1 mg.kg<sup>-1</sup> no indujo cambios en los porcentajes de edema, manteniendo los mismos niveles de edema que los obtenidos con el grupo control (SS), esto es, alrededor del 80% de edema. Destacamos que a dosis superiores a 1 mg.kg<sup>-1</sup> (exactamente a 1.5 y 3 mg.kg<sup>-1</sup>), el fármaco manifestó un efecto proedematoso al comparar dichos porcentajes con el grupo control ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ , *t* de Student).

En cuanto al efecto del PL017 sobre la extravasación de plasma, este fármaco inducía, a las dosis de 0.05, 0.1, 0.5 y 1 mg.kg<sup>-1</sup>, una inhibición dosis-dependiente de la misma, significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.001$ ) de los valores obtenidos en el grupo control (SS). Sin embargo, al aumentar la dosis del fármaco hasta 1.5 y 3 mg.kg<sup>-1</sup>, el efecto inhibidor desapareció, recuperando niveles de extravasación plasmática comparables al porcentaje obtenido con el grupo control (SS). En la figura 27 se puede apreciar una curva bifásica similar a las obtenidas en anteriores experimentos en los que se emplearon morfina, fentanilo, DPDPE y SNC 80. Las dosis 0.05, 0.1 y 0.5 mg.kg<sup>-1</sup> definieron la pendiente ascendente de la curva con unos porcentajes de inhibición que oscilaron entre el 20 y 80% de efecto. El efecto máximo de inhibición de la extravasación de plasma, esto es, el 100%, se consiguió a la dosis de 1 mg.kg<sup>-1</sup>. A partir de aquí, el incremento de fármaco llevó a la pérdida del efecto antiexudativo, recuperando niveles de porcentajes comparables a los obtenidos con el grupo control (SS; 100% de exudado plasmático).

**Figura 27.** Efecto bifásico del agonista  $\mu$  de acción periférica PL017 sobre la inhibición de la extravasación plasmática, expresada en porcentajes (%), a las tres horas de la inducción de la inflamación por carragenina.



El rango de dosis administradas por vía s.c., está comprendido entre 0.05 y 3  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Cada punto representa la media  $\pm$  E.E.M., de 8 animales.

El cálculo de los valores correspondientes a las  $\text{DE}_{20}$ ,  $\text{DE}_{50}$ ,  $\text{DE}_{80}$  y  $E_{\max}$  se realizó de la misma manera que con los agonistas opioides anteriores, esto es, a partir del ajuste a una regresión lineal simple de los porcentajes de inhibición de extravasación de plasma correspondientes sólo a la pendiente ascendente. La recta media que se obtuvo se caracterizó por un  $R^2$  de 0.903 y una pendiente de  $62.32 \pm 3.20$ . En la tabla 19 se muestran los valores medios correspondientes a cada uno de los niveles de efecto, estos es al 20, 50 y 80% de efecto inhibidor de la extravasación plasmática.

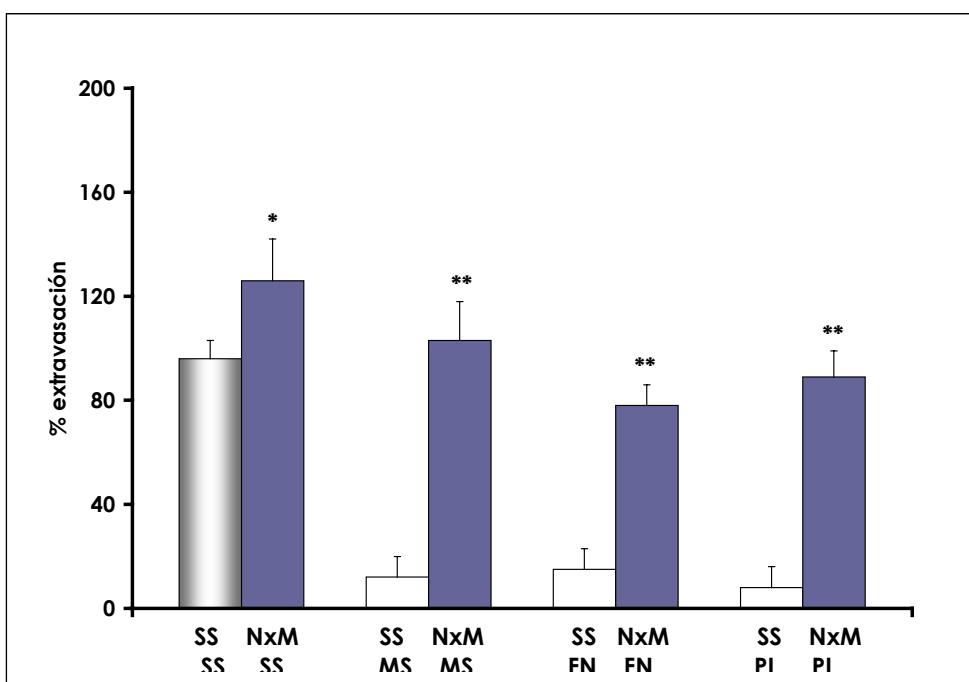
- **METILYODURO de NALOXONA:** La reversión de los efectos inhibidores de los agonistas opioides  $\mu$  y  $\delta$ , por metilyoduro de naloxona (NxMet) se realizó tras la administración de morfina, fentanilo, PL017, DPDPE y SNC 80, a sus  $\text{DE}_{80}$ . La dosis empleada de NxMet fue de 1  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , que se administró 15 minutos antes que los agonistas (ver Material y Métodos).

En la figura 28 se muestra como la administración individual de este antagonista, produjo un incremento de exudado plasmático significativo del 29% con respecto al control (SS/SS) ( $P<0.05$ ). Los porcentajes de exudado plasmático

## Resultados

obtenidos tras la administración de morfina, fentanilo y PL017 en ausencia de antagonista no superaron el 20%, siendo significativamente diferentes del grupo control SS/SS ( $P<0.001$ ). La administración del antagonista NxMet revirtió en más del 60% el efecto inhibidor de los agonistas. Los porcentajes de extravasación plasmática estuvieron comprendidos entre el 89 y el 103% y no mostraron diferencias significativas al ser comparados con el grupo control SS/SS (test  $t$  de Student), ni entre ellos (ANOVA de un factor).

**Figura 28.** Porcentajes de extravasación plasmática obtenidos tras la administración de los agonistas morfina (MS), fentanilo (FN) y PL017 (PL) en presencia de SS o metilioduro de naloxona (NxM).

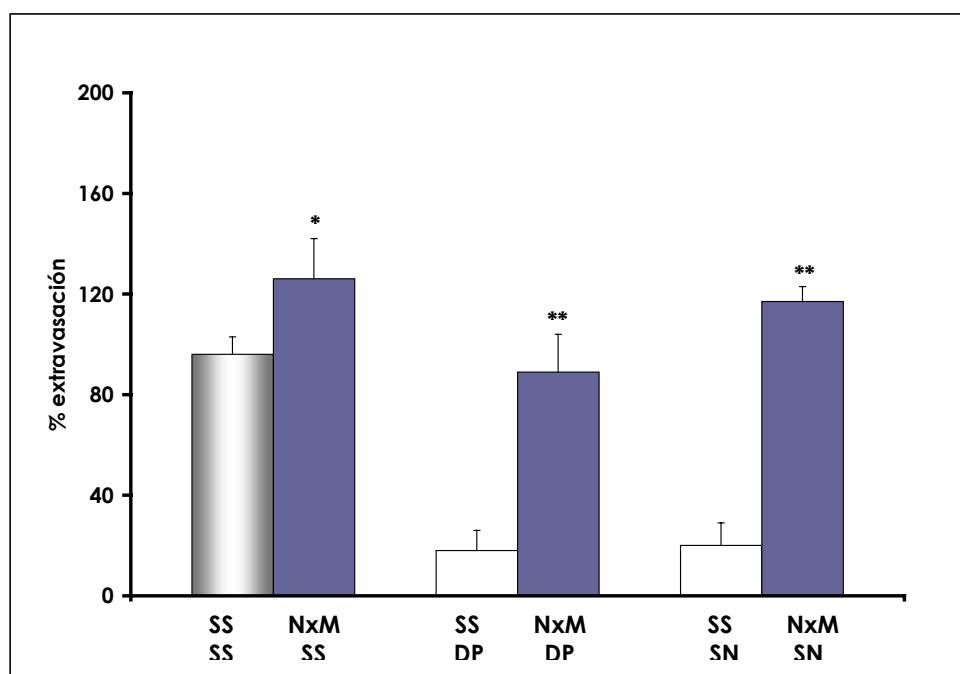


El antagonista NxM se administró a la dosis de  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , por vía i.p., mientras que los agonistas se administraron a sus correspondientes  $\text{DE}_{80}$ , por vía s.c. Cada columna representa la media  $\pm$  E.E.M., de entre 6 y 10 animales. \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.001$  (test  $t$  de Student), en relación a los grupos control (SS).

Para conseguir porcentajes de reversión del agonista  $\delta_1$  DPDPE del 80% fue necesario aumentar la dosis de antagonista hasta los  $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (figura 29). A la dosis de  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , se obtuvo la reversión parcial del DPDPE, que no superó el 26% de extravasación plasmática (resultados no presentados gráficamente), mientras, en el caso del agonista  $\delta_{1-2}$  SNC 80, la reversión fue total con ambas dosis de antagonista (figura 29). El NxMet es un antagonista periférico no selectivo, pero en función de la

dosis, los primeros RO bloqueados son los  $\mu$ , seguidos de los  $\delta$  y de los  $\kappa$ . La relación de potencia entre Nx y NxMet es de 1:3, de manera que para conseguir revertir este agonista  $\delta_1$  fue necesario forzar la dosis. Estos resultados sugieren que los efectos inhibidores de los agonistas opioides sobre la extravasación de plasma se producen en su mayor parte por interacción de RO  $\mu$  y  $\delta$  selectivos, localizados en estructuras periféricas, sin que los presentes experimentos puedan diferenciar si los RO son neuronales y/o extraneuronales.

**Figura 29.** Porcentajes de extravasación plasmática obtenidos tras la administración de los agonistas DPDPE (DP) y SNC 80 (SN) en presencia de SS o metilioduro de naloxona (NxM).



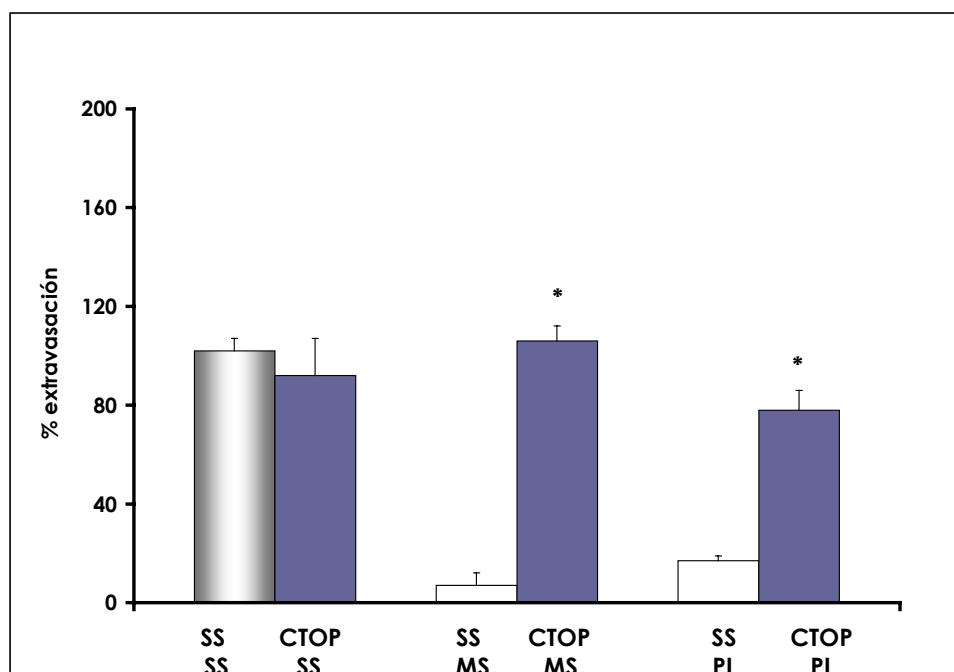
El antagonista NxM se administró a la dosis de 3 ó 1 mg.kg<sup>-1</sup>, por vía i.p., para la reversión de los efectos de los agonistas DPDPE o SNC 80, respectivamente. Estos últimos se administraron a sus correspondientes DE<sub>80</sub>, por vía s.c. Cada columna representa la media  $\pm$  E.E.M., de entre 6 y 10 animales. \*P<0.05; \*\*P<0.001 (test t de Student), en relación a los grupos control (SS).

- **CTOP:** Mediante el empleo de este antagonista peptídico  $\mu$  selectivo, con acción predominantemente periférica, se intentó aportar más datos que corroboraran la participación de los RO periféricos en el efecto inhibidor sobre la extravasación plasmática inducido por los agonistas opioides. Se valoró la reversión del efecto inhibidor de la morfina y el PL017 administrando previamente el

## Resultados

antagonista CTOP, a la dosis de  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , por vía i.p., 15 minutos antes que los agonistas (ver Material y Métodos). Las dosis empleadas de agonistas, administrados por vía s.c., fueron sus respectivas DE<sub>80</sub>. Los resultados muestran que la administración de CTOP en ausencia de agonistas (CTOP/SS) no modificaba el porcentaje de exudado plasmático (92%) obtenido en condiciones de inflamación aguda (figura 30), siendo comparables a los obtenidos en el grupo control SS/SS (102%). Los porcentajes de extravasación de los agonistas solos fueron comparables a los obtenidos en experimentos anteriores (7 y 17% para la morfina y el PL017, respectivamente) siendo estadísticamente distintos ( $P < 0.001$ , *t* de Student) de los grupos control (SS y CTOP). Tal como se muestra en la figura 30, la administración de CTOP revirtió los efectos inhibidores de morfina y de PL017 sobre la extravasación de plasma, mostrando valores del 106 y 78% de exudación plasmática respectivamente, porcentajes que no difirieron de los obtenidos en los grupos control (tanto SS/SS como CTOP/SS).

**Figura 30.** Porcentajes de extravasación plasmática obtenidos tras administrar morfina (MS) o PL017 (PL) en presencia de SS o del antagonista  $\mu$  selectivo, de acción periférica, CTOP.



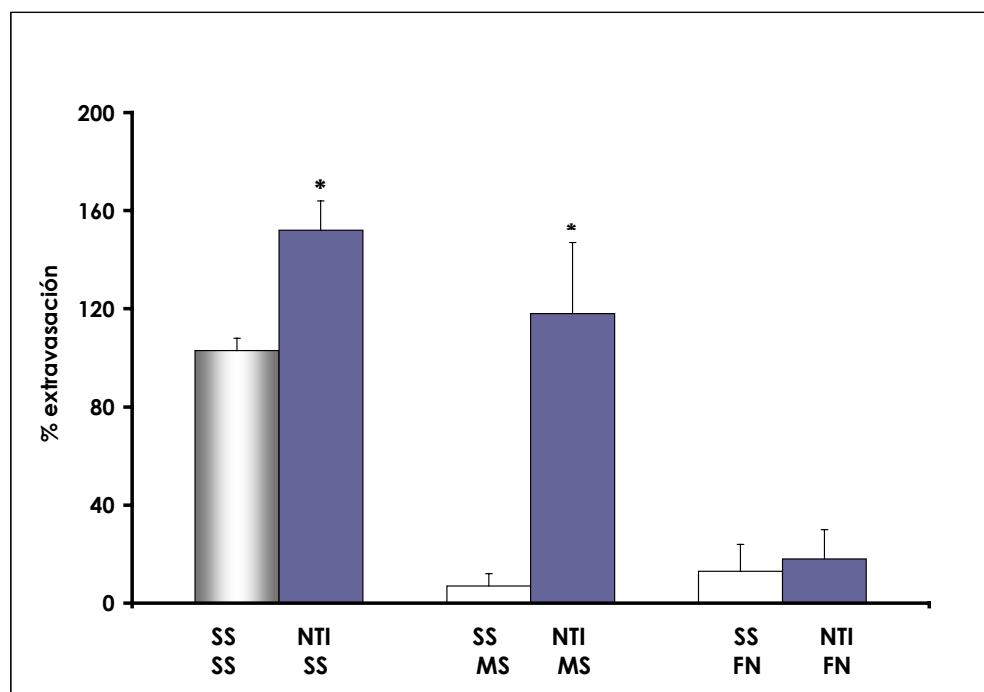
La dosis de CTOP, administrado por vía i.p., fue de  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Los agonistas se administraron a sus correspondientes DE<sub>80</sub>, por vía s.c. Cada columna representa la media  $\pm$  E.E.M., de entre 6 y 10 animales. \* $P < 0.001$  (*t* test de Student), en relación a los grupos control (SS).

## 2.7. Reversión del efecto antiexudativo de la morfina y el fentanilo (**agonistas $\mu$** ) por el antagonista $\delta_2$ -selectivo naltrindol (NTI).

Se ha postulado que la morfina posee acción sobre los receptores  $\mu$  y  $\delta$ . Por este motivo realizamos un grupo de experimentos orientados a establecer el antagonismo del efecto de la morfina por el NTI. Se utilizaron seis grupos de animales que recibieron 3 mg.kg<sup>-1</sup> del antagonista  $\delta_2$  selectivo naltrindol (NTI), por vía i.p., mientras que los agonistas morfina y fentanilo se administraron a sus correspondientes DE<sub>80</sub> (figura 31).

Los resultados muestran que el antagonista selectivo  $\delta_2$  NTI revertía completamente el efecto inhibidor de la morfina sobre la extravasación de plasma ( $P<0.001$ ). No se detectaron diferencias significativas entre el grupo NTI/MS y los dos grupo control (SS/SS y NTI/SS).

**Figura 31.** Porcentajes de extravasación plasmática obtenidos tras la administración de los agonistas opioides morfina (MS) y fentanilo (FN) en presencia de SS o del antagonista  $\delta_2$  selectivo naltrindol (NTI).



El antagonista se administró, por vía i.p., a la dosis de 3 mg.kg<sup>-1</sup>, mientras que los agonistas se administraron por vía s.c. a sus correspondientes DE<sub>80</sub>. Cada columna representa la media ± E.E.M. de entre 6 y 10 animales. \*P<0.001 (test t de Student), en relación a los grupos control (SS).

## **Resultados**

---

Sin embargo, el fentanilo mantuvo su efecto antiexudativo, detectándose diferencias significativas con respecto a los grupos control SS/SS y CTOP/SS ( $P<0.001$ ). Así pues, el bloqueo de los RO  $\delta_2$  con 3 mg.kg $^{-1}$  de naltrindol, impide que la morfina, administrada a su DE<sub>80</sub> (1.92 mg.kg $^{-1}$ ), por vía s.c., sea capaz de inhibir la extravasación plasmática, mientras que, el fentanilo, administrado a su DE<sub>80</sub> (0.18 mg.kg $^{-1}$ ) y por la misma vía, mantiene su efecto inhibidor (ver figura 31).

### **3. LOCALIZACIÓN DE LOS RO PERIFÉRICOS IMPLICADOS EN EL EFECTO INHIBIDOR DE LOS AGONISTAS OPIOIDES SOBRE LA EXTRAVASACIÓN PLASMÁTICA.**

De los resultados hasta el momento presentados se podría concluir que los receptores  $\mu$  y  $\delta$  periféricos desempeñan un papel más importante que los  $\kappa$  disminuyendo la extravasación plasmática durante la respuesta inflamatoria aguda. Estos efectos antiexudativos observados están mediados por RO expresados principalmente en estructuras anatómicas periféricas. Para establecer la localización de los RO en las distintas estructuras se llevaron a cabo una serie de experimentos que nos permitieron descartar, mediante tratamientos selectivos, los distintos componentes tanto neuronales como no neuronales, implicados en la respuesta inflamatoria local aguda.

#### **3.1. Valoración del componente nervioso sensorial: efecto del pretratamiento con la neurotoxina capsaicina.**

Con el fin de estudiar el papel desempeñado por las fibras sensoriales periféricas aferentes en la modulación de la extravasación plasmática se realizaron experimentos en animales tratados con capsaicina (CAP), sustancia neurotóxica que induce una degeneración selectiva de las fibras aferentes sensoriales (ver el apartado de Material y Métodos). Primero, se evaluó cómo el tratamiento crónico con CAP modificaba la respuesta inflamatoria aguda. Seguidamente, se valoró la eficacia de dicho tratamiento mediante el test de hiperalgesia mecánica Randall-Selitto y por inmunohistoquímica.

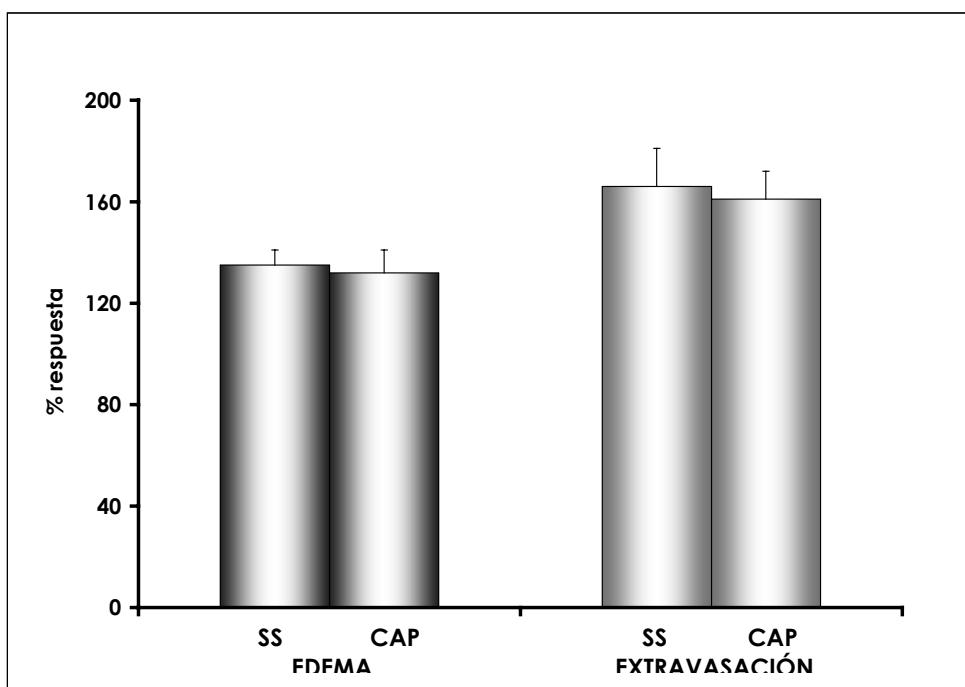
##### **3.1.1. Efecto del tratamiento con capsaicina sobre la extravasación plasmática y el edema.**

Para estudiar el efecto del tratamiento con CAP sobre el edema y la extravasación plasmática durante la inflamación aguda, se utilizaron 20 animales, distribuidos en dos grupos, de 10 animales cada uno: el grupo SS (grupo control, animales tratados con solución salina) y el grupo CAP (animales tratados con capsaicina). En ambos grupos se valoró el edema y la extravasación de plasma. La inyección de ambas soluciones se realizó por vía s.c., en la zona costal, con los animales anestesiados.

## Resultados

Tal como se observa en la figura 32, el tratamiento con CAP provocó unos porcentajes de edema y de extravasación plasmática del 132 y 161%, respectivamente, durante la respuesta inflamatoria aguda. Estos valores no resultaron distintos al compararse con los porcentajes obtenidos en sus respectivos grupos control, esto es, 135 y 166%, respectivamente. Estos resultados sugieren que las terminaciones sensoriales no desempeñan un papel principal sobre la modulación de la extravasación durante la inflamación aguda.

**Figura 32.** Efecto del tratamiento con solución salina (SS) o capsaicina (CAP) sobre el edema y la extravasación plasmática en condiciones de inflamación aguda.



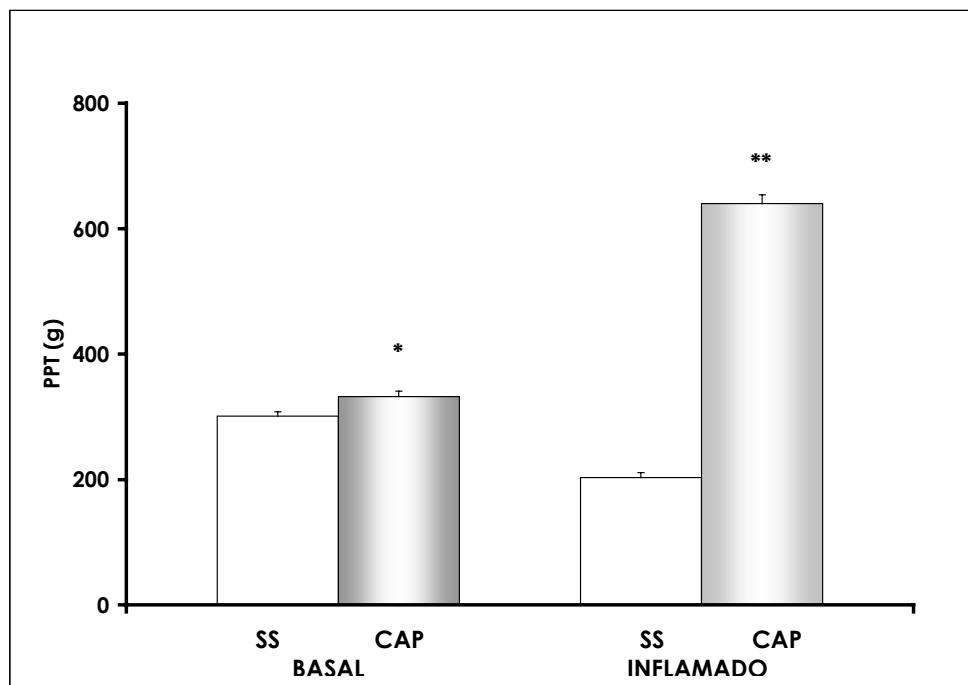
Cada tratamiento, representado en columnas, es la media  $\pm$  E.E.M. de 10 animales.

### 3.1.2. Test de nocicepción mecánica (Randall-Selitto).

En la figura 33 se muestran los resultados obtenidos en animales control (SS) y tratados con capasicina (CAP) tras valorar la hiperalgesia mecánica. Estos resultados muestran la eficacia del tratamiento con CAP para eliminar/disminuir la población de terminaciones nociceptivas en nuestras condiciones experimentales. En el grupo control (SS) la inflamación disminuyó de forma significativa los gramos de presión tolerados por los animales ( $P<0.001$ ,  $t$  de Student), demostrando la

presencia de hiperalgesia mecánica. En animales tratados con CAP el animal puede soportar más gramos de presión, tanto en ausencia (332 g) como en presencia de inflamación aguda (640 g), debido a que la población de fibras sensoriales periféricas está disminuída.

**Figura 33.** Valores de PPT (Paw pressure threshold) obtenidos antes (basal) y después (inflamado) de inducir la inflamación aguda con carragenina.



Para cada tratamiento (SS o CAP) las columnas representan la media ± E.E.M. de 6 animales. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre los grupos SS y CAP en situación basal o inflamatoria. \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.001$  (test *t* de Student). Entre los dos grupos SS se detectaron diferencias significativas ( $P<0.001$ ) debido a la hiperalgesia mecánica.

### 3.1.3. Determinación del efecto del tratamiento con capsaicina mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Las figuras 34 y 35 muestran el resultado del estudio morfológico realizado en tejido plantar procedentes de animales control (SS) y de animales tratados con capsaicina (CAP). Las tinciones con los anticuerpos anti-SP y anti-CGRP definen específicamente las fibras que expresan los péptidos proinflamatorios SP y CGRP, ambos implicados en la respuesta neuronal nociceptiva.

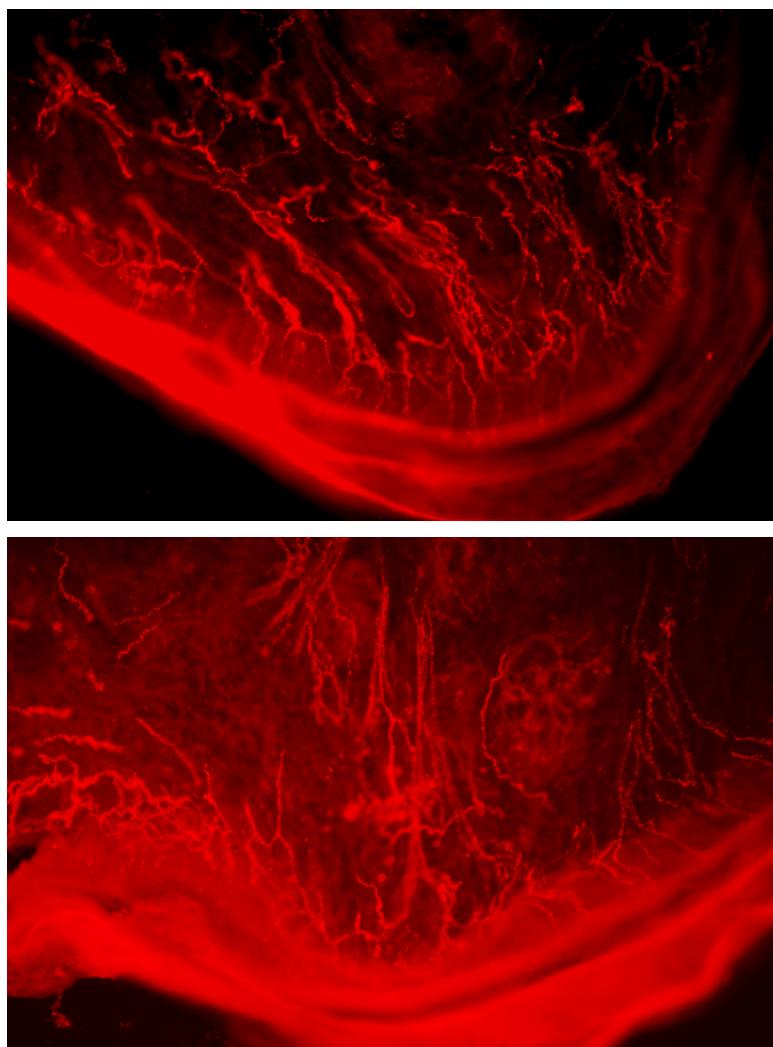
La figura 34 muestra el tejido control, mientras que la figura 35 corresponde a muestras de animales tratados con CAP. Podemos distinguir una zona apical

## Resultados

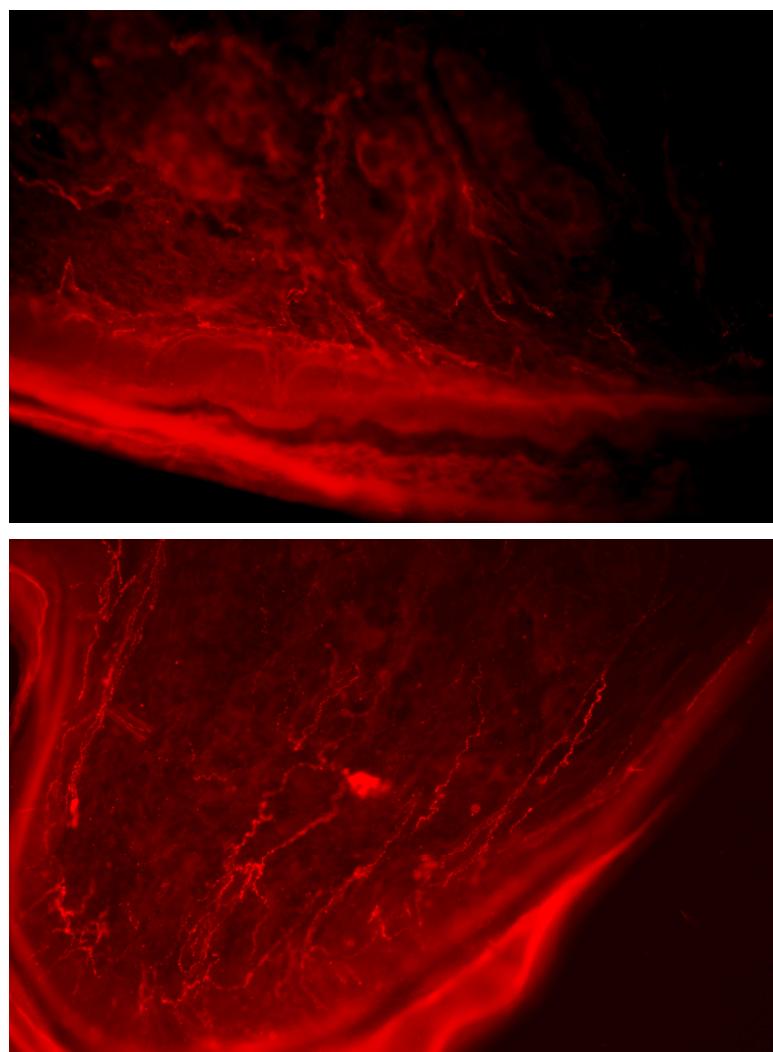
---

correspondiente a la epidermis del tejido plantar y otra más interna. Es en la primera zona donde se aprecia la pérdida de fibras sensoriales que llegan hasta ella por la disminución en la fluorescencia de las muestras. Estos resultados, junto con los obtenidos en la evaluación de la hiperalgesia corroboraron la eficacia del tratamiento degenerativo con CAP que lleva a una pérdida de fibras sensoriales aferentes primarias.

**Figura 34.** Inmunofluorescencia de muestras plantares obtenidas de animales tratados con solución salina (grupo control, SS).



**Figura 35.** Inmunofluorescencia de muestras plantares obtenidas de animales tratados con la neurotoxina capsaicina (grupo CAP).



## Resultados

### 3.1.4. Efecto de los agonistas opioides sobre la extravasación de plasma en animales tratados con capsaicina.

Para realizar este experimento se utilizaron animales distribuidos en dos grupos: el grupo SS (animales tratados con solución salina) y el grupo CAP (animales tratados con capsaicina). En ambos grupos se evaluó el efecto de los agonistas morfina (MS), fentanilo (FN) y DPDPE (DP), empleándose entre seis y 10 animales para cada uno de los opioides estudiados. Las dosis administradas de opioides fueron sus correspondientes DE<sub>80</sub>. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 22.

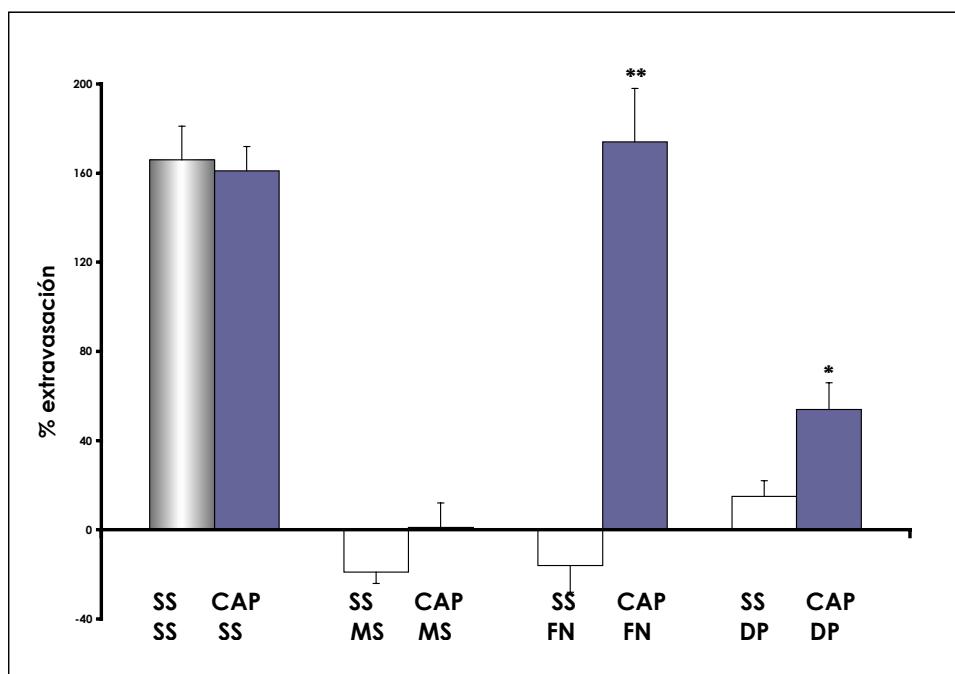
**Tabla 22.** Efecto de los agonistas opioides morfina (MS), fentanilo (FN) y DPDPE (DP) sobre la extravasación plasmática en animales tratados con capsaicina (CAP).

| TRATAMIENTO                     | EXTRAVASACIÓN PLASMÁTICA (%) | P      |
|---------------------------------|------------------------------|--------|
| <u>Control</u>                  |                              |        |
| Salino (SS)<br>Capsaicina (CAP) | 166 ± 15<br>161 ± 12         | NS     |
| <u>Morfina (MS)</u>             |                              |        |
| Salino (SS)<br>Capsaicina (CAP) | -20 ± 5<br>0 ± 10            | NS     |
| ○<br><u>Fentanilo (FN)</u>      |                              |        |
| Salino (SS)<br>Capsaicina (CAP) | -16 ± 12<br>174 ± 24         | <0.001 |
| ○<br><u>DPDPE (DP)</u>          |                              |        |
| Salino (SS)<br>Capsaicina (CAP) | 15 ± 12<br>54 ± 7            | <0.001 |

P (nivel de significación estadística). NS (no significativo). La comparación estadística se realizó entre los distintos grupos CAP a los que se les administró cada uno de los agonistas en cuestión vs. su correspondiente grupo control SS, mediante el test t de Student.

En la figura 36 se representan los distintos porcentajes de extravasación (tabla 22) en forma de histogramas obtenidos tras la administración de agonistas  $\mu$  o  $\delta$  en animales tratados con CAP. Se observó que mientras la morfina mantenía su efecto inhibidor sobre la extravasación plasmática en animales tratados con CAP, el fentanilo perdió completamente dicho efecto. El porcentaje de extravasación obtenido con este último agonista fue de 174%, similar a la media del valor de extravasación plasmática cuantificada en los animales pertenecientes al grupo control SS (166%) o CAP (161%). El efecto inhibidor del agonista  $\delta_1$  selectivo, DPDPE en animales tratados con CAP, se vio modificado significativamente ( $P<0.05$ ). No obstante, mantuvo en poco más del 60% su capacidad inhibidora en la formación de exudado en el tejido lesionado.

**Figura 36.** Porcentajes de extravasación plasmática obtenidos en animales tratados con solución salina (SS) o capsacina (CAP) a los que se les administró morfina (MS), fentanilo (FN) o DPDPE (DP).



Cada columna representa la media  $\pm$  E.E.M. de 6 -10 animales. La comparación estadística se realizó entre los distintos grupos tratados con CAP a los que se les administró cada uno de los agonistas vs. su correspondiente grupo control SS, mediante el test *t* de Student. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.001$ .

Los resultados obtenidos muestran que la pérdida de fibras sensoriales modifica la respuesta de los agonistas  $\mu$  y  $\delta$  selectivos como el fentanilo y el DPDPE, pero no la capacidad de inhibir la extravasación plasmática de otro agonista  $\mu$  como es la morfina.

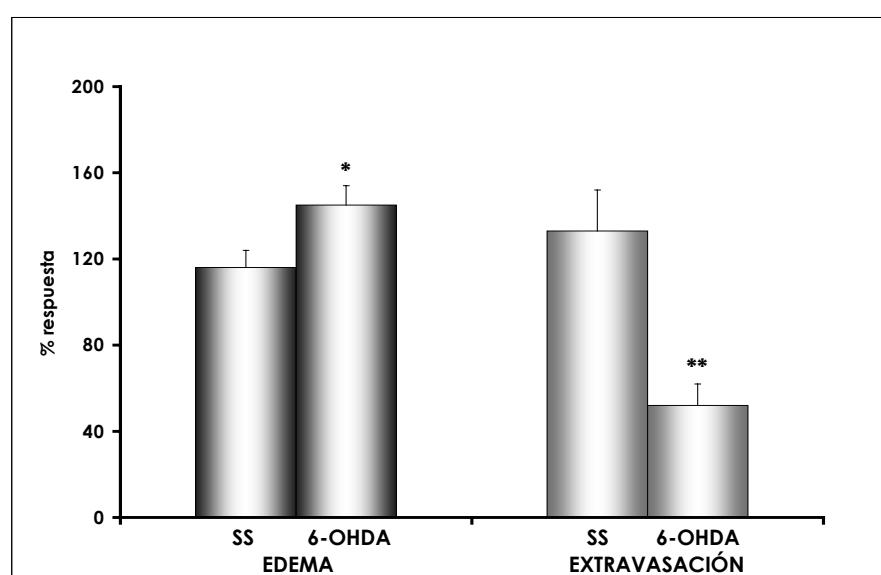
### 3.2. Valoración del componente nervioso postganglionar simpático: efecto del pretratamiento con la neurotoxina 6-hidroxidopamina.

El tratamiento con la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) induce la depleción de los neurotransmisores almacenados en las terminaciones simpáticas así como la destrucción de estas fibras si se realiza un tratamiento crónico. De esta manera, se valoró el papel del componente neuronal postganglionar simpático sobre la extravasación plasmática y el edema durante la inflamación aguda periférica.

#### 3.2.1. Efecto del tratamiento con 6-hidroxidopamina sobre la extravasación plasmática y el edema.

Para realizar este estudio se utilizaron 20 animales, distribuidos en dos grupos: el grupo SS (grupo control, animales tratados con solución salina) y el grupo 6-OHDA (animales tratados con 6-hidroxidopamina). La administración de ambas soluciones se realizó por vía i.p. Los resultados muestran (figura 37) que la pérdida del componente simpático postganglionar provocó la disminución significativa ( $P<0.001$ ,  $t$  de Student) de la extravasación plasmática (más de un 50%), mientras que mostró un aumento significativo ( $P<0.05$ ,  $t$  de Student), de aproximadamente un 20% sobre el edema.

**Figura 37.** Efecto del tratamiento con solución salina (SS) o 6-hidroxidopamina (OHDA) sobre el edema y la extravasación de plasma en condiciones de inflamación aguda.



Cada tratamiento, representado en columnas, es la media  $\pm$  E.E.M. de 10 animales. \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.001$  ( $t$  de Student).

### 3.2.2. Efecto de los agonistas opioides sobre la extravasación plasmática en animales tratados con 6-hidroxidopamina.

Para realizar este experimento se utilizaron dos grupos de animales: el grupo SS (grupo control, animales tratados con solución salina) y el grupo 6-OHDA (animales tratados con 6-hidroxidopamina). En ambos grupos, SS y 6-OHDA, se evaluó el efecto inhibidor sobre la extravasación de plasma de los agonistas morfina (MS), fentanilo (FN) y DPDPE (DP), empleándose 10 animales para cada uno de los opioides. Los agonistas opioides estudiados. Morfina, fentanilo y DPDPE se administraron, por vía s.c., a sus correspondientes DE<sub>80</sub> (tabla 23 y figura 38).

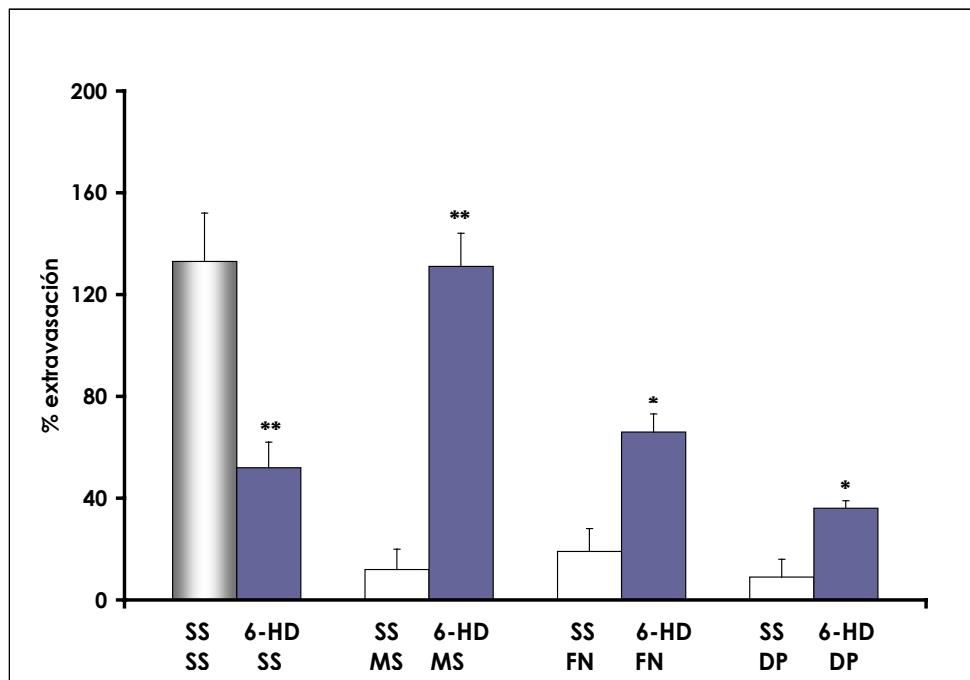
**Tabla 23.** Efecto de los agonistas opioides morfina (MS), fentanilo (FN) y DPDPE (DP) sobre la extravasación plasmática en animales tratados con 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

| TRATAMIENTO                | EXTRAVASACIÓN PLASMÁTICA (%) | P      |
|----------------------------|------------------------------|--------|
| <u>Control</u>             |                              |        |
| Salino (SS)<br>6-OHDA      | 133 ± 19<br>52 ± 10          | <0.001 |
| <u>Morfina (MS)</u>        |                              |        |
| Salino (SS)<br>6-OHDA      | 12 ± 8<br>131 ± 13           | <0.001 |
| o<br><u>Fentanilo (FN)</u> |                              |        |
| Salino (SS)<br>6-OHDA      | 19 ± 9<br>66 ± 7             | <0.01  |
| o<br><u>DPDPE (DP)</u>     |                              |        |
| Salino (SS)<br>6-OHDA      | 9 ± 7<br>36 ± 3              | <0.01  |

P (nivel de significación estadística). NS (no significativo). La comparación estadística se realizó entre los distintos grupos 6-OHDA a los que se les administró cada uno de los agonistas en cuestión vs. su correspondiente grupo control SS, mediante el test *t* de Student.

## Resultados

**Figura 38.** Porcentajes de extravasación de plasma obtenidos en animales tratados con 6-OHDA (6-OH) y a los que se les administró morfina (MS), fentanilo o DPDPE (DP).



Cada columna representa la media ± E.E.M. de 6-8 animales. \*P<0.01, \*\*P<0.001 (test t de Student), en relación a sus correspondientes grupos control (SS).

### 3.3. Valoración del componente inmunitario: efecto del pretratamiento con el inmunosupresor ciclosporina A.

La ciclosporina A (CsA) es un péptido cíclico obtenido de cultivos fúngicos que induce inmunosupresión celular. El fármaco suprime la respuesta celular inmunitaria al inhibir la activación de las células helper T-CD4<sup>+</sup>, así como la síntesis de las interleucinas IL-1 e IL-2 necesarias para la proliferación y diferenciación de los linfocitos T. No modifica las funciones de los linfocitos B, los macrófagos ni de los neutrófilos.

En estos experimentos se utilizaron dos grupos de animales: el grupo SS (grupo control, animales tratados con solución salina) y el grupo CsA (animales tratados con ciclosporina A). En ambos grupos, SS y CsA, se evaluó el efecto de los agonistas  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  (morfina (MS), DPDPE (DP) y U-50,488H (U50), respectivamente) empleándose entre seis y ocho animales para cada uno de los opioides estudiados. Las dosis empleadas de los agonistas fueron sus correspondientes DE<sub>80</sub>. En la tabla 24, se resume los resultados obtenidos, tanto en el grupo control como en cada uno

de los grupos de animales tratados con los distintos agonistas opioides. Estos mismos resultados se muestran en la figura 39 en forma de histogramas.

**Tabla 24.** Efecto de los opioides morfina (MS), fentanilo (FN) y DPDPE (DP) sobre la extravasación de plasma, en animales tratados con ciclosporina A (Cs A).

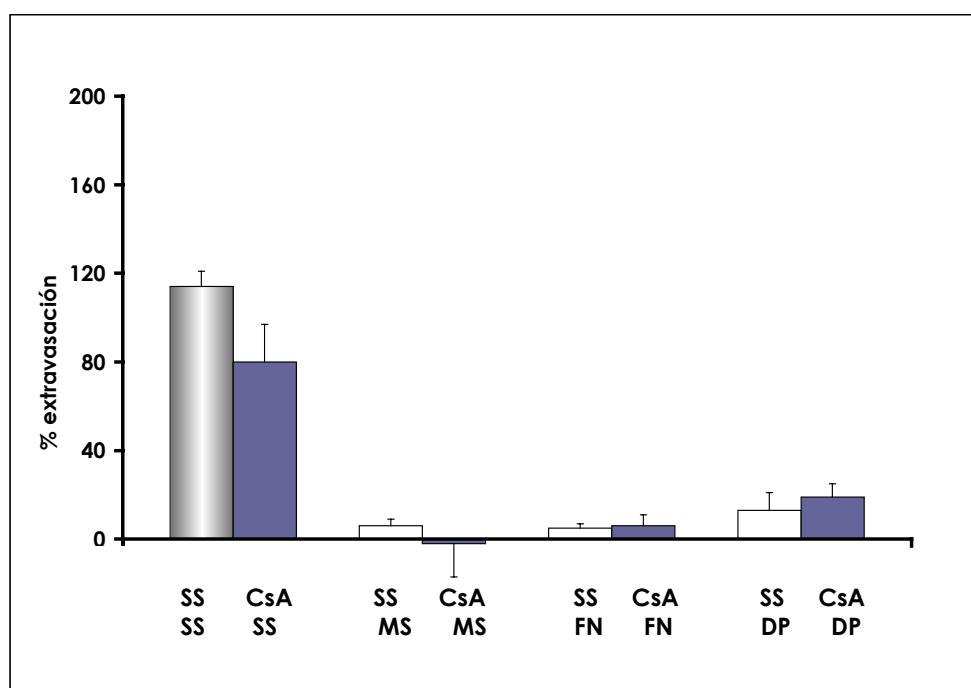
| TRATAMIENTO  | EXTRAVASACIÓN PLASMÁTICA (%) | P  |
|--|------------------------------|----|
| <b>Control</b><br>Salino (SS)<br>CsA               | 114 ± 7<br>80 ± 17           | NS |
| <b>Morfina (MS)</b><br>Salino (SS)<br>CsA<br><br>○ | 6 ± 3<br>-2 ± 15             | NS |
| <b>FENTANILo</b><br>Salino (SS)<br>CsA<br><br>○    | 5 ± 2<br>6 ± 5               | NS |
| <b>DPDPE</b><br>Salino (SS)<br>CsA                 | 13 ± 2<br>19 ± 2             | NS |

P (nivel de significación estadística). NS (no significativo). La comparación estadística se realizó entre los distintos grupos CsA a los que se les administró cada uno de los agonistas en cuestión vs. su correspondiente grupo control SS, mediante el test *t* de Student.

Los porcentajes de extravasación plasmática (114%) obtenidos en el grupo SS no fueron distintos de los porcentajes de extravasación (80%) obtenidos en el grupo Cs A, ambos pertenecientes al grupo control. Estos resultados sugieren que en nuestras condiciones experimentales ni la participación de las células helper ni la de los linfocitos T es relevante en cuanto a la formación de extravasación plasmática.

## Resultados

**Figura 39.** Porcentajes de extravasación plasmática obtenidos tras la administración de los agonistas morfina (MS), fentanilo (FN) y DPDPE (DP), en animales tratados con ciclosporina A (CsA).

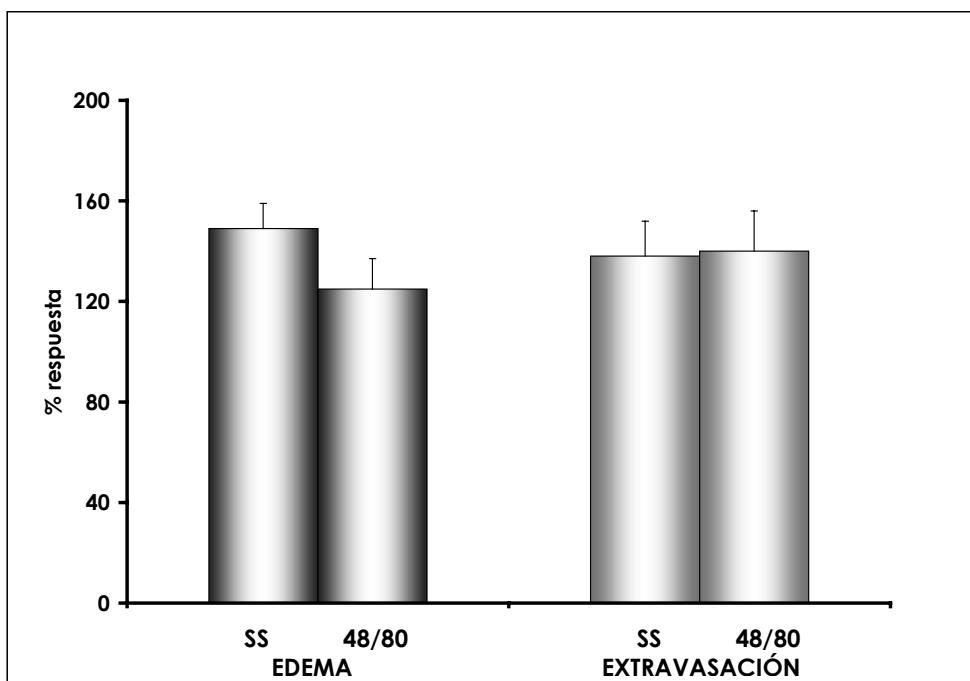


Cada columna representa la media  $\pm$  E.E.M. de 6-8 animales. La comparación estadística se realizó en relación a sus correspondientes grupos control (SS), mediante el test *t* de Student.

### 3.4. Valoración del componente histaminérgico: efecto del pretratamiento con el compuesto 48/80 que induce la depleción de histamina de los mastocitos.

El componente histaminérgico en la respuesta inflamatoria se evaluó inicialmente mediante el pretratamiento con el compuesto 48/80. Este compuesto es depletor de histamina, uno de los mediadores pro-inflamatorios más importante contenido en los mastocitos. Para ello se utilizaron dos grupos de animales: el grupo SS (grupo control, animales tratados con solución salina) y el grupo 48/80 (animales tratados con el compuesto 48/80). Ambas soluciones se administraron por vía s.c. En la figura 40 se muestran los resultados obtenidos sobre el edema y la extravasación, expresados en porcentajes, en animales control (SS) y en animales tratados con 48/80 (48/80).

**Figura 40.** Efecto del tratamiento con solución salina (SS) o el compuesto depletor de los mastocitos 48/80 (48/80) sobre el edema y la extravasación plasmática.



Así pues, la disminución del contenido de histamina de los mastocitos no modificó ni el edema ni la extravasación plasmática respecto al grupo control (SS).

### 3.4.1. Efecto de los agonistas opioides sobre la extravasación plasmática en animales tratados con el compuesto 48/80.

En estos experimentos se valoró si el efecto inhibidor de los opioides sobre la extravasación se veía modificado al haber disminuido los niveles de histamina, mediante la depleción de los mastocitos con el compuesto 48/80. Para ello, se utilizaron dos grupos de animales: el grupo SS (grupo control, animales tratados con solución salina) y el grupo 48/80 (animales tratados con el compuesto depletor 48/80). En ambos grupos, SS y 48/80, se evaluó el efecto de los agonistas morfina (MS), fentanilo (FN) o DPDPE (DP), empleándose 10 animales para cada uno de los fármacos estudiados. Las dosis de los opioides empleadas fueron sus correspondientes DE<sub>80</sub>. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 25.

## Resultados

**Tabla 25.** Efecto de los opioides morfina (MS), fentanilo (FN) y DPDPE (DP) sobre la extravasación de plasma, en animales tratados con el compuesto 48/80 (48/80).

| TRATAMIENTO           | EXTRAVASACIÓN PLASMÁTICA (%) | P      |
|-----------------------|------------------------------|--------|
| <u>Control</u>        |                              |        |
| Salino (SS)<br>48/80  | 117 ± 10<br>121 ± 14         | NS     |
| <u>Morfina (MS)</u>   |                              |        |
| Salino (SS)<br>48/80  | 5 ± 4<br>162 ± 15            | <0.001 |
| ○                     |                              |        |
| <u>Fentanilo (FN)</u> |                              |        |
| Salino (SS)<br>48/80  | 8 ± 2<br>63 ± 10             | < 0.01 |
| ○                     |                              |        |
| <u>DPDPE (DP)</u>     |                              |        |
| Salino (SS)<br>48/80  | 15 ± 8<br>25 ± 9             | NS     |

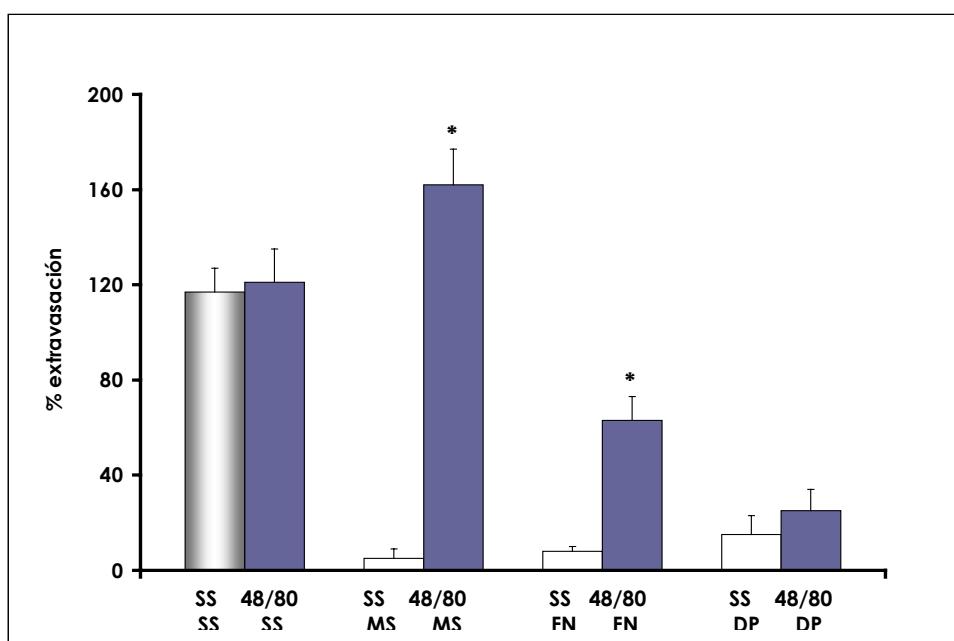
P (nivel de significación estadística). NS (no significativo). La comparación estadística se realizó entre los distintos grupos 48/80 a los que se les administró cada uno de los agonistas en cuestión vs. su correspondiente grupo control SS. \*P<0.01, \*\*P<0.001 (test t de Student).

En la figura 41 se representan los resultados anteriores en forma de histogramas. Los porcentajes de inhibición obtenidos con los distintos agonistas en animales no tratados con el compuesto 48/80 se mantuvieron en el 90 y 80%, corroborándose los resultados previos.

El pretratamiento con el compuesto 48/80 modificó significativamente el efecto de la morfina y del fentanilo pero no el del agonista δ DPDPE sobre la extravasación de plasma. La administración de morfina y fentanilo a animales tratados con el compuesto 48/80 llevó a una pérdida completa (MS) o parcial (FN)

de los efectos antiexudativos característicos de los anteriores opioides. En animales tratados con el compuesto 48/80 la administración de morfina (48/80//MS) provocó un incremento sobre la extravasación plasmática. Por otra parte, fentanilo mantuvo parte de su efecto inhibidor (40%) sobre la extravasación plasmática, es decir, el compuesto 48/80 revirtió parcialmente ( $P<0.05$ ;  $t$  de Student) su efecto antiexudativo, respecto su grupo control (SS/FN).

**Figura 41.** Porcentajes de extravasación plasmática obtenidos en animales tratados con solución salina o el compuesto 48/80 (48/80) a los que se les administró morfina (MS), fentanilo (FN) o DPDPE (DP).



Cada columna representa la media  $\pm$  E.E.M. de entre 6-18 animales. \* $P<0.001$  (test  $t$  de Student), en relación con sus correspondientes grupos control (SS).

De los tres opioides administrados sólo el  $\delta_1$ -selectivo, DPDPE, mantuvo su efecto inhibidor sobre la extravasación plasmática, aproximadamente un 70%. De esta manera se constataba que, mientras los agonistas  $\mu$  requerían la presencia de histamina en el medio para llegar a inducir su efecto anti-exudativo, los RO  $\delta$  mantenían su efecto inhibidor independientemente de la existencia de este mediador proinflamatorio.

### **3.4.2. Efecto del tratamiento con antagonistas histaminérgicos H<sub>1</sub> (mepiramina) y/o H<sub>2</sub> (cimetidina) sobre la extravasación de plasma.**

Los resultados obtenidos utilizando el pretratamiento con el compuesto 48/80, sugirieron que la presencia de histamina era indispensable para el efecto de los opioides  $\mu$ . Así pues, pensamos que sería interesante evaluar el tipo de receptor histaminérgico implicado en la respuesta opioide  $\mu$ .

Para ello se realizaron distintos grupos de experimentos utilizando los siguientes antagonistas selectivos para cada uno de los tres receptores histaminérgicos: anti-H<sub>1</sub>, mepiramina (M), anti-H<sub>2</sub>, cimetidina (C) o anti-H<sub>3</sub>, tioperamida (T). Se consideró oportuno realizar un primer grupo de experimentos en el que se administró una combinación de los antagonistas H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>, debido a que ambos tipos de receptores participan en el efecto vasodilatador de la histamina. Seguidamente, se evaluaron los efectos anti-exudativos de cada uno de los tres antagonistas histaminérgicos (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub>). En estas condiciones experimentales se pudo establecer la acción de los agonistas opioides morfina y fentanilo.

Para evaluar el efecto de la combinación H<sub>1</sub> + H<sub>2</sub> se estudiaron dos grupos de animales: grupo SS (grupo control, animales a los que se les administró solución salina), grupo M+C (animales tratados con la mezcla de ambos antagonistas histaminérgicos, mepiramina (M) + cimetidina (C)). En ambos grupos se evaluó el efecto de la morfina (MS), el fentanilo (FN) o el DPDPE (DP), utilizando el grupo SS/SS como grupo control. Los antagonistas histaminérgicos se administraron por vía i.p., mientras que los agonistas opioides por vía s.c. (ver Material y Métodos). Las dosis de cada uno de los fármacos empleados así como los porcentajes de extravasación se muestran en la tabla 26 y en la figura 42.

**Tabla 26.** Efecto de los opioides morfina (MS), fentanilo (FN) y DPDPE (DP) sobre la extravasación de plasma, en animales tratados previamente con la combinación de antagonistas histaminérgicos, mepiramina (M) y cimetidina (C).

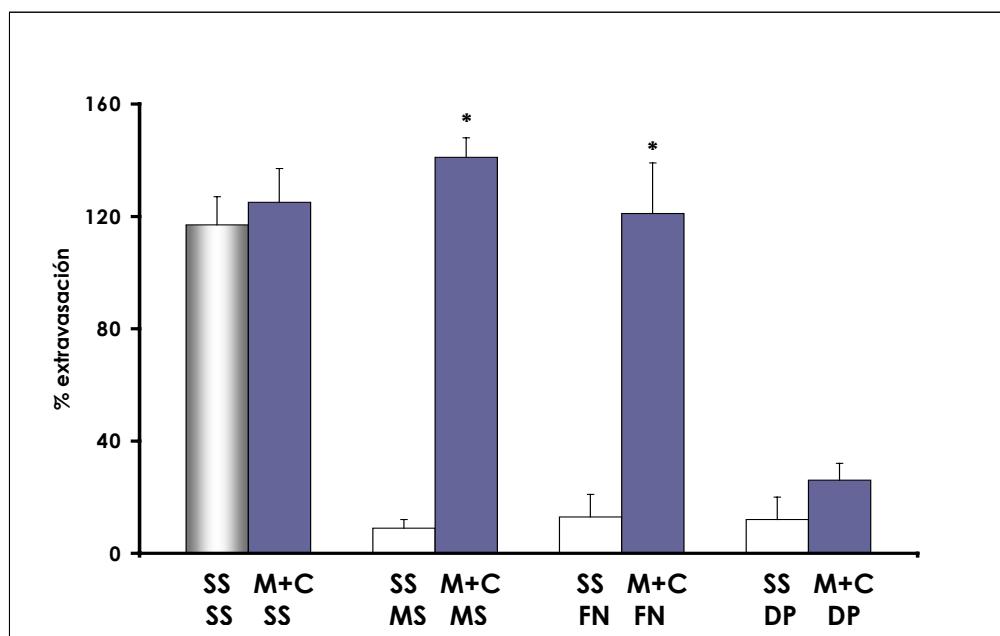
| TRATAMIENTO  | EXTRAVASACIÓN PLASMÁTICA (%)                                       | P                              |
|--|--|--------------------------------|
| <u>CONTROL</u><br>Salino (SS)<br><u>MEPIRAMINA (M) + CIMETIDINA (C)</u>  | 98 ± 9<br>121 ± 14   | NS                             |
| <u>Morfina (MS)</u><br><br>Salino (SS)<br>M+C+MS<br><br>○<br><u>Fentanilo (FN)</u><br><br>Salino (SS)<br>M+C+FN<br><br>○<br><u>DPDPE (DP)</u><br><br>Salino (SS)<br>M+C+DP | 9 ± 3<br>141 ± 7<br><br>13 ± 8<br>121 ± 18<br><br>12 ± 8<br>26 ± 6 | <0.001<br><br><0.001<br><br>NS |

Las dosis de mepiramina (M) y cimetidina (C) fueron 2.5 y 50 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Los agonistas se administraron a sus correspondientes DE<sub>80</sub>. P (nivel de significación estadística). NS (no significativo). La comparación estadística se realizó entre los grupos tratados con la combinación de antagonistas histaminérgicos (M+C) + agonista opioide vs. su correspondiente grupo control SS. \*P<0.001 (test t de Student).

El bloqueo simultáneo de los dos receptores histaminérgicos H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>, previamente a la inducción de la inflamación aguda no modificó los porcentajes de extravasación plasmática evaluados en el momento de máxima respuesta inflamatoria, esto es, tres horas después de inyectar el agente flogógeno carragenina.

## Resultados

**Figura 42.** Porcentajes de extravasación plasmática obtenidos tras la administración de los agonistas morfina (MS), fentanilo (FN) y DPDPE, en animales tratados con la combinación de los antagonistas histaminérgicos, mepiramina (M) y cimetidina (C).



Cada columna representa la media  $\pm$  E.E.M. de 6-8 animales. La comparación estadística se realizó entre los grupos que recibieron la combinación de antagonistas (M+C) agonista vs. su correspondiente grupo control SS. \*P<0.001 (test t de Student).

Los porcentajes de extravasación plasmática obtenidos con morfina (141%) y fentanilo (121%) fueron similares a los obtenidos en animales a los que sólo se les había administrado la mezcla de antagonistas histaminérgicos (121%). Estos resultados indican que la respuesta inhibidora inducida por los agonistas  $\mu$  requiere no sólo la presencia de histamina, sino también la interacción del ligando con los receptores  $H_1$  y/o  $H_2$ . El agonista  $\delta_1$  selectivo, DPDPE, mantuvo su efecto inhibidor sobre la formación de exudado plasmático independientemente del bloqueo farmacológico de los receptores  $H_1$  y  $H_2$ .

### **3.4.3. Efecto del tratamiento con antagonistas histaminérgicos H<sub>1</sub> (mepiramina), H<sub>2</sub> (cimetidina) o H<sub>3</sub> (tioperamida) sobre la extravasación de plasma.**

Experimentos adicionales permitieron establecer cuál de los dos receptores histaminérgicos tiene una mayor relevancia en el efecto inhibidor  $\mu$ -opioide sobre la extravasación de plasma. Además se evaluó también el efecto del antagonista selectivo para el subtipo de receptor H<sub>3</sub>, tioperamida. Para ello se utilizó el mismo protocolo descrito en los experimentos anteriores, es decir: grupo SS (animales tratados con solución salina, SS, n= seis) y grupos M, C o T (animales tratados con mepiramina, M; cimetidina, C; o tioperamida, T; n= ocho por antagonista). En ambos grupos se estudió el efecto de la morfina (MS) y del fentanilo (FN). Los resultados obtenidos en los anteriores experimentos con el agonista DPDPE sobre la extravasación de plasma mostraron que este fármaco  $\delta$  selectivo ejercía su efecto independientemente del sistema histaminérgico. Esta es la razón por la que se consideró innecesario evaluar la respuesta del dicho fármaco tras el bloqueo individual de los distintos subtipos de receptores histaminérgicos H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub>.

Los antagonistas se administraron por vía i.p., a las dosis de 2.5 (M), 50 (C) y 3 (T) mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente, mientras que los agonistas opioides se inyectaron por vía s.c., a sus correspondientes DE<sub>80</sub> (ver apartado de Material y Métodos). En la tabla 27 se muestra los porcentajes de extravasación plasmática y en la figura 43 se representan los resultados en forma de histogramas.

## Resultados

**Tabla 27.** Efecto de los opioides morfina (MS) y fentanilo (FN) sobre la extravasación de plasma, en animales tratados previamente con antagonistas histaminérgicos ( mepiramina (M), cimetidina (C) o tioperamida (T)).

| TRATAMIENTO                 | EXTRAVASACIÓN PLASMÁTICA (%) | P      |
|-----------------------------|------------------------------|--------|
| <b>SALINO (SS)</b>          | <b>106 ± 10</b>              |        |
| ○<br><b>MEPIRAMINA (M)</b>  | <b>95 ± 12</b>               | NS     |
| ○<br><b>CIMETIDINA (C)</b>  | <b>108 ± 9</b>               | NS     |
| ○<br><b>TIOPERAMIDA (T)</b> | <b>106 ± 8</b>               | NS     |
| ○                           |                              |        |
| <b>MORFINA (MS)</b>         |                              |        |
| Salino (SS)                 | <b>8 ± 16</b>                |        |
| M + MS                      | <b>25 ± 8</b>                | NS     |
| C + MS                      | <b>111 ± 9</b>               | <0.001 |
| T + MS                      | <b>109 ± 6</b>               | <0.001 |
| ○                           |                              |        |
| <b>FENTANILO (FN)</b>       |                              |        |
| Salino (SS)                 | <b>12 ± 9</b>                |        |
| M + MS                      | <b>26 ± 8</b>                | NS     |
| C + MS                      | <b>96 ± 12</b>               | <0.001 |
| T + MS                      | <b>240 ± 2</b>               | <0.001 |

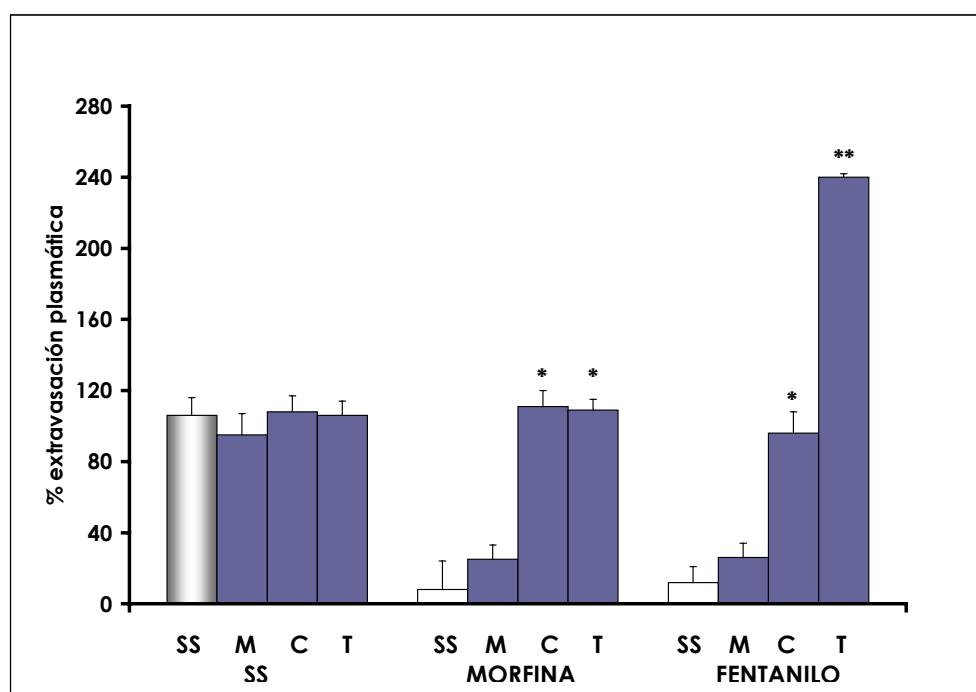
Las dosis de mepiramina (M), cimetidina (C) y tioperamida, administrados por vía i.p., fueron 2.5, 50 y 3 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Los agonistas se administraron, por vía s.c., a sus correspondientes DE<sub>80</sub>. P (nivel de significación estadística). NS (no significativo). La comparación estadística se realizó entre los grupos tratados con cada uno de los antagonistas histaminérgicos (M, C o T) + el agonista opioide vs. su correspondiente grupo control SS. \*P<0.001 ( test t de Student).

La administración de cada uno de los antagonistas de manera individual no provocó cambios en el porcentaje de exudado plasmático durante la inflamación aguda (figura 43). El bloqueo selectivo del receptor H<sub>1</sub> no modificó el efecto inhibidor de la morfina sobre la extravasación de plasma. Sin embargo, este

agonista perdió completamente su efecto antiexudativo ( $P<0.01$ ,  $t$  de Student) al bloquear tanto el subtipo H<sub>2</sub> como el H<sub>3</sub>.

El efecto inhibidor del fentanilo no se vio modificado, al igual que la morfina, al bloquear específicamente el subtipo H<sub>1</sub>. Mientras, el bloqueo de los receptores histaminérgicos H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub> inducía completamente la pérdida del efecto antiexudativo ( $P<0.01$ ;  $P<0.001$ , respectivamente). Los resultados obtenidos con el antagonista tioperamida mostraron que fentanilo, estando el subtipo H<sub>3</sub> bloqueado, incrementaba el porcentaje de extravasación plasmática superando el valor del grupo control en una situación de inflamación aguda. Esto sugiere que el receptor H<sub>3</sub> tiene una implicación muy importante que en el mecanismo antiinflamatorio de este fármaco  $\mu$  selectivo.

**Figura 43.** Efecto de la morfina y el fentanilo sobre la extravasación plasmática en animales tratados con mepiramina (M), cimetidina (C) o tioperamida (T).



Cada columna representa la media  $\pm$  E.E.M. de entre 6 - 8 animales.\* $P<0.01$ ; \*\* $P<0.001$  ( $t$  de Student), en relación con sus correspondientes grupos control (SS).

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de diferentes agonistas opioides sobre el edema y la extravasación de plasma utilizando el modelo de inflamación aguda periférica inducida por carragenina, descrito por Winter *et al.* (1962). Se han empleado las técnicas analíticas de pletismografía (Damas y Remacle-Volon, 1992) y espectrofotometría visible (Udaka *et al.*, 1970) para valorar el edema y la extravasación de plasma, respectivamente. Una vez establecidas las respuestas de los opioides  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  se ha investigado la posible participación de distintas estructuras periféricas en dichas respuestas. Para ello se han realizado tratamientos individuales, previos a la inducción de la inflamación aguda, con los que se modifican componentes neuronales (las terminaciones aferentes sensoriales o las fibras postganglionares simpáticas), y no neuronales (las células inmunitarias o el componente histaminérgico).

### **EVOLUCIÓN DEL EDEMA Y DE LA EXTRAVASACIÓN PLASMÁTICA EN EL MODELO DE INFLAMACIÓN AGUDA PERIFÉRICA EN RATA, INDUCIDA POR CARRAGENINA.**

En el modelo descrito por Winter *et al.* (1962), la administración de carragenina, por vía s.p., induce una inflamación local aguda en la pata, caracterizada por hiperalgesia acompañada de un aumento del volumen en dicha extremidad con formación de extravasación plasmática en los tejidos de la misma. Los efectos de los opioides sobre la hiperalgesia están descritos ampliamente, motivo por el que se decide valorar el edema y la extravasación plasmática, sin tener en cuenta los efectos antinociceptivos de los fármacos opioides utilizados. Las cuantificaciones del edema y de la extravasación de plasma se han realizado en el mismo animal. Primero se ha calculado el edema y, una vez finalizado el experimento y habiendo sacrificado el animal previamente anestesiado, se ha cuantificado la extravasación de plasma.

Los porcentajes del edema y de la extravasación de plasma obtenidos tras la inyección de solución salina (NaCl 0.9%) o de carragenina demuestran que sólo este último induce cambios significativos en el volumen y en la extravasación de proteínas plasmáticas en la pata inyectada. Al comparar las dos patas, inyectada y contralateral (control basal), habiendo administrado solución salina, no se detectan diferencias entre ellas, ni al valorar el edema ni la extravasación de plasma. Contrariamente, la inyección de carragenina induce una inflamación aguda,

apreciándose diferencias significativas entre las dos patas (inyectada y contralateral) del mismo animal, tanto en la aparición y evolución del edema como de la extravasación de plasma. El incremento de volumen que cuantificamos se expresa en ml. La extravasación de plasma se expresa en  $\mu\text{g}$  de colorante por g de tejido. El colorante, inyectado en la sangre, se distribuye por todo el organismo principalmente unido a la albúmina pero también de forma libre. Cuando hay cambios de permeabilidad vascular la albúmina se distribuye por los espacios extravasculares, aumentando la presión intersticial. Para compensar estos cambios de presión hay un incremento en la salida de fluido plasmático y como resultado aumenta el edema en la zona lesionada.

A los 20 minutos del inicio del experimento, se registra un incremento significativo del volumen, inducido por mediadores proinflamatorios como la histamina (DiRosa *et al.*, 1971; Al-Haboubi y Zeitlin, 1983), la bradicinina, etc. Como ya se comentó, el efecto proinflamatorio de la histamina está mediado principalmente por su interacción con los subtipos H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub> del receptor histaminérgico. Concretamente, los subtipos H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>, expresados en las células endoteliales o en las células de la musculatura lisa vascular, respectivamente, inducen la vasodilatación y el incremento de la permeabilidad vascular que caracteriza la fase inicial de la inflamación. De esta manera comienza el paso de fluido y proteínas plasmáticas hacia los espacios extravasculares. La activación del receptor H<sub>1</sub> por la histamina induce la expresión de proteínas como son las selectinas, que favorecen el inicio de la secuencia de sucesos que llevarán a la migración de los leucocitos hacia el tejido inflamado (Gaboury *et al.*, 1995). El bloqueo de los receptores H<sub>1</sub> con antagonistas específicos induce una disminución en la adhesión de leucocitos al endotelio vascular, demostrándose la participación de estos receptores en el proceso de diapédesis de las células inflamatorias.

A las tres horas de haber administrado el agente flogógeno la respuesta inflamatoria es máxima, cuantificándose porcentajes de edema y de extravasación plasmática del 108 y 102%, respectivamente. En este momento, detectamos que el volumen de la pata ha aumentado el doble de su valor inicial. Quince minutos antes de finalizar el experimento se administra el colorante por vía intravenosa, observándose cómo la pata inflamada adquiere una coloración mucho más azulada que su contralateral.

Nuestros resultados indican que la formación de edema y de extravasación de plasma en los tejidos inflamados aumenta al mismo tiempo, alcanzando un máximo tres horas después de haber administrado carragenina. Baluk *et al.* (1997) describen aumentos significativos de la permeabilidad vascular tras la administración de sustancia P como agente flogógeno. A tiempos tan cortos como minutos, se cuantifican incrementos tanto de volumen como de extravasación plasmática en la zona inflamada.

A partir de este momento y hasta el final del experimento, siete horas después de la inyección de carragenina, se observa un moderado descenso, tanto en los porcentajes del edema como en los de la extravasación al comparar estos valores con los obtenidos a las tres horas del inicio del experimento. No obstante, en ninguno de los casos el edema y la extravasación de plasma alcanzan los valores basales. Este hecho nos indica que, sin tratamiento farmacológico alguno, la respuesta inflamatoria se mantiene en valores máximos que oscilan entre el 50 y el 100% tanto de edema y como de extravasación plasmática en un intervalo de tiempo de dos y siete horas después de injectar el agente flogógeno. Esta situación resultaría idónea para el estudio de la respuesta inflamatoria en un modelo subagudo.

### **VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ESTUDIO.**

La valoración de la actividad antiinflamatoria de un fármaco puede realizarse mediante diferentes modelos experimentales en animales. Todos ellos intentan imitar distintos tipos de inflamaciones que se presentan en los procesos patológicos. El modelo de inflamación aguda por carragenina induce una respuesta inflamatoria local caracterizada por manifestar en la zona de la inyección del agente flogógeno, hiperalgesia, edema, extravasación plasmática e infiltrado leucocitario (Winter *et al.*, 1962). Todos estos signos inflamatorios se pueden valorar fácilmente mediante técnicas analíticas reproducibles que cuantifican el dolor, el volumen y la extravasación plasmática así como la densidad celular. La identificación de receptores opioides en estructuras periféricas (Stein, 1990) y teniendo en cuenta que el objetivo de nuestro estudio es valorar los efectos antiinflamatorios de los opioides a nivel periférico consideramos idóneo este modelo experimental.

Si bien para la validación de técnicas analíticas biológicas hay establecido un rango que limita los valores máximos posibles de los coeficientes de variación entre el 15 y 20% (Shah *et al.*, 1991), en el caso de los modelos de investigación que emplean animales estos valores no están bien establecidos. Comparando nuestros resultados con los obtenidos por otros autores en estudios realizados en inflamación aguda periférica, se obtienen coeficientes de variación comprendidos entre 14 y 36%. Si tenemos en cuenta estos datos, la variabilidad que nosotros hemos obtenido oscila dentro de estos márgenes y, más concretamente entre el 11 y 17% de valor medio. Por lo tanto, podemos considerarlos aceptables. No obstante, pensamos que la técnica de plethysmografía no es muy precisa. Este método que permite cuantificar el edema presenta limitaciones en cuanto a obtener valores reales. Esto es, resulta muy difícil llegar a cuantificar pequeños cambios de fluido edematoso en los tejidos inflamados.

Puede llamar la atención que en el estudio de la localización de los receptores opioides implicados en la extravasación los grupos control manifiestan incrementos de casi un 60% en los porcentajes de extravasación proteica, estadísticamente significativos ( $P<0.01$ ) respecto a los obtenidos en los anteriores experimentos. Es decir, los animales son capaces de extravasar mayor cantidad de proteína al tejido inflamado. Las causas de este hecho las podemos encontrar en el control vascular que se establece entre los sistemas simpático y sensorial a través de interacciones competitivas (Wallin, 1990; Häblert *et al.*, 1997). Además, el valor del flujo sanguíneo inicial modula las respuestas vasomotoras (Sasano *et al.*, 2002). Estudios realizados sobre la regulación del flujo sanguíneo ponen de manifiesto que la temperatura del animal o la estación del año en que se realizan los experimentos inducen variaciones en la respuesta vasodilatadora o vasoconstrictora en una situación de inflamación. Temperaturas corporales por debajo de los 25 °C inducen vasodilatación, mientras que los animales cuya temperatura corporal está por encima de los 30°C manifiestan vasoconstricción. Durante la época de frío (otoño-invierno) se favorecen las respuestas vasodilatadoras, mientras que durante la época estival se ve favorecida la vasoconstricción, siempre en una situación experimental de inflamación aguda. Así pues, la extravasación plasmática inducida por la respuesta inflamatoria podría resultar incrementada en aquellos animales utilizados en un ambiente que favorece la vasodilatación. De esta manera podemos argumentar las diferencias cuantificadas al valorar la extravasación

plasmática en animales control. Hemos de destacar que si bien todos los experimentos se han realizado a temperatura ambiente controlada (22°C) no tuvimos en cuenta la temperatura corporal de cada animal.

### **EFFECTOS ANTIINFLAMATORIOS DE LOS AGONISTAS OPIOIDES EN EL MODELO DE INFLAMACIÓN AGUDA PERIFÉRICA.**

A partir de los experimentos iniciales se decide establecer como tiempo total de los mismos tres horas, que van desde la inyección de carragenina hasta el sacrificio de los animales. En este momento se alcanzan valores máximos tanto de edema como de extravasación plasmática. La administración de los agonistas opioides se lleva a cabo a las dos horas 30 minutos del inicio del experimento, consiguiendo así niveles óptimos plasmáticos de los agonistas en el momento de máxima inflamación. De esta manera, se valora el efecto de los fármacos en estudio cuando la inflamación está bien establecida.

La respuesta opioide sobre el edema y la extravasación de plasma es claramente distinta. Se observa que, tras la administración de los agonistas opioides, el volumen de la pata, esto es, el **edema**, no varía. Con ninguno de los fármacos utilizados se establece una respuesta anti/pro edema, dosis-dependiente. Sin embargo, destacamos variaciones significativas en el porcentaje del edema tras la administración de algunos de estos fármacos y a dosis determinadas. En cuanto a la **extravasación plasmática**, los agonistas opioides  $\mu$  y  $\delta$  son capaces de inhibirla, con una relación dosis-dependiente bifásica, mientras que la administración del agonista  $\kappa$  induce efectos inhibidores sobre la extravasación de plasma de sólo 36%, sin ningún tipo de relación dosis-respuesta.

Estos resultados no deberían sorprendernos ya que los mecanismos fisiológicos que regulan el edema y extravasación de plasma son distintos. En la formación del primero intervienen cambios en el flujo sanguíneo: la vasodilatación arteriolar, la modificación de la tensión vascular así como el incremento de la presión negativa en el fluido intersticial; mientras que la dinámica del proceso exudativo implica una reorganización de las uniones entre las células endoteliales. Así pues, los mecanismos fisiológicos que modulan el edema y la extravasación son diferentes, resultando posiblemente distinta su regulación farmacológica. No obstante, es importante remarcar que la formación de edema puede o no llevar a la formación de extravasación plasmática, mientras que el paso de proteínas al

intersticio inevitablemente lleva a la salida de agua desde los vasos sanguíneos para compensar los cambios de presión que tienen lugar en los tejidos inflamados.

### **EDEMA**

El hecho que los agonistas opioides modifiquen de una manera rápida los porcentajes de extravasación y no de edema pudiera deberse a una incapacidad en el drenaje linfático, más que a la ineficacia de los fármacos. Así pues, nuestros resultados indican que, en este modelo de inflamación aguda, los mecanismos de regulación del edema y de la extravasación plasmática no son los mismos.

### **Agonistas opioides $\mu$**

La respuesta obtenida tras la administración de los distintos agonistas  $\mu$  selectivos es diferente para cada uno de los fármacos estudiados: morfina, fentanilo, ambos de acción central y periférica, y PL017, de acción predominantemente periférica. La administración de **morfina** a las dosis de 0.7, 1, y 10 mg.kg<sup>-1</sup> reduce en poco más del 30% el edema, mientras que las otras dosis estudiadas no lo modifican. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Joris *et al.*, (1990) y Sacerdote *et al.*, (1996), en modelos de inflamación aguda inducida por carragenina y levadura en pata de rata, respectivamente. Tras la administración de **fentanilo** ninguna de las dosis estudiadas modifica el porcentaje de edema. Los resultados obtenidos tras la administración del agonista **PL017**, cuantifican diferencias significativas en los valores de edema a determinadas dosis, con un efecto proedematoso del 30%. Estas diferencias tanto anti como proedematosas son respecto al grupo control.

Así pues, observamos que a ciertas dosis morfina disminuye el edema, fentanilo no lo modifica y PL017 lo incrementa. La diferencia de respuesta que se observa con cada uno de estos tres fármacos pudiera relacionarse con la unión preferente a los distintos subtipos de RO  $\mu$  ( $\mu_1$ ,  $\mu_2$  y  $\mu_3$ ), así como a la localización de los mismos en estructuras nerviosas centrales y/o periféricas. De los resultados obtenidos con el PL017 podríamos plantear la hipótesis que la activación de los RO  $\mu$  periféricos favorecería la formación de edema, mientras que los RO  $\mu$  centrales participarían más en la disminución del edema, especialmente tras la administración de morfina. Se ha descrito un efecto antiedematoso mediado por los RO  $\mu$  controlado por las fibras eferentes simpáticas que inervan la piel al disminuir el flujo sanguíneo cutáneo (Delle *et al.*, 1990). No obstante, teniendo en cuenta que

morfina y PL017 tienen afinidades similares por los RO  $\mu$  periféricos, no tenemos una explicación definitiva que nos permita aclarar estas diferencias.

Otro posible motivo por el que los opioides no reducen el edema puede ser el descrito por el-Sharkawy *et al.* (1991) y Karasawa *et al.* (1993), tras sus estudios realizados con cultivos de anillos de aorta. Observan que tras la administración de opioides como la morfina, el fentanilo y el U-50,488H se manifiesta un efecto vasodilatador, no antagonizado por naloxona. Estos resultados parecen indicar que esta vasodilatación está mediada por el bloqueo de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos. De esta manera, el efecto vasoconstrictor simpático se anula, predominando la vasodilatación opioide y por lo tanto favoreciendo la salida de fluido plasmático (edema). Stefano (1998) demuestra la participación del óxido nítrico en los efectos vasodilatadores inducidos por la morfina.

### **Agonistas opioides $\delta$**

La activación del receptor  $\delta$  (subtipos  $\delta_1$  y  $\delta_2$ ) con agonistas opioides selectivos, **DPDPE** ( $\delta_1$ ) y el fármaco sintético no peptídico **SNC 80** ( $\delta_{1-2}$ ), no induce efecto inhibidor alguno sobre el edema. Por el contrario, destacamos incrementos de volumen (edema) significativos ( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ ), obtenidos con ambos fármacos a determinadas dosis. Estos aumentos oscilan entre el 40 y el 50% vs. el grupo control. No se ha establecido ninguna correlación entre las dosis con efecto proedematoso y las correspondientes a la acción antiexudativa que ambos fármacos manifiestan (valores que se discuten más adelante). Sin tener en cuenta el efecto antiedematoso inducido por la morfina o los efectos proedematosos obtenidos tras la administración del agonista  $\mu$ , PL017, así como de los agonistas  $\delta$ , DPDPE y SNC 80, podríamos decir que el papel de los opioides sobre el edema es poco manifiesto, salvo determinadas dosis que alteran en uno u otro sentido el volumen de edema.

### **Agonista $\kappa$**

En nuestro modelo de inflamación aguda periférica, la administración del agonista  $\kappa$ , U-50,488H, de acción central y periférica, modifica los porcentajes de edema obtenidos a determinadas dosis empleadas induciendo un efecto proedematoso de aproximadamente un 20%, al ser comparadas con el grupo control. Estudios realizados en modelos de isquemia cerebral y administrando

agonistas  $\kappa$  demuestran un importante efecto antiedematoso tras la activación de los RO  $\kappa$  (Silvia *et al.*, 1987). Teniendo en cuenta que los microvasos cerebrales son muy distintos a los cutáneos, podemos pensar que estas divergencias en los efectos opioides se deben a la localización de los RO. Por otra parte, se ha descrito un efecto inhibidor del edema originado por causas térmicas tras la administración de análogos del opioide endógeno dinorfina (Wei *et al.*, 1998). Los resultados indican que el mecanismo a través del cual estos fármacos ejercen sus propiedades antiedema es la modulación de la presión intersticial que se produce durante el proceso inflamatorio.

### **EXTRAVASACIÓN PLASMÁTICA**

Durante la respuesta inflamatoria se produce en muchos órganos, incluyendo la piel y las vías respiratorias, el proceso de extravasación de plasma o exudado plasmático. Como ya se ha descrito anteriormente, al inicio de la inflamación histamina y bradicinina, inducen un incremento de la permeabilidad vascular. Además, la activación directa de las fibras C sensoriales, por capsaicina o estimulación eléctrica, o la indirecta, por estímulos nocivos, inducen la extravasación de plasma al liberar neuropéptidos (SP, NK A), que interaccionan, a su vez, con receptores específicos localizados en las células endoteliales.

En nuestro estudio, la administración de los distintos agonistas opioides en el momento de máxima inflamación produce disminuciones muy significativas de la extravasación plasmática al compararlas con los valores obtenidos en el grupo control. Esto nos indica que la interacción específica del fármaco opioide con su receptor induce rápidamente el cierre de los poros del endotelio vascular, impidiendo el consecuente paso de la albúmina al espacio intersticial. El mecanismo exacto a través del cual se lleva a cabo este efecto inhibidor no se conoce. Se ha descrito la activación de los RO localizados en las fibras sensoriales, que impiden la liberación de los neuropéptidos proexudativos desde ellas (Barnes *et al.*, 1990). Trabajos recientes describen un nuevo subtipo de RO,  $\mu_3$ , localizado en el endotelio vascular (Stefano *et al.*, 1995). Podríamos establecer una posible acción directa de los opioides sobre estos receptores, cuya activación induciría efectos sobre las estructuras proteicas que forman las uniones interendoteliales modificándolas, y en este caso concreto reduciendo al máximo el espacio entre dichas células.

### Agonistas $\mu$ - $\delta$

Los resultados obtenidos tras la administración de **morfina**, **fentanilo**, **DPDPE** y **SNC 80**, y expresados como porcentajes de inhibición de la extravasación plasmática, siguen una relación dosis-respuesta **bifásica**, caracterizada por dos pendientes, una ascendente y otra descendente, con un punto de inflexión entre ambas que coincide con el efecto inhibidor máximo obtenido experimentalmente. En todos los casos las dosis a las que se consiguen efectos antiexudativos superiores al 80 % superan las dosis analgésicas.

La fase **ascendente** se ajusta perfectamente a una recta y es, a partir de la misma, que se calculan las potencias relativas para cada uno de los fármacos opioides. No consideramos la fase descendente a estos efectos, puesto que las dosis necesarias para llegar a ella están muy por encima de las dosis analgésicas. De los cálculos de las potencias de los distintos fármacos estudiados deducimos que fentanilo es el opioide con el efecto antiexudativo más potente seguido de DPDPE y PL017 en igualdad. A continuación, morfina, y finalmente SNC 80.

Resaltamos que los porcentajes de inhibición sobre la extravasación plasmática obtenidos con morfina ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), fentanilo ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) y PL017 ( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), respectivamente, superan el 100%. Esto se detecta no sólo por espectrofotometría sino también visualmente ya que la pata del animal inflamado y tratado con uno de los anteriores fármacos adquiere un tono mucho más pálido que la de los animales control. Una posible explicación a este hecho sería que, a estas dosis, los fármacos activarían también los RO localizados en las fibras postganglionares simpáticas (Berzetei *et al.*, 1987; 1988), induciendo una potente vasoconstricción.

A partir de este efecto máximo los agonistas morfina, fentanilo, DPDPE y SNC 80 pierden la capacidad de inhibir la extravasación de plasma. Al incrementar las dosis de cada uno de los fármacos la tendencia de la curva pasa a adquirir una pendiente **descendente**. Se observa como DPDPE y SNC 80 pierden completamente su capacidad inhibidora sobre la extravasación plasmática, recuperándose los niveles obtenidos en los animales control. Mientras, morfina y fentanilo no alcanzan dichos porcentajes, manteniendo el efecto inhibidor entre el 20 y 40%.

Resultados experimentales obtenidos por Lei y Rogers (1999) en el estudio del efecto opioide sobre la extravasación de plasma en las vías respiratorias

demuestran que la morfina induce también un efecto bifásico. A partir de dosis superiores a los  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de morfina, observan una pérdida del efecto inhibidor sobre la extravasación de plasma. Con sus resultados apoyan la hipótesis que la pérdida del efecto antiexudativo de este opioide se debe a la interacción del fármaco con RO expresados en los mastocitos, lo que lleva a la liberación de mayores cantidades de histamina y como consecuencia a una mayor extravasación. No obstante, en nuestro estudio este efecto bifásico sobre la extravasación plasmática se obtiene tras la administración de todos los agonistas opioides  $\mu$  y  $\delta$  empleados mientras que el efecto liberador de la histamina por opioides sólo se ha descrito para la morfina (Barke y Hough, 1993). Cabe pensar que las diferencias en la estructura química de los distintos agonistas opioides empleados en este estudio son las que inducen mecanismos celulares y/o moleculares distintos a través de los cuales se llega a los mismos efectos anti y proexudativos.

Se han descrito efectos bimodales inducidos por los opioides, principalmente por la morfina, en la inhibición de la capacidad de fagocitosis de los macrófagos peritoneales (Casellas *et al.*, 1991), en la liberación de CCK (Benoliel *et al.*, 1994), de SP (Suarez-Roca y Maixner, 1992; 1995), de dopamina (Maisonneuve *et al.*, 2001), en la estabilización/desestabilización de los linfocitos T circulantes (Donahoe *et al.*, 2001) y en los efectos pro/anticonvulsivantes inducidos tras la administración de este opioide (Homayoun *et al.*, 2002). La administración sistémica del agonista  $\kappa$ , U-50,488H induce efectos pro y antiarrítmicos (Xiaochun *et al.*, 1999). Hay muy pocos estudios de inflamación aguda en los que se demuestran respuestas dosis-dependientes bifásicas.

En nuestro estudio destacamos que, debido a la respuesta bifásica de los opioides sobre la extravasación de plasma se obtiene el mismo efecto administrando el fármaco a dosis muy diferentes. Por ejemplo, la morfina, a la dosis de  $0.7 \text{ mg.kg}^{-1}$  (**fase ascendente**), induce el mismo porcentaje de inhibición de la extravasación de plasma, que si administráramos una dosis de  $14 \text{ mg.kg}^{-1}$  (**fase descendente**). Una posible explicación a este hecho sería que al aumentar tanto la dosis pueden establecerse interacciones con otros receptores, opioides o no, hecho que modificaría la respuesta inicial del fármaco administrado. La posible activación de otras rutas moleculares (AC/AMPc; PLP C/IP<sub>3</sub>), lleva a manifestar, en nuestro caso concreto, efectos estimulantes sobre la extravasación de plasma. No obstante, la

administración de opioides a dosis superiores a las analgésicas induce en los animales importantes efectos adversos, que en ningún momento hay que obviar, como son la depresión respiratoria y la euforia.

También cabe pensar que a dosis altas los agonistas opioides pueden estimular aquellas vías moleculares que llevan a la desensibilización de los receptores. Estudios realizados en tolerancia aguda demuestran que la administración de una única dosis de agonista opioide inicia la secuencia que lleva a la fosforilación de los receptores opioides por quinasas (Mestek *et al.* 1995; Narita *et al.*, 1995). Los receptores  $\mu$  y  $\delta$  sufren rápidamente la internalización del receptor por endocitosis (Gaudriault *et al.*, 1997). Sin embargo, la internalización del receptor depende de la estructura del ligando. Los resultados de los estudios realizados en cultivos celulares apoyan la hipótesis que diferentes ligandos inducen diferentes cambios conformacionales en el receptor, produciendo distintas respuestas intracelulares. Por otra parte, la administración de etorfina y encefalinas causan una rápida internalización del RO  $\mu$ , mientras que la morfina no lo hace (Keith *et al.*, 1996). Así pues, la administración de opioides a determinadas dosis podría inducir este fenómeno de desensibilización, explicándose la pérdida del efecto inhibidor sobre la extravasación. Estas dosis se corresponderían con la fase descendente de la curva bifásica obtenida para cada uno de los agonistas opioides.

Se han realizado estudios con morfina (agonista  $\mu$ ), DPDPE (agonista  $\delta$ ) y U-50,488H (agonista  $\kappa$ ) en los que se demuestra el efecto antiexudativo periférico, dosis-dependiente, de algunos de estos opioides en modelos de inflamación neurogénica. Los posibles mecanismos por los que se produce esta respuesta antiexudativa son debidos a la inhibición de la liberación de mediadores proinflamatorios (SP, CGRP) desde las fibras-C periféricas, al activarse los RO presinápticos (Barber, 1993). En este mismo modelo, la simpatectomía realizada en los animales no modifica la respuesta inflamatoria por estimulación nerviosa en la piel de rata (Donnerer *et al.*, 1991). Esto nos demuestra la importancia del componente sensorial en la respuesta inflamatoria.

Podemos establecer que un fármaco es antiinflamatorio cuando disminuye alguno de los signos que caracterizan la respuesta inflamatoria. Así pues, la capacidad de un fármaco en reducir la infiltración de células leucocitarias en la zona lesionada le confiere la denominación de antiinflamatorio. Se ha demostrado que la morfina y el sufentanilo modulan la migración de neutrófilos desde la sangre

a la zona inflamada, siendo uno de los posibles mecanismos de acción antiinflamatoria local (Stefano, 1998; Hofbauer *et al.*, 1998). Otro posible mecanismo implicado en este efecto se daría a través del NO. La administración de morfina potencia los efectos del NO, entre ellos la disminución de la transmigración leucocitaria (Boucher *et al.*, 2001). De esta manera se impide que los leucocitos, una vez llegan al tejido lesionado, liberen enzimas como proteasas, lipasas, etc, que degradan el agente causal de la inflamación y el propio tejido. En estudios de analgesia se ha establecido que la transmigración de células inflamatorias es un parámetro inflamatorio importante en la liberación de péptidos opioides endógenos (POE). Éstos al unirse con los RO expresados en las terminaciones sensoriales impiden la transmisión nociceptiva induciendo analgesia. No obstante, el efecto antinociceptivo de los opioides no tiene porqué seguir el mismo mecanismo que el efecto antiexudativo.

### **Agonista κ**

Por el contrario, el agonista U-50,488H, no produce el mismo efecto inhibidor. A dosis bajas no induce efecto inhibidor alguno, pero al aumentar las dosis en un rango comprendido entre 0.5 y 10 mg.kg<sup>-1</sup>, se aprecian porcentajes de casi el 40% de inhibición de la extravasación plasmática. Al seguir incrementando la dosis este efecto antiexudativo desaparece, sugiriéndose que la intervención de los RO κ no es relevante en la modulación de la extravasación plasmática.

Dado que los cambios inducidos por los opioides sobre el edema resultan menos evidentes que sobre la extravasación plasmática, el presente trabajo se ha centrado en la evaluación de los efectos de estos fármacos sobre la **extravasación plasmática**.

### **EFFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS SOBRE LA EXTRAVASACIÓN PLASMÁTICA.**

Para demostrar la naturaleza opioide del efecto inhibidor de la extravasación plasmática se ha estudiado la acción de fármacos antagonistas selectivos y no selectivos de los RO en los siguientes grupos de experimentos:

- a) En condiciones basales.
- b) Durante la inflamación.

- c) Durante la inflamación tratada con agonistas opioides, con el fin de revertir el efecto inhibidor de los fármacos opioides.
- a) La administración de los antagonistas opioides, clorhidrato de naloxona ( $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ ), naltrindol (selectivo para los RO  $\delta_2$ ) y MR2266 (selectivo para los RO  $\kappa$ ), no induce efecto alguno sobre la extravasación plasmática. Hasta el momento no se ha demostrado un tono o liberación basal de POE en situaciones no patológicas.
- b) Se ha descrito que para poder apreciar las acciones fisiológicas del sistema opioide endógeno éste debe estar activado (Barnes *et al.*, 1990). En una situación de inflamación aguda, la administración de los antagonistas anteriormente nombrados revierte los porcentajes de exudado plasmático. Destacamos el incremento significativo ( $P<0.01$ ) del 26% de extravasación plasmática obtenido al administrar clorhidrato de naloxona, al compararlo con el porcentaje obtenido con el grupo control. La dosis administrada de naloxona ( $1 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), lleva al bloqueo de los tres tipos de RO,  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ , impidiendo la interacción, tanto a nivel central como periférico, de los ligandos endógenos específicos para estos receptores, como son las  $\beta$ -endorfinas, encefalinas y dinorfinas, respectivamente. Podemos decir que, en condiciones de inflamación, el sistema opioide endógeno modula la extravasación plasmática induciendo su disminución.

Puesto que el clorhidrato de naloxona no es específico para un determinado grupo de RO se evaluó el efecto de antagonistas selectivos para los receptores  $\delta$  y  $\kappa$ . Tras la administración de naltrindol ( $\delta_2$ ), se observa un incremento del 40% ( $P<0.01$ ) de la extravasación proteica en los tejidos inflamados, al comparar dicho valor con el porcentaje obtenido en el grupo control. El efecto que se consigue al bloquear selectivamente los RO  $\delta_2$ , centrales y periféricos, impide la interacción que durante la respuesta inflamatoria aguda tiene lugar entre los RO  $\delta_2$  y sus ligandos endógenos como son, en este caso, las encefalinas. La comparación estadística mediante el test *t* de Student de los dos grupos de animales tratados con los antagonistas, clorhidrato de naloxona y naltrindol, detecta diferencias significativas entre ellos ( $P<0.01$ ).

En el caso del antagonista  $\kappa$ , MR2266, no se superan los porcentajes obtenidos con el grupo control, de manera que podemos deducir que durante la inflamación aguda periférica la posible liberación de dinorfinas no tiene efecto relevante sobre la modulación de la extravasación plasmática.

Así pues, en una situación de inflamación aguda, el bloqueo selectivo de los RO modifica la respuesta moduladora global del sistema opioide endógeno. Nuestros resultados obtenidos al bloquear selectivamente los RO  $\delta_2$  nos muestran incrementos de hasta un 40% el exudado plasmático. Este aumento es significativamente superior al obtenido cuando se bloquean al mismo tiempo los tres RO con clorhidrato de naloxona. Esto parece indicar que al estar bloqueados los RO  $\delta_2$  no pueden unirse sus ligandos endógenos, esto es, las encefalinas. En ambos casos, tanto al antagonizar con clorhidrato de naloxona como con naltrindol, se está impidiendo que tenga lugar el efecto inhibidor fisiológico inducido por el sistema opioide endógeno sobre la extravasación de plasma. Nuestros resultados establecen unas claras diferencias entre la modulación inducida por las  $\beta$ -endorfinas, las encefalinas y las dinorfinas, siendo las encefalinas las que ejercen un mayor efecto modulador. Además, el bloqueo selectivo de los RO  $\delta_2$  no impide que  $\beta$ -endorfinas y dinorfinas puedan interaccionar con los subtipos de RO  $\mu$  y  $\kappa$ , respectivamente, ya que están libres. De todo lo anterior podríamos deducir primero que, los principales POE implicados en la modulación de la extravasación plasmática son las encefalinas, y segundo, que la activación simultánea de los tres subtipos de RO induce respuestas moduladoras distintas. No obstante, con estos experimentos no podemos diferenciar entre efectos centrales y periféricos.

c) El antagonismo de los efectos antiexudativos de los opioides administrados a sus DE<sub>80</sub>, correspondientes a la fase ascendente de la curva bifásica obtenida nos demuestra, en todos los casos, reversiones como mínimo del 80% de la inhibición que estos fármacos inducen sobre la extravasación plasmática. De esta manera, podemos asegurar que el efecto antiexudativo inducido tras la administración de los fármacos empleados en este estudio es debido a la activación específica de los correspondientes RO.

Destacamos que para revertir el efecto inhibidor  $\delta$  de la extravasación de plasma fue necesario aumentar al doble la dosis de antagonista  $\delta$  selectivo hasta ahora utilizada. Así pues, empleándose 6 mg.kg<sup>-1</sup> de NTI se consiguió revertir el 80% del efecto antiexudativo del agonista DPDPE. Teniendo en cuenta que los antagonismos son de tipo competitivo resulta lógico y necesario incrementar la dosis de antagonista ya que el NTI es selectivo para el subtipo  $\delta_2$  y el DPDPE presenta una mayor selectividad por el subtipo  $\delta_1$ . Esto hace suponer que los receptores  $\delta_2$  serían los que se bloqueen inicialmente, de manera que, para ocupar los receptores

δ<sub>1</sub> es necesario aumentar la dosis del antagonista. La interacción entre distintos RO induce modificaciones en la farmacología de éstos.

Se ha demostrado farmacológicamente que la activación de un tipo de RO puede alterar la sensibilidad al agonista de otro tipo diferente de RO expresados en la misma estructura anatómica, o el mismo tipo de receptor localizado en lugares distintos. La potenciación del efecto antinociceptivo de la morfina por la activación de RO δ es un ejemplo del primer tipo de interacción, mientras que la sinergia que se establece entre RO μ expresados en distintas áreas del SNC, o entre estructuras supraespinales y espinales (Riba *et al.*, 2002). Recientes estudios de Jordan y Devi (1998) y George *et al.*, (2000) demuestran que cuando dos tipos distintos de RO se expresan en la misma célula las afinidades por determinados agonistas son distintas a las observadas en el caso de que los RO se expresaran solos. Mediante el uso de anticuerpos específicos para los distintos RO se ha evidenciado la interacción física que se establece entre receptores formando heterodímeros u oligómeros de mayor tamaño. Dichas interacciones no sólo alteran las afinidades por los agonistas sino que modifican las respuestas de los receptores a los nucleótidos de guanina así como a la toxina pertusis, sugiriendo cambios en las propiedades de transducción de señal.

### **COMPONENTE PERIFÉRICO DE LOS EFECTOS DE LOS OPIOIDES SOBRE LA EXTRAVASACIÓN PLASMÁTICA.**

Una vez establecidos los efectos sobre la extravasación plasmática y su naturaleza opioide mediante la reversión por antagonistas, nos planteamos si el efecto inhibidor exudativo se debe a la activación de los RO expresados en zonas cerebrales y espinales (SNC) y/o en estructuras nerviosas periféricas (SNP). En estudios de analgesia, la activación del componente central y/o periférico por agonistas opioides de doble acción depende de la dosis administrada y del nivel de efecto. Parece ser que los efectos observados tras la administración de dosis bajas de agonistas opioides (inferiores a las DE<sub>50</sub>) son consecuencia de la interacción de éstos con los RO expresados en estructuras periféricas, mientras que los inducidos por dosis altas (superiores a las DE<sub>50</sub>) se producen por la activación de los RO periféricos y centrales (Shook *et al.*, 1987). En nuestro estudio hemos empleado agonistas opioides como la morfina, el fentanilo, el DPDPE, el SNC80 y el U-50,488H,

capaces de atravesar en mayor o menor grado la barrera hematoencefálica (BHE). Pensamos que el efecto antiexudativo observado podrá deberse tanto a la activación de RO periféricos como centrales.

Para discernir si los receptores implicados en el efecto antiextravasación plasmática son únicamente periféricos se han utilizado agonistas y antagonistas que por sus características químicas no pueden atravesar la BHE, actuando exclusivamente sobre estructuras periféricas. En estos experimentos se han empleado: a) un agonista  $\mu$  selectivo conocido como PL017, ( $[N\text{-MePhe}^3\text{-D-Pro}^4]$ , que es un péptido no encefalínico, análogo de la morficeptina, b) un antagonista no selectivo como el metilyoduro de naloxona (derivado de clorhidrato de naloxona) y c) un antagonista  $\mu$  selectivo como el CTOP ( $Cys^2\text{-Tyr}^3\text{-Orn}^5\text{-Pen}^7\text{-amida}$ ), octapéptido cíclico, análogo de la somatostatina.

En el primer grupo de experimentos, el efecto del fármaco PL017 sigue la misma tendencia que los anteriores agonistas opioides. Es decir, no modifica el edema inflamatorio de manera significativa pero inhibe, con una relación dosis-dependiente, la extravasación plasmática. El fármaco también manifiesta los efectos anti y proexudativos descritos anteriormente. De estos resultados podemos afirmar que los RO  $\mu$  expresados en estructuras periféricas están implicados en el efecto inhibidor de la extravasación.

La reversión de los efectos antiexudativos de los diferentes agonistas con los dos antagonistas, metilyoduro de naloxona y CTOP, ambos de acción predominantemente periférica, nos vuelve a demuestrar que hay un componente opioide periférico implicado en la inhibición de la extravasación plasmática. Tras la administración de metilyoduro de naloxona se revierte el efecto inhibidor de los agonistas  $\mu$  selectivos morfina, fentanilo y PL017 así como los agonistas  $\delta$  DPDPE y SNC 80, a sus correspondientes DE<sub>80</sub>. La administración de CTOP revierte los efectos antiexudativos tanto de la morfina como del PL017. Con todos estos resultados demostramos que la extravasación plasmática está mediada por RO localizados en estructuras periféricas, neuronales y/o no neuronales.

## **LOCALIZACIÓN PERIFÉRICA DE LOS RECEPTORES $\mu$ Y $\delta$ IMPLICADOS EN EL CONTROL DE LA EXTRAVASACIÓN PLASMÁTICA DURANTE LA INFLAMACIÓN AGUDA.**

En nuestro modelo los RO implicados en la modulación de la inflamación aguda periférica pueden localizarse en las terminaciones nerviosas sensoriales, en las fibras postganglionares simpáticas, en las células inmunes y/o en el endotelio vascular. Para establecer más concretamente la localización periférica de estos receptores a nivel neuronal (terminaciones sensoriales y simpáticas) y/o extraneuronal (células del sistema inmune) así como conocer la relevancia del sistema histaminérgico en el efecto inhibidor de los opioides sobre la extravasación de plasma, se llevaron a cabo experimentos con diferentes tratamientos, previos a la inducción de la inflamación. En el presente trabajo los tratamientos utilizados están orientados a eliminar cada uno de los siguientes componentes implicados en la respuesta inflamatoria:

- Terminaciones sensoriales periféricas, mediante la neurotoxina capsaicina (CAP) que daña selectivamente dichas fibras sensoriales.
- Terminaciones postganglionares, mediante 6-hidroxidopamina (6-OHDA) que lesiona selectivamente estas fibras simpáticas.
- Sistema inmune, mediante el immunosupresor ciclosporina A (Cs A), que disminuye la población de células inmunes.
- Histamina, mediante el compuesto 48/80, que induce una depleción de este mediador contenido en los mastocitos, o bien tras la administración de antagonistas histaminérgicos específicos para cada subtipo: mepiramina (anti-H<sub>1</sub>), cimetidina (anti-H<sub>2</sub>) y tioperamida (anti-H<sub>3</sub>).

En estas nuevas condiciones experimentales se evaluó el efecto de los agonistas opioides  $\mu$  y  $\delta$ .

### **TERMINACIONES SENSORIALES PERIFÉRICAS.**

La capsaicina tiene un amplio espectro de efectos sobre las neuronas sensoriales que van desde la excitación de estas neuronas hasta la muerte de las mismas. La intensidad de los efectos *in vivo* depende de la edad del animal, el tiempo de tratamiento, así como la dosis empleada. Los efectos más intensos se consiguen tratando animales neonatos con altas dosis de capsaicina. En neonatos de dos días, una única dosis de 50 mg.kg<sup>-1</sup> administrada sistémicamente, lleva a la

destrucción de células neuronales en los ganglios dorsales asociada a la pérdida de entre el 50-90% de las fibras amielínicas periféricas. Mientras que la administración subcutánea de una o más dosis de capsaicina en animales adultos produce efectos menos intensos en los ganglios dorsales que en las mismas estructuras de los neonatos. No obstante se describen pérdidas significativas en el número de axones amielínicos periféricos. La diferencia de efectos obtenidos se debe a que en animales neonatos el organismo aún está inmaduro. El tratamiento con capsaicina induce directamente sus efectos tóxicos sobre las neuronas sensoriales. La pérdida de funcionalidad axonal impide un correcto transporte sobre todo del factor de crecimiento neuronal y por lo tanto se incrementa la lesión sobre las fibras. Se han demostrado cambios locales (McLachlan y Hu, 1998), que alteran la respuesta fisiológica y farmacológica de las fibras primarias aferentes que transmiten la información táctil y nociceptiva. Las neuronas localizadas en el asta dorsal, que sinapsan entre ellas (Noguchi y Ruda, 1992; McCarson y Krause, 1994), modifican los niveles de expresión del ARNm de precursores de POE, RO, SP y CGRP en los ganglios dorsales. La supresión del tratamiento lleva a la regeneración de las neuronas sensoriales.

Por otra parte, los protocolos experimentales en los que se emplean animales adultos son muy diversos. Podemos encontrar desde los que utilizan una sola dosis de 50 mg.kg<sup>-1</sup> hasta los que administran entre dos y cuatro dosis hasta alcanzar cantidades totales de 400 mg.kg<sup>-1</sup> (Winter *et al.*, 1993). En nuestro estudio se ha utilizado el protocolo descrito por Lynn *et al.* (1990) con el que se obtiene la degeneración de las fibras-C nerviosas (Lynn *et al.*, 1990) localizadas a nivel subepidérmico (Navarro *et al.*, 1995) que expresan y liberan los neurotransmisores proinflamatorios SP y CGRP. Como se ha descrito anteriormente la hiperemia (incremento de flujo sanguíneo que lleva a la vasodilatación) tiene lugar en las arteriolas, mientras que el incremento de permeabilidad que da lugar a la extravasación de plasma se sucede en las vénulas postcapilares (Kowalski *et al.*, 1990). La separación espacial de hiperemia y extravasación proteica sugiere que el control de ambas respuestas vasculares tenga lugar por distintas fibras. Las fibras C y A $\delta$  inducen vasodilatación arteriolar. Sólo las primeras incrementan la permeabilidad vascular (Jänig y Lisney, 1989). Las fibras C que regulan la extravasación plasmática están conectadas a fibras nociceptivas pero sólo una parte de éstas puede causar extravasación de plasma (Bharali y Linney, 1992). No

obstante, no todas estas fibras vasodilatadoras son sensibles a capsaicina. Así pues, tras el tratamiento con la neurotoxina se consigue una disminución cuantitativa de estas fibras alterando la respuesta no sólo vasodilatadora sino también exudativa durante la inflamación aguda.

Para demostrar la fiabilidad del tratamiento con CAP se realizaron estudios de hiperalgesia mecánica mediante el test de Randall-Selitto. Los resultados obtenidos tras la aplicación de una presión progresivamente creciente sobre una de las extremidades posteriores del animal, sin inflamar y sin tratamiento con CAP, corroboró resultados obtenidos por otros grupos, que demuestran que la respuesta a dicho estímulo es diferente en condiciones de inflamación o no inflamación. En animales no tratados con CAP y, por lo tanto, con los nociceptores periféricos íntegros, se observaron diferencias en la respuesta cuando se aplicaba la presión sobre una pata no inflamada o inflamada. Esto es, el umbral al dolor tras el estímulo mecánico es menor en la pata inflamada que en la pata no inflamada. Esto es debido a que durante la respuesta inflamatoria se liberan agentes sensibilizantes como histamina, bradicinina, 5-HT, PGE<sub>2</sub>, adrenalina, que interaccionan con receptores específicos expresados en las terminaciones sensoriales nociceptivas. De esta manera se activa el sistema de transducción (receptor/canales iónicos) presente en dichas fibras periféricas, lo que genera corrientes despolarizantes como respuesta a este estímulo nocivo iniciándose potenciales de acción transmitidos hasta el SNC.

Como ya se ha descrito anteriormente, la administración crónica de capsaicina lleva a la degeneración y reducción del número de fibras sensoriales nociceptivas en la capa subepidérmica. Sin estas terminaciones nerviosas la respuesta nociceptiva disminuirá a la presión mecánica aplicada sobre la pata del animal. Con los resultados obtenidos en animales tratados con CAP, pero en ausencia de inflamación, queda corroborado este hecho. Es decir, la transmisión nociceptiva está inhibida debido a que el número de fibras sensoriales está disminuido. Se detecta que en animales inflamados, tratados con capsaicina y por lo tanto con un menor número de fibras nociceptivas, este umbral aún es mayor. Durante la inflamación se liberan mediadores proinflamatorios, que interaccionan con sus receptores específicos expresados en las fibras sensoriales, iniciando la transmisión nociceptiva. El tratamiento con capsaicina permite que el animal en una situación de inflamación sienta menos dolor. Si no hay terminaciones sensoriales

los mediadores proalgésicos no pueden interaccionar con estas estructuras porque están en menor número. Posiblemente, dichos mediadores interactuarán con otras estructuras que a manera de mecanismo “compensatorio” reducen el dolor.

Mediante inmunohistoquímica se pudo analizar, de manera cualitativa, la inervación cutánea de la zona plantar de ratas sometidas a lesiones inflamatorias. La cuantificación de las fibras nerviosas requiere un gran dominio de la técnica por lo que nos limitamos a valorar la pérdida o no de inmunoreactividad a determinados anticuerpos específicos en animales tratados con CAP, inflamados y no inflamados, ya que resulta suficiente para nuestro objetivo. Los resultados obtenidos mostraron una leve pérdida de reactividad del tejido a los anticuerpos contra PGP 9.5, proteína citoplasmática, y CGRP, neuropéptido proinflamatorio, ambos característicos de las fibras sensoriales nociceptivas. La disminución de fluorescencia es un indicativo de la degeneración de dichas fibras.

Con los resultados obtenidos, tanto en la prueba de hiperalgesia mecánica como de inmunohistoquímica, se demuestra que el tratamiento con capsaicina induce una disminución en la población de terminaciones sensoriales y por lo tanto, podemos establecer la eficacia del tratamiento con el agente neurotóxico. En esta condición experimental los porcentajes de edema y de extravasación plasmática obtenidos después de tratar los animales con capsaicina, no muestran diferencias significativas al compararlos con los obtenidos en animales control. De estos resultados podemos destacar que en el modelo de inflamación aguda inducida por carragenina las terminaciones sensoriales participan poco en el control del edema y de la extravasación de plasma.

En estas condiciones experimentales, destacamos que morfina, agonista  $\mu$ , mantuvo su capacidad antiexudativa en animales tratados con CAP, mientras que fentanilo, también agonista  $\mu$ , perdió completamente su efecto antiexudativo, alcanzando porcentajes comparables a los obtenidos con los grupos control (SS y CAP). Así pues, la respuesta antiexudativa de los dos agonistas  $\mu$  resulta distinta en animales con una disminución en el número de fibras nociceptivas. Estos resultados sugieren que los RO  $\mu$  sobre los que actúan ambos agonistas no son exactamente los mismos. Parece ser que los RO  $\mu$  expresados en las terminaciones sensoriales participan en la modulación inhibidora de la extravasación de plasma inducida por el opioide fentanilo durante la inflamación periférica, y que los efectos de la morfina

están mediados principalmente por RO extraneuronales o localizados en las terminaciones sensoriales no sensibles a capsaicina.

El tratamiento con CAP provocó que la administración del agonista  $\delta_1$  selectivo, DPDPE, perdiera parcialmente el efecto antiexudativo inducido por este fármaco en animales control. Esto nos indica que los RO  $\delta$ , y más concretamente los  $\delta_1$ , expresados en las terminaciones sensoriales no participan, mayoritariamente, en el mecanismo de modulación del proceso exudativo. Así pues, los RO  $\delta$  implicados en esta modulación estarían expresados en estructuras no sensoriales.

Las diferencias antiexudativas observadas entre morfina y fentanilo hace pensar no sólo en la implicación de RO  $\mu$  de distintos subtipos sino también en la posible participación de otros receptores, opioides o no. Por esta razón y en base a estudios de analgesia se valoró el efecto  $\delta$  de la morfina. En estos estudios se ha descrito la participación de los RO  $\delta$  en el efecto antinociceptivo de la morfina en condiciones de inflamación y en mismo modelo que nosostros utilizamos (Ossipov *et al.*, 1995). Además, estudios realizados por Gustafsson *et al.* (2001) demuestran que morfina requiere de los RO  $\delta$  para inducir la liberación a niveles espinal de CCK, neuropéptido con propiedades anti-opioides.

Del estudio realizado con naltrindol (antagonista  $\delta$ ) con el que se pretendía valorar la participación de los receptores  $\delta$  en los efectos opioides  $\mu$  sobre la extravasación de plasma se demuestra que el bloqueo de los RO  $\delta$  induce cambios sólo en la respuesta antiexudativa de la morfina. En estas condiciones, morfina pierde la capacidad de inhibir la extravasación plasmática, mientras que fentanilo mantiene porcentajes de inhibición aproximados al 80%. Estudios de interacciones físicas entre receptores que forman homo y/o heterodímeros (Gomes *et al.*, 2000) nos permiten establecer que los RO  $\mu$  sobre los que actúa la morfina requieren la activación de los RO  $\delta$ . Posiblemente se establece una interacción física entre ambos subtipos de RO, formándose heterodímeros. Esta nueva estructura permitiría que la morfina inhibiera la extravasación de plasma. El bloqueo de los RO  $\delta$  por el antagonista naltrindol, impidiría la dimerización entre los RO  $\mu$  y  $\delta$  y por lo tanto, que la morfina ejerciera su efecto. En cuanto al fentanilo, el bloqueo de los RO  $\delta$  no modifica su capacidad inhibidora de la extravasación plasmática. Así pues, en esta situación, este opioide puede interactuar con los RO  $\mu$  expresados en estructuras neuronales o no, independientemente del estado en que se halle el subtipo  $\delta$ .

Deducimos que la morfina actúa sobre los RO  $\mu$  periféricos, ya que se consigue revertir el efecto antiexudativo empleando el antagonista  $\mu$  selectivo y de acción periférica, CTOP. Sin embargo para ejercer este efecto inhibidor la morfina requiere la activación de los receptores  $\delta$ . La activación del subtipo  $\delta$  permitiría que sus ligandos endógenos, como las encefalinas, interactúasen con él induciéndose cambios intracelulares que permitirían que la morfina pudiera reducir la extravasación plasmática.

### **TERMINACIONES POSTGANGLIONARES SIMPÁTICAS.**

Las fibras simpáticas postganglionares amielínicas participan, entre otras funciones, en la regulación del flujo sanguíneo cutáneo. En condiciones fisiológicas se establece una interacción antagonística entre la vasoconstricción evocada por las fibras simpáticas postganglionares y la vasodilatación inducida por la estimulación de las terminaciones aferentes nociceptivas (Häbler *et al.*, 1997). En una situación de inflamación aguda se manifiesta principalmente vasodilatación. Así pues, durante el proceso inflamatorio la respuesta vasodilatadora de las fibras sensoriales supera a la vasoconstricción inducida por las fibras simpáticas.

La administración i.p. del compuesto químico 6-hidroxidopamina (6-OHDA) lleva a la depleción de las catecolaminas que se almacenan en las terminaciones simpáticas (Levine *et al.*, 1986) llegando incluso a la destrucción de estas neuronas tras el tratamiento crónico. Esta sustancia penetra en la terminación catecolaminérgica por el sistema de transporte común de las monoaminas, liberando inicialmente parte de la NA. Dentro de la terminación lesiona y destruye la parte más distal, sin alterar el resto de la neurona. Esta capacidad lesiva parece deberse a la acción oxidante de sus metabolitos. La 6-OHDA no pasa la BHE por lo que su administración sistémica sólo lesiona las terminaciones periféricas noradrenérgicas. Tras la supresión del tratamiento, las fibras pueden regenerarse en un intervalo de tiempo de varias semanas.

Nuestros resultados ponen de manifiesto variaciones importantes en los porcentajes de edema y de extravasación plasmática inducidas por el tratamiento crónico con 6-OHDA. Estos resultados corroboran los obtenidos por otros grupos (Cambridge *et al.*, 1996). Tras la administración de 6-OHDA se obtienen incrementos significativos ( $P<0.05$ ) del edema al compararlos con los porcentajes obtenidos en

animales control. La pérdida de las fibras simpáticas induce un descenso en los niveles de NA, potente vasoconstrictor, favoreciéndose así la vasodilatación, causa principal de la formación del edema. Contrariamente, la pérdida de fibras simpáticas lleva a reducir significativamente ( $P<0.001$ ) los porcentajes de extravasación de plasma al compararlos con animales control (animales no tratados con 6-OHDA). Recordemos que la vasodilatación se produce principalmente en las arteriolas precapilares, mientras que el incremento de permeabilidad vascular tiene lugar en las vénulas postcapilares. El mediador proinflamatorio bradicinina induce incrementos de la extravasación plasmática dependiente de la actividad de las fibras simpáticas postganglionares (Lee et al., 1991; Bjerknes et al., 1991; Miao et al., 1996), potenciados por las PG sintetizadas en dichas fibras (Gonzales et al., 1991). La reducción en el número de fibras simpáticas impide la interacción de la bradicinina así como de la síntesis de PG, potentes inductores de la extravasación de plasma, razón por la cual se reduciría el porcentaje de ésta.

Es importante tener en mente que la respuesta inflamatoria es el resultado del equilibrio que se establece entre diferentes sistemas fisiológicos (estructuras nerviosas, celulares, mediadores, etc). Cualquier cambio que tenga lugar sobre alguno de estos elementos inevitablemente va a inducir cambios en la respuesta final que nosotros observamos, ya sea el edema o la extravasación de plasma. No obstante, el papel de cada uno de estos componentes va a tener mayor o menor relevancia en el proceso inflamatorio y por lo tanto el organismo va a poder o no compensar su falta de funcionalidad. Según nuestros resultados la modificación del componente neuronal simpático postganglionar altera la evolución de la respuesta inflamatoria, indicando que en este modelo de inflamación aguda son importantes las acciones derivadas de la activación de dichas fibras.

Los resultados obtenidos tras la administración de morfina, fentanilo o DPDPE, en animales tratados con 6-OHDA, establecen diferencias entre estos fármacos en cuanto a sus efectos antiexudativos. Así pues, la pérdida completa de la capacidad inhibidora de la morfina sobre la extravasación plasmática nos hace pensar que el sistema simpático tiene una importante participación en el efecto inhibidor de este opioide. Se ha descrito la localización de RO en estas fibras nerviosas (Berzetei et al., 1987, 1988) y su implicación en los efectos antinociceptivos de agonistas  $\delta$  y  $\kappa$  en un modelo de hiperalgésia por bradicinina (Taiwo y Levine,

1991), si bien resulta un tanto confusa (Schäfer *et al.*, 1994). Tras la administración de fentanilo, en estas mismas condiciones experimentales, se observa que este opioide mantiene parte de su capacidad inhibidora sobre la exudación plasmática. Estas diferencias en la respuesta antiexudativa nos indican que los agonistas  $\mu$  interaccionan con RO específicos expresados y localizados en estructuras nerviosas distintas, dando más fuerza a los resultados obtenidos con capsaicina. Parece ser que la morfina requiere la integridad de las fibras simpáticas, mientras que el fentanilo necesita la presencia de las fibras sensoriales para poder inhibir la extravasación de plasma. Aicher *et al.* (2001) describen distribuciones del gen MOR-1 en neuronas adrenérgicas, hecho que sugiere que los agonistas  $\mu$  selectivos pueden actuar directamente sobre dichas neuronas influyendo en la actividad de las mismas.

En cuanto al DPDPE, agonista selectivo para los RO  $\delta$ , su administración induce efectos antiexudativos comparables a los obtenidos en el grupo control, de manera que podemos establecer que los RO  $\delta$  implicados en la regulación de la extravasación de plasma no están localizados en su mayoría en las terminaciones nerviosas

pe/\3rf7C!!#+]!:/\3rf7C!!#4`!pSb5I^mN!!#4`!**I\&G` 56([J!!#.A!L;A4TGIE!!#(\!\!:/\3rf7@!!TGIE!!#(\!\!:/\3rf7@!!#+]!C5]3rf7B!!tY!&srY2?3\_8!!"nW!&afW2ZNh:IK0@..!!#(\!\!:/\49,@F!!#1\_!pSb5I^mP!!#@d!(Hqg7K<ET!!#:b!C5]3<0%!=!!"nW!&=NS0`V2,!!"YP!%e0N/H>c\$!!"ML!%%[G-3+#!"/B!\$2+?\*<6'Y!!!:#GV8(B=FP!!!i9!#5J6``\4K!!!Z4"oo58!"f22Bat+C%KHJ=!!!H.!"/c,\$31&3!!!9)!iQ)#QOi0!!!6(!`K(#64`/!!!6(!`K(#64`/!!!6(!`K(#64`/!!!?+/!"/c,\$ig88!!!B,!iQ)#QOi0!!!6(!"WE"onW)!!!e!.t9\*!.t9\*!.t:B!.t9\*!.t9\*!.t:#!.t9\*!.t9\*!.t9\*!KoA!.t9>!##A5!<3\$"onW-!!!6(!a Cs A pierde mucha eficacia. El bloqueo de la síntesis de citocinas y de la expresión de sus receptores inhibe la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T, quedando inactivados los mecanismos de la respuesta inmunitaria (Härtel *et al.*, 2002).**

Durante la inflamación, el SOE tiene un papel modulador local, liberándose POE ( $\beta$ -endorfina, encefalinas, dinorfina-A) expresados en los linfocitos (T y B) y otras células inmunes (monocitos y macrófagos), péptidos que inducen antinocicepción tras la activación de los RO periféricos (Parsons *et al.*, 1990). Al unirse con los RO, neuronales y/o extraneuronales, disminuyen la excitabilidad de las fibras aferentes

sensoriales y la liberación de neurocininas (SP, CGRP) desde éstas, provocando el efecto analgésico (Stein *et al.*, 1990). Corticotropina, IL-1 $\beta$  y otras citocinas causan liberación de POE desde las células inmunes, con potentes efectos en tejidos inflamados pero no en tejidos normales (Schäfer *et al.*, 1994). Podemos pensar que estos POE también pueden modular otros signos inflamatorios como son el edema y la extravasación de plasma. Los resultados obtenidos en el estudio del antagonismo de los opioides nos permiten demostrar el papel que ejercen estos péptidos a nivel de la respuesta inflamatoria. El aumento de la extravasación de plasma tras el bloqueo con naltrindol (NTI) es un buen indicador de esta modulación fisiológica.

Sin embargo el tratamiento con el inmunosupresor no modifica los porcentajes de edema y extravasación plasmática obtenidos, al compararlos con animales control (animales no tratados con Cs A). Estos resultados demuestran que, en este modelo de inflamación aguda, el sistema opioide endógeno no modula de manera relevante la evolución del edema y de la extravasación plasmática. Nuestros resultados demuestran también que, en este modelo de inflamación aguda periférica, el sistema inmune no juega un papel importante, es decir, la inmunosupresión no impide que agonistas opioides  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ , como la morfina, el DPDPE y el U-50,488H, respectivamente, inhiban a sus correspondientes DE<sub>80</sub> la extravasación plasmática inducida por el agente flogógeno. Todo esto indica que los mecanismos opioides que regulan la extravasación plasmática son independientes del sistema inmunitario. Está demostrado que en los procesos de analgesia las células inmunes son la fuente principal de POE en los tejidos periféricos inflamados. Así pues, la disminución de estas células reduce la cantidad de POE que pudieran ser liberados en la zona lesionada. Por lo tanto, sería lógico pensar que la disminución en el número de células inmunes llevaría implícito una menor liberación de POE, y esto reduciría la capacidad moduladora del sistema opioide endógeno sobre la extravasación de plasma. Sin embargo, no sucede así. El efecto inhibidor de los opioides sobre la extravasación de plasma se mantiene en una situación de inmunosupresión. Podemos plantear que los POE endógenos implicados en la modulación pudieran liberarse desde estructuras no periféricas. No obstante, la acción de las encefalininas limita esta hipótesis.

## **SISTEMA HISTAMINÉRGICO.**

El tratamiento con el compuesto depletor de histamina 48/80 induce el vaciado de los gránulos contenidos en los mastocitos con la consecuente liberación periférica de dicho mediador proinflamatorio (Banks *et al.*, 1990). Este tratamiento no produce depleción en los mastocitos localizados en estructuras centrales (Rozniecki *et al.*, 1999). Así pues, el tratamiento con el compuesto 48/80 no modifica los porcentajes de edema y de extravasación en animales a los que se les han disminuido los niveles de histamina previamente a la inducción de la inflamación aguda. La valoración tanto del edema como de la extravasación plasmática se realiza a las tres horas de haber inyectado carragenina. Si tenemos en cuenta que en este momento los mediadores proinflamatorios que predominan son las PG y las citocinas, podemos intuir que la falta de histamina, principal mediador de la fase inicial de la inflamación, ha sido compensada por otros mecanismos, obteniéndose al final el mismo resultado en cuanto al edema y la extravasación plasmática.

Los efectos inhibidores sobre la extravasación de plasma de los agonistas opioides  $\mu$ , morfina y fentanilo, se ven alterados por los niveles bajos de histamina como resultado del tratamiento con el compuesto 48/80. En el caso de la morfina, el efecto es proexudativo, mientras que el fentanilo, aunque no llega a los niveles de extravasación obtenidos con la morfina, pierde su efecto inhibidor en casi un 55%. Esto nos indica que la histamina liberada al inicio de la inflamación induce algún tipo de cambio básico o fundamental en alguno de los mecanismos que intervienen en la regulación de la extravasación plasmática. Esta modificación permitiría que morfina ejerciera su efecto farmacológico, de manera que al final del experimento, se cuantificaran disminuciones en la extravasación de plasma. En cuanto a los resultados obtenidos tras la administración de fentanilo se demuestra que este fármaco también necesita de dicha amina para ejercer su efecto inhibidor sobre la extravasación plasmática. No obstante, observamos que aún siendo los dos fármacos, morfina y fentanilo, selectivos para los RO  $\mu$ , los mecanismos a través de los cuales ejercen sus efectos antiinflamatorios (inhiben la extravasación de plasma) son diferentes. Se ha descrito la inhibición de la transmigración leucocitaria por la acción de la morfina sobre RO  $\mu_3$ , unión que no comparte ni el fentanilo ni los péptidos endógenos (Stefano *et al.*, 1995). No obstante, con estos resultados no podemos llegar a establecer con exactitud el mecanismo concreto de acción, pero

sí corroboramos nuestros resultados anteriores: morfina y fentanilo son agonistas  $\mu$  con mecanismos antiinflamatorios diferentes.

Por el contrario, el empleo del agonista selectivo  $\delta_1$ , DPDPE, mantiene los niveles de extravasación por debajo del 20%, indicando que el mecanismo de acción de este fármaco es independiente del sistema histaminérgico.

El bloqueo con antagonistas específicos para los distintos subtipos de receptores histaminérgicos,  $H_1$ ,  $H_2$  y  $H_3$  (mepiramina, cimetidina y tioperamida, respectivamente) lleva a una respuesta antiinflamatoria distinta en función del agonista opioide empleado. La histamina liberada actúa sobre receptores  $H_1$  y  $H_2$ , que se encuentran, el primero en las células endoteliales de intestino, bronquios y grandes vasos donde el efecto es contracción, y el segundo en el músculo liso de la microcirculación donde se produce relajación, así como en células parietales gástricas donde inducen producción de HCl. Al estimularse el receptor  $H_1$  se activa el sistema de PG y a través de PLC se forma IP<sub>3</sub> que permite liberación intracelular de Ca<sup>++</sup>, los altos niveles de calcio tienen dos efectos: uno se relaciona con la activación de una PK-calcio/calmodulina dependiente (PKCa<sup>++</sup>/CaM), para inducir la contracción de la célula endotelial y de esta manera aumentar la permeabilidad vascular. El otro efecto corresponde a la activación de la PLA2 que induce la formación de PGI<sub>2</sub>, determinando las propiedades antiagregantes y la activación de tromboxanos que median la agregación plaquetaria; estas dos se mantienen en equilibrio dinámico explicando las propiedades antagónicas que tiene el endotelio. La misma PLA2 activa la NOS<sub>i</sub> para generar óxido nítrico, el cual difunde a la célula muscular lisa que por vía de guanidil ciclase genera relajación muscular. Esta vía es potenciada por la PGI<sub>2</sub>. Otra acción secundaria a la activación del receptor  $H_1$  es la activación de PK en la membrana celular que induce mayor síntesis proteica, útil para la expresión de moléculas de adhesión. Al estimularse el receptor  $H_2$  se activa el sistema de proteína G y ésta a través de la adenilciclase induce la formación de AMPc, que produce relajación sostenida y lenta de la fibra muscular lisa de los vasos sanguíneos.

Cuando bloqueamos el receptor  $H_1$ , morfina y fentanilo inhiben la extravasación de plasma en porcentajes iguales a los obtenidos en animales control. La imposibilidad de la histamina para activar el receptor  $H_1$ , principal responsable de la vasodilatación en la fase inicial de la inflamación así como de la síntesis de moléculas de adhesión leucocitaria, desplaza el sistema hacia los otros

dos receptores, H<sub>2</sub> (vasodilatador) y H<sub>3</sub> (vasoconstrictor). Por el contrario, el bloqueo del subtipo H<sub>2</sub> impide el efecto inhibidor de los dos agonistas. Esto nos indica que la activación del H<sub>1</sub> y H<sub>3</sub> no es suficiente para permitir que ambos agonistas inhiban la extravasación de plasma.

El subtipo H<sub>2</sub> además de sus acciones sobre la circulación sanguínea está implicado en la respuesta analgésica de los opioides (Houhg et al., 2000), por la participación mayoritaria de receptores localizados en estructuras nerviosas centrales. Se ha demostrado como mastoparan, 48/80, péptidos como SP, cininas, y morfina estimulan mecanismos fisiológicos por la activación directa de la proteína G, independientemente de su receptor específico (Mousli et al., 1990; Bueb et al., 1990).

Se han descrito inhibiciones de la extravasación plasmática en vías respiratorias tras el empleo de agonistas específicos al subtipo H<sub>3</sub> (Ichinose et al., 1990), antagonizando este efecto antiinflamatorio por ciproxifan (Kathman et al., 1998). Nuestros resultados demuestran que el bloqueo de este subtipo de receptor histaminérgico con el antagonista selectivo H<sub>3</sub>, tioperamida, modifica la respuesta inhibidora opioide sobre la extravasación de plasma, siendo distinta según se trate de morfina o de fentanilo. No obstante, en ambos casos se pierde el efecto inhibidor de dichos fármacos. Los porcentajes de extravasación plasmática obtenidos con morfina son comparables a los del grupo control, mientras que tras la administración de fentanilo se obtienen incrementos significativamente distintos ( $P<0.001$ ) a los obtenidos con morfina o con el grupo control. Estos resultados parecen indicar que el fentanilo requiere de la activación de los subtipos H<sub>3</sub> para poder ser eficaz como antiinflamatorio.

Nuevamente, el agonista selectivo δ<sub>1</sub>, DPDPE, mantiene los porcentajes antiexudativos esperados, lo que corrobora que su mecanismo de acción es independiente del sistema histaminérgico.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio nos permite deducir que el efecto inhibidor de los opioides sobre la extravasación de plasma se debe a su interacción con diferentes estructuras anatómicas, neuronales y no neuronales, evidenciando una importante interrelación entre los sistemas endógenos opioide e histaminérgico durante la respuesta inflamatoria aguda periférica. Podemos sugerir que los agonistas opioides μ y δ inhiben la extravasación de plasma, con una relación dosis-

dependiente, por la activación de los RO expresados en estructuras periféricas. Según se trate de agonistas  $\mu$  o  $\delta$  los mecanismos implicados en este efecto son distintos, estableciéndose también diferencias entre agonistas selectivos para el mismo RO.

- El mecanismo de acción de la **morfina** a través del cual inhibe la formación de extravasación plasmática implicaría principalmente a los RO  $\mu$  localizados en las fibras simpáticas postganglionares, siempre y cuando los RO  $\delta$  y el sistema histaminérgico estuvieran también activados. Hay estudios que evidencian una interacción entre las fibras simpáticas postganglionares y otras que contienen histamina (Campos y Montenegro, 1998). Si bien los receptores histaminérgicos implicados directamente en la respuesta proinflamatoria son los subtipos H<sub>1</sub> localizados en el endotelio vascular, parece que son los receptores H<sub>2</sub> los que participan en este efecto modulador. Se ha descrito que la administración de antagonistas H<sub>2</sub> inducen la pérdida de antinocicepción por opioides, hecho que plantea una posible similitud vs. nuestro estudio (Hough y Nalwalk, 1992).
- Sin embargo, fentanilo, induciría el efecto inhibidor sobre la extravasación de plasma mediante la activación de los RO  $\mu$  presinápticos expresados en las fibras sensoriales. Este hecho llevaría a la disminución de la liberación de SP y otras neuropeptidas capaces de inducir extravasación de plasma por su interacción directa con los receptores expresados en el endotelio vascular. Este fármaco requiere que el sistema histaminérgico esté también activado, pero sobre todo, que las acciones vasodilatadoras (receptores H<sub>2</sub>) y vasoconstrictoras (receptores H<sub>3</sub>) moduladas por la histamina, estén en equilibrio. El bloqueo del subtipo H<sub>3</sub> desplaza el sistema hacia una extravasación desmesurada, hecho que impide que fentanilo ejerza su efecto antiexudativo.
- Según nuestros resultados los RO  $\delta$  tienen un papel importante en la modulación de la extravasación plasmática, independientemente de la situación en la que se encuentre el animal, de manera que podríamos convenir que hay una mayor liberación de encefalinas con capacidad de inducir cambios rápidos a nivel del endotelio vascular, y más concretamente sobre las uniones interendoteliales.

Procesos patológicos como el asma, la peritonitis, las inflamaciones articulares postquirúrgicas se caracterizan por una importante extravasación proteica. En vista de nuestros resultados la administración de opioides en estas

situaciones no sólo favorecerá la analgesia sino que ampliamos los efectos antiinflamatorios por la reducción de este parámetro inflamatorio.

1. La administración subplantar del agente inflamatorio carragenina induce la aparición de edema y extravasación plasmática, que se desarrollan de forma simultánea, permitiendo valorar ambos parámetros inflamatorios al mismo tiempo.
2. La administración sistémica de morfina (agonista  $\mu$  selectivo), de DPDPE y de SNC 80 (agonistas  $\delta$  selectivos) inhiben la formación de edema sin que se pueda establecer una relación dosis-respuesta. Por otra parte, fentanilo y PL017 (agonistas selectivos  $\mu$ ) y  $\kappa$  U-50,488H (agonista  $\kappa$ ), no modifican el edema durante la inflamación aguda inducida por carragenina.
3. Los agonistas opioides de acción  $\mu$  y  $\delta$ , inducen un efecto inhibidor bifásico sobre la extravasación plasmática, alcanzándose valores antiexudativos del 100%. El agonista  $\kappa$  U-50,488H, reduce aproximadamente un 50 % la extravasación plasmática sin guardar relación dosis – efecto.
4. La reversión de los efectos anti-exudativos mediante la administración de antagonistas como clorhidrato de naloxona (no selectivo), naltrindol ( $\delta$  selectivo) y MR2266 ( $\kappa$  selectivo) demuestra la naturaleza opioide de los efectos inhibidores de la extravasación plasmática. El efecto pro-exudativo de los diferentes antagonistas sugiere que las encefalinas participan en la modulación de la extravasación plasmática durante la inflamación aguda.
5. El administración de fármacos que no atraviesan la BHE, muestra que la extravasación plasmática está modulada por la activación de receptores opioides localizados en estructuras anatómicas periféricas.
6. La eliminación selectiva de componentes implicados en la respuesta inflamatoria (neuronales y extra-neuronales) permite concluir que en este modelo de inflamación aguda, el edema y la extravasación están controlados principalmente por las fibras postganglionares simpáticas, mientras que las terminaciones sensoriales, las células inmunes y la histamina desempeñan papel complementario.

## **Conclusiones**

---

7. Los agonistas opioides  $\mu$  y  $\delta$  evaluados en el presente trabajo, inducen un efecto inhibidor similar sobre la extravasación de plasma. Sin embargo, los distintos fármacos ejercen su acción antiexudativa mediante mecanismos de acción diferentes. En este modelo de inflamación aguda el sistema inmune no participa en la modulación de la extravasación de plasma.
8. La morfina inhibe la extravasación uniéndose a los receptores opioides  $\mu$  localizados en las fibras simpáticas postganglionares. Para producir su efecto requiere, además, la activación de los receptores opioides  $\delta$  y de los receptores histaminérgicos  $H_2$ .
9. El fentanilo inhibe la extravasación, principalmente a través de los receptores opioides localizados en las terminaciones sensoriales periféricas y requiere la activación o integridad de los receptores histaminérgicos  $H_2$ . El bloqueo de los receptores  $H_3$  revierte el efecto inhibidor del fentanilo, e induce un aumento significativo de la extravasación.
10. El efecto inhibidor del agonista  $\delta$  DPDPE disminuye parcialmente al eliminar las fibras sensoriales periféricas o las fibras simpáticas postganglionares. En el efecto antiexudativo de los agonistas  $\delta$  no participa el sistema histaminérgico.

- Aicher SA, Kraus JA, Sharma S, Patel A y Milner TA (2001).** Selective distribution of mu-opioid receptors in C1 adrenergic neurons and their afferents. *J Comp Neurol* 433 (1): 23-33.
- AL-Haboubi HA y Zeitlin IJ (1983).** Re-appraisal of the role of histamine in carrageenan-induced paw edema. *Eur J Pharmacol* 88 (2-3): 169-76.
- Alving K, Sundstrom C, Matran R, Panula P, Hokfelt T y Lundberg JM (1991).** Association between histamine-containing mast cells and sensory nerves in the skin and airways of control and capsaicin-treated pigs. *Cell Tissue Res* 264 (3): 529-38.
- Ammer H y Schulz R (1997).** Enhanced stimulatory adenylyl cyclase signaling during opioid dependence is associated with a reduction in palmitoylated G<sub>s</sub> alpha. *Mol Pharmacol* 52(6):993-9.
- Anton B, Fein J, To T, Li X, Silberstein L y Evans CJ (1996).** Immunohistochemical localization of ORL-1 in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 368: 229-51.
- Antonijevic I, Mousa SA, Schäfer M y Stein C (1995).** Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. *J Neurosci* 15 (1): 165-72.
- Aronson FR, Libby P, Brandon EP, Janicka MW y Mier JW (1988).** IL-2 rapidly induces natural killer cell adhesion to human endothelial cells. A potential mechanism for endothelial injury. *J Immunol* 141:158-63.
- Arthamangkul S, Alvarez-Maubecin V, Thomas G, Williams JT y Grandy DK (2000).** Binding and internalization of fluorescent opioid peptide conjugates in living cells. *Mol Pharmacol* 58(6): 1570-80.
- Balog T, Marotti T, Abramic M, Svoboda-Beusen I y Hrsak I (1999).** The role of aminopeptidase N in Met-enkephalin modulated superoxide anion release. *Immunopharmacology* 41 (1): 11-20.
- Baluk P, Hirata A, Thurston G, Fujiwara T, Neal CR, Michel CC y McDonald DM (1997).** Endothelial gaps: time course of formation and closure in inflamed venules of rats. *Am J Physiol* 272 (1Pt 1): L155-70.
- Baluk P (1997).** Neurogenic inflammation in skin and airways. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2(1):76-81.
- Banks BE, Dempsey CE, Vernon CA, Warner JA y Yamey J (1990).** Anti-inflammatory activity of bee venom peptide 401 (mast cell degranulating peptide) and compound 48/80 results from mast cell degranulation in vivo. *Br J Pharmacol* 99: 350-4.
- Baraniuk JN, Kowalski ML y Kaliner MA (1990).** Relationships between permeable vessels, nerves, and mast cells in rat cutaneous neurogenic inflammation. *J Appl Physiol* 68: 2305-11.
- Barber A, Bartoszyk GD, Bender HM, Gottschlich R, Greiner HE, Harting J, Mauler F, Minck KO, Murray RD y Simon M (1994).** A pharmacological profile of the novel, peripherally-selective kappa-opioid receptor agonist, EMD 61753. *Br J Pharmacol* 113 (4): 1317-27.
- Barber A (1993).** Mu- and kappa-opioid receptor agonists produce peripheral inhibition of neurogenic plasma extravasation in rat skin. *Eur J Pharmacol* 236(1):113-20.

**Barber A y Gottschlich R (1992).** Opioid agonists and antagonists: an evaluation of their peripheral actions in inflammation. *Med Res Rev* 12(5):525-62.

**Barke KE y Hough LB (1993).** Opiates, mast cells and histamine release. *Life Sciences* 53: 1391-9.

**Bartho L y Szolcsanyi J (1981).** Opiate agonists inhibit neurogenic plasma extravasation in the rat. *Eur J Pharmacol* 73 (1): 101-4.

**Basbaum AI y Levine JD (1991).** The contribution of the nervous system to inflammation and inflammatory disease. *Can J Physiol Pharmacol* 69: 647-51.

**Bates DO y Curry FE (1996).** Vascular endothelial growth factor increases hydraulic conductivity of isolated perfused microvessels. *Am J Physiol* 271(6 Pt 2): H2520-8.

**Bayer BM, Gastonguay MR y Hernandez MC (1992).** Distinction between the in vitro and in vivo inhibitory effects of morphine on lymphocyte proliferation based on agonist sensitivity and naltrexone reversibility. *Immunopharmacology* 23 (2): 117-24.

**Bayer BM, Daussin S, Hernandez M y Irvin L (1990).** Morphine inhibition of lymphocyte activity is mediated by an opioid dependent mechanism. *Neuropharmacology* 29 (4): 369-74.

**Belvisi MG, Brown TJ, Wicks S y Foster ML (2001).** New Glucocorticosteroids with an improved therapeutic ratio? *Pulm Pharmacol Ther* 14: 221-7.

**Benoliel JJ, Collin E, Mauborgne A, Bourgoin S, Legrand JC, Hamon M y Cesselin F (1994).** Mu and delta opioid receptors mediate opposite modulations by morphine of the spinal release of cholecystokinin-like material. *Brain Res* 653 (1-2): 81-91.

**Berzetei IP, Fong A, Yamamura HI y Duckles SP (1988).** Characterization of kappa opioid receptors in the rabbit ear artery. *Eur J Pharmacol* 151 (3): 449-55.

**Berzetei IP, Yamamura HI y Duckles SP. (1987).** Characterization of rabbit ear artery opioid receptors using a  $\delta$ -selective agonist and antagonist. *Eur J Pharmacol* 139 (1): 61-6.

**Besse D, Lombard MC, Zakac JM, Roques BP y Besson JM (1990).** Pre and postsynaptic distribution of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Res* 521: 15-22.

**Bharali LA y Lisney SJ (1992).** The relationship between unmyelinated afferent type and neurogenic plasma extravasation in normal and reinnervated rat skin. *Neuroscience* 47(3): 703-12.

**Bidlack JM, Saripalli LD y Lawrence DM (1992).** Kappa-opioid binding sites on a murine lymphoma cell line. *Eur J Pharmacol* 227 (3): 257-65.

**Binder W y Walker JS (1998).** Effect of the peripherally selective kappa-opioid agonist, asimadoline, on adjuvant arthritis. *Br J Pharmacol* 124 (4): 647-54.

**Bjerknes L, Coderre TJ, Green PG, Basbaum AI y Levine JD (1991).** Neutrophils contribute to sympathetic nerve terminal-dependent plasma extravasation in the knee joint of the rat. *Neuroscience* 43 (2-3): 679-85.

- Black PH y Garbutt LD (2002).** Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res* 52 (1): 1-23.
- Blandina P, Giorgetti M, Bartolini L, Cecchi M, Timmerman H, Leurs R, Pepeu G, Giovannini MG (1996).** Inhibition of cortical acetylcholine release and cognitive performance by histamine H3 receptor activation in rats. *Br J Pharmacol* 119 (8): 1656-64.
- Botticelli LJ, Cox BM y Goldstein A (1981).** Immunoreactive dynorphin in mammalian spinal cord and dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 (12): 7783-6.
- Boucher Y, Hofman S, Joulin Y y Azérard J (2001).** Effects of BP 2-94, a selective H<sub>3</sub> receptor agonist, on blood flow and vascular permeability of the rat mandibular incisor pulp. *Arch Oral Biol* 46: 83-92.
- Browstein MJ (1993).** A brief history of opiates, opioid peptides and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5391-3.
- Bryant HU y Holaday JW (1993).** Morphine pellet-induced immunomodulation in mice: temporal relationships. *J Pharmacol Exp Ther* 245 (3): 913-20.
- Bueb JL, Mousli M, Bronner C, Rouot B y Landry Y (1990).** Activation of Gi-like proteins, a receptor-independent effect of kinins in mast cells. *Mol Pharmacol* 38(6): 816-22.
- Burnstock G y Sneddon P (1985).** Evidence for ATP and NA as cotransmitters in sympathetic nerves. *Clin Sci* 68: 89s-92s.
- Bush KA, Kirkham BW y Walker JS (2001).** The kappa-opioid agonist, asimadoline, alters cytokine gene expression in adjuvant arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 40(9):1013-21.
- Butcher EC y Picker LJ (1996).** Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272 (5258): 60-6.
- Cabot PJ (2001).** Immune-derived opioids and peripheral antinociception. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28 (3): 230-2.
- Cambridge H, Ajuebor MN y Brain SD (1996).** Investigation of 6-hydroxydopamine-induced plasma extravasation in rat skin. *Eur J Pharmacol* 301 (1-3): 151-7.
- Campos MM y Calixto JB (2000).** Neurokinin mediation of edema and inflammation. *Neuropeptides* 34:314-22.
- Campos HA y Montenegro M (1998).** Footshock-induced rise of rat blood histamine depends upon the activation of postganglionic sympathetic neurons. *Eur J Pharmacol* 347 (2-3): 159-64.
- Carr DJ (1991).** The role of endogenous opioids and their receptors in the immune system. *Soc Exper Biol Med* 198 (2): 710-20.
- Carter RB y Francis WR (1991).** Capsaicin desensitization to plasma extravasation evoked by antidromic C-fiber stimulation is not associated with antinociception in the rat. *Neurosci Lett* 10;127(1):43-5.
- Casale TB y Abbas MK (1990).** Comparison of leukotriene B4-induced neutrophil migration through different cellular barriers. *Am J Physiol* 258 (4 Pt 1): C639-47.

**Casellas AM, Guardiola H y Renaud FL (1991).** Inhibition by opioids of phagocytosis in peritoneal macrophages. *Neuropeptides* 18 (1): 35-40.

**Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, De Blasi A, Ready N, Furie BC y Furie B (1994).** P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8767-71.

**Chakrabarti S, Prather PL, Yu L, Law PY y Loh HH (1995).** Expression of the mu-opioid receptor in CHO cells: ability of mu-opioid ligands to promote alpha-azidoanilido[<sup>32</sup>P]GTP labeling of multiple G protein alpha subunits. *J Neurochem* 64: 2534-43.

**Chen Y, Mestek A, Liu J y Yu L (1993b).** Molecular cloning of a rat κ opioid receptor reveals sequence similarities to the μ and δ opioid receptor. *Biochem J* 295 (Pt 3): 625-8.

**Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA y Yu L (1993a).** Molecular cloning and functional expression of a μ-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 44 (1): 8-12.

**Childers SR (1991).** Opioid receptor-coupled second messenger systems. *Life Sci* 48 (21): 1991-2003.

**Claude PA, Wotta DR, Zhang XH, Prather PL, McGinn TM, Erickson LJ, Loh HH y Law PY (1996).** Mutation of a conserved serine in TM4 of opioid receptors confers full agonistic properties to classical antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5715-9.

**Cockrell A, Laroux FS, Jourd'heuil D, Kawachi S, Gray L, Van der Heyde H y Grisham MB (1999).** Role of inducible nitric oxide synthase in leukocyte extravasation in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 684-6.

**Coderre TJ, Basbaum AI y Levine JD (1989).** Neuronal control of vascular permeability: interactions between primary afferents, mast cells and sympathetic efferents. *J Neurophysiol* 62 (1): 48-58.

**Coggeshall RE, Zhou S y Carlton SM (1997).** Opioid receptors on peripheral sensory axons. *Brain Res* 764: 126-32.

**Coleman JW (2001).** Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 1 (8): 1397-406.

**Colman RW (1999).** Biologic activities of the contact factors in vivo-potentiation of hypotension, inflammation and fibrinolysis and inhibition of cell adhesion, angiogenesis and thrombosis. *Thromb Haemost* 82 (6): 1568-77.

**Couture R, Harrisson M, Vianna RM y Cloutier F (2001).** Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 429 (1-3): 161-76.

**Crain SM y Shen KF (1998).** Modulation of opioid analgesia, tolerance and dependence by Gs-coupled, GM1 ganglioside-regulated opioid receptor functions. *Trends Pharmacol Sci* 19 (9): 358-65.

**Crain SM y Shen KF (1990).** Opioids can evoke direct receptor-mediated excitatory effects on sensory neurons. *Trends Pharmacol Sci* 11 (2): 77-81.

**Creange A, Lefaucheur JP, Authier FJ y Gherardi RK (1998).** Cytokines and peripheral neuropathies. *Rev Neurol* 154 (3): 208-16.

- Cruciani RA, Dvorkin B, Morris SA, Crain SM y Makman MH (1993).** Direct coupling of opioid receptors to both stimulatory and inhibitory guanine nucleotide-binding proteins in F-11 neuroblastoma-sensory neuron hybrid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3019-23.
- Cvejic S y Devi LA (1997).** Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem* 272 (43): 26959-64.
- Damas J y Remacle-Volon G (1992).** Influence of a long-acting bradykinin antagonist, Hoe 140, on some acute inflammatory reactions in the rat. *Eur J Pharmacol* 211: 81-6.
- Deguchi M, Niwa M, Shigematsu K, Fujii T, Namba K y Ozaki M (1989).** Specific [<sup>125</sup>I] Bolton-Hunter substance P binding sites in human and rat skin. *Neurosci Lett* 99 (3): 287-292.
- Dejana E y del Maschio A (1995).** Molecular organization and functional regulation of cell to cell junctions in the endothelium. *Thrombosis and Haemostasis* 74 (1): 309-12.
- Delle M, Ricksten SE, Haggendal J, Olsson K, Skarphedinsson JO y Thoren P (1990).** Regional changes in sympathetic nerve activity and baroreceptor reflex function and arterial plasma levels of catecholamines, renin and vasopressin during naloxone-precipitated morphine withdrawal in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 253(2): 646-54.
- Devillier P (2001).** Pharmacology of glucocorticoids and ENT pathology. *Presse Med* 30 (39-40 Pt 2): 59-69.
- Devoto P, Flore G, Pira L, Diana M y Gessa L (2002).** Co-release of noradrenaline and dopamine in the prefrontal cortex after acute morphine and during morphine withdrawal. *Psychopharmacology* 160(2): 220-4.
- Di Rosa M, Giroud JP y Willoughby DA (1971).** Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol* 104 (1): 15-29.
- Dimitriadiou V, Rouleau A, Dam Trung Tuong M, Newlands GJ, Miller HR, Luffau G, Schwartz JC y Garbarek M (1994).** Functional relationship between mast cells and C-sensitive nerve fibres evidenced by histamine H<sub>3</sub>-receptor modulation in rat lung and spleen. *Clin Sci (London)* 87 (2): 151-63.
- Donahoe RM, Byrd LD, McClure HM, Brantley M, Wenzel D, Ansari AA y Marsteller F (2001).** Effects of morphine on T-cell recirculation in rhesus monkeys. *Adv Exp Med Biol* 493: 89-101.
- Donnerer J, Amann R y Lembeck F (1991).** Neurogenic and non-neurogenic inflammation in the rat paw following chemical sympathectomy. *Neuroscience* 45(3): 761-5.
- Dray A y Perkins M (1993).** Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci* 16 (3): 99-104.
- Duggan AW y North RA. (1983).** Electrophysiology of opioids. *Pharmacol Rev* 35 (4): 219-81.
- Dutriez I, Sales N, Fournie-Zaluski MC y Roques BP (1992).** Pre- and post-natal ontogeny of neutral endopeptidase 24-11 ('enkephalinase') studied by in vitro autoradiography in the rat. *Experientia* 48 (3): 290-300.
- Eckes B, Kessler D, Aumailley M y Krieg T (2000).** Interactions of fibroblasts with the extracellular matrix: implications for the understanding of fibrosis. *Springer Semin in Immunopathol* 21 (4): 415-30.

- Elenkov IJ y Chrousos GP (2002).** Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 966: 290-303.
- Evans CJ, Keith DE, Morrison H, Magendzo K y Edwards RH (1992).** Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258 (5090): 1952-5.
- Ezeamuzie CI y Umezurike CC (1989).** Effect of histamine H<sub>2</sub>-receptor antagonists on acute inflammatory of the rat paw oedema. *J Pharm Pharmacol* 41: 261-5.
- Falke NE y Fischer EG (1985).** Cell shape of polymorphonuclear leukocytes is influenced by opioids. *Immunobiology* 169 (5): 532-9.
- Fan SF, Shen KF y Crain SM (1991).** Opioids at low concentration decrease openings of K<sup>+</sup> channels in sensory ganglion neurons. *Brain Res* 558 (1): 166-70.
- Fecho K, Maslonek KA, Dykstra LA y Lysle DT (1996).** Assessment of the involvement of central nervous system and peripheral opioid receptors in the immunomodulatory effects of acute morphine treatment in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 276 (2): 626-36.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB y Rae GA (1984).** Is methylnalorphinium the prototype of an ideal peripheral analgesic? *Eur J Pharmacol* 99 (1): 23-9.
- Ferrell WR y Russell NJ (1986).** Extravasation in the knee induced by antidromic stimulation of articular C fibre afferents of the anaesthetized cat. *J Physiol* 379: 407-16.
- Fields A y Sarne Y (1997).** The stimulatory effect of opioids on cyclic AMP production in SK-N-SH cells is mediated by calcium ions. *Life Sci* 61 (6): 595-602.
- Fischer EG y Falke NE (1987).** Interaction of met-enkephalin with human granulocytes. *Ann N Y Acad Sci* 496: 146-50.
- Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A y Needleman P (1990).** The induction and suppression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 265: 16737-40.
- Fukuda K, Kato S, Morikawa H, Shoda T y Mori K (1996).** Functional coupling of the δ-, μ- and κ-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells. *J Neurochem* 67 (3): 1309-16.
- Funk CD (2001).** Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294 (5548): 1871-5.
- Gaboury JP, Johnston B, Niu XF y Kubes P (1995).** Mechanisms underlying acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion in vivo. *J Immunol* 154(2): 804-13.
- Gaudriault G, Nouel D, Farra CD, Beaudet A y Vincent J-P (1997).** Receptor-induced internalization of selective peptidic μ and δ opioid ligands. *J Biol Chem* 272 (5): 2880-8.
- Gavalas A, Victoratos P, Yiayou M, Hadjipetrou-Kourounakis L, Rekka E y Kourounakis P. (1994).** The anti-inflammatory effect of opioids. *Int J Neurosci* 74(1-4): 259-64.

- George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G y O'Dowd BF (2000).** Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem* 275(34): 26128-35.
- Geppetti P (1993).** Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. *Regul Pept* 47 (1): 1-23.
- Gillan MG y Kosterlitz HW (1982).** Spectrum of the mu, delta- and kappa-binding sites in homogenates of rat brain. *Br J Pharmacol* 77 (3): 461-9.
- Gilligan JP, Lovato SJ, Erion MD y Jeng AY (1994).** Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. *Inflammation* 18:285-92.
- Glusa E y Roos A (1996).** Endothelial 5-HT receptors mediate relaxation of porcine pulmonary arteries in response to ergotamine and dihydroergotamine. *Br J Pharmacol* 119 (22): 330-4.
- Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M y Hood L (1979).** Dynorphin (1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 (12): 6666-9.
- Goodwin DC, Landino LM y Marnett LJ (1999).** Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB J* 13: 1121-36.
- Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V y Devi LA (2000).** Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: a role in opiate synergy. *J Neurosci* 20 (22): RC 110
- Gonzales R, Sherbourne CD, Goldyne ME y Levine JD (1991).** Noradrenaline-induced prostaglandin production by sympathetic postganglionic neurons is mediated by alpha 2-adrenergic receptors. *J Neurochem* 57(4):1145-50.
- Gordon JR, Burd PR y Galli SJ (1990).** Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol Today* 11 (12): 458-64.
- Grady EF, Yoshimi SK, Maa J, Valeroso D, Vartanian RK, Rahim S, Kim EH, Gerard C, Gerard N, Bunnett NW, Kirkwood KS (2000).** Substance P mediates inflammatory oedema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice. *British Journal of Pharmacology* 130 (3): 505-512.
- Graziano FM, Cook EB y Stahl JL (2000).** Antihistamines and epithelial cells. *Allergy Asthma Proc* 21: 129-33.
- Green PG, Miao FJ, Strausbaugh H, Heller P, Janig W y Levine JD (1998).** Endocrine and vagal controls of sympathetically dependent neurogenic inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 840: 282-8.
- Green PG y Levine JD (1992).**  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid agonists inhibit plasma extravasation induced by bradykinin in the knee joint of the rat. *Neuroscience* 49 (1): 129-33.
- Grubb BD (1998).** Peripheral and central mechanisms of pain. *Br J Anaesthesia* 81 (1): 8-11.
- Gueniau C y Oberlander C (1997).** The kappa opioid agonist niravoline decreases brain edema in the mouse middle cerebral artery occlusion model of stroke. *J Pharmacol Exp Ther* 282:1-6.

**Gustafsson H, Afrah AW y Stiller CO (2001).** Morphine-induces in vivo release of spinal cholecystokinin is mediated by delta-opioid receptors: effect of peripheral axotomy. *J Neurochem* 78 (1): 55-63.

**Gyires K, Budavari I, Furst S y Molnar I (1985).** Morphine inhibits the carrageenan-induced oedema and the chemoluminescence of leucocytes stimulated by zymosan. *J Pharm Pharmacol* 37 (2): 100-4.

**Häbler HJ, Wasner G y Jänig W (1997).** Interaction of sympathetic vasoconstriction and antidromic vasodilatation in the control of skin blood flow. *Exp Brain Res* 113: 402-10.

**Hackler L, Zadina JE, GE LJ, Kastin AJ (1997).** Isolation of relatively large amounts of endorphin-1 and endomorphin-2 from human brain cortex. *Peptides* 18 (10): 1635-9.

**Harrison C, Smart D y Lambert DG (1998).** Stimulatory effects of opioids. *Br J Anaesthesia* 81 (1): 20-8.

**Härtel C, Fricke L, Schumacher N, Kirchner H y Müller-Steinhardt M (2002).** Delayed Cytokine mRNA Expression Kinetics after T-Lymphocyte Costimulation: A Quantitative Measure of the Efficacy of Cyclosporin A-based Immunosuppression. *Clinical Chemistry* 48: 2225-31.

**Hasbi A, Allouche S, Sichel F, Stanasila L, Massotte D, Landemore G, Polastron J y Jauzac P (2000).** Internalization and Recycling of  $\delta$ -Opioid Receptor Are Dependent on a Phosphorylation-Dephosphorylation Mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 237-47.

**Hassan AHS, Ableitner A, Stein C y Herz A (1993).** Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience* 55 (1): 185-95.

**Hassan AHS, Przewlocki R, Herz A y Stein C (1992).** Dynorphin, a preferential ligand for kappa-opioid receptors, is present in nerve fibers and immune cells within inflamed tissue of the rat. *Neurosci Lett* 140 (1): 85-8.

**He P, Zeng y Curry FE (1997).** Effect of nitric oxide synthase inhibitors on basal microvessel permeability and endothelial cell  $[Ca^{2+}]_i$ . *Am J Physiol* 273 (2 Pt 2): H747-55.

**Heijnen CJ, Kavelaars A y Ballieux RE (1991).** Beta-endorphin: cytokine and neuropeptide. *Immunol Rev* 119: 41-63.

**Helyes Z, Nemeth J, Pinter E y Szolcsanyi (1997).** Inhibition by nociceptin of neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals. *Br J Pharmacol* 121 (4): 613-5.

**Henry DJ, Grandy DK, Lester HA, Davidson N y Chavkin C (1995).**  $\kappa$ -opioid receptors couple to inwardly rectifying potassium channels when coexpressed by Xenopus oocytes. *Mol Pharmacol* 47 (3): 551-57.

**Herz A (1998).** Opioid reward mechanisms: a key role in drug abuse?. *Can J Physiol Pharmacol* 76 (3): 252-8.

**Herz A (1995).** Role of immune processes in peripheral opioid analgesia. *Adv Exp Med Biol* 373: 193-9.

- Hescheler J, Rosenthal W, Trautwein W y Schultz G (1987).** The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels. *Nature* 325(6103):445-7.
- Hinz B y Brune K (2002).** Cyclooxygenase 2: 10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 300 (2): 367-75.
- Hiranuma T, Kitamura K, Taniguchi T, Kanai M, Arai Y, Iwao K y Oka T (1998).** Protection against dynorphin-(1-8) hydrolysis in membrane preparations by the combination of amastatin, captopril and phosphoramidon. *J Pharmacol Exp Ther* 286 (2): 863-9.
- Hofbauer R, Moser D, Salfinger H, Frass M y Kapiotis S (1998).** Sufentanil inhibits migration of human leukocytes through human endothelial cell monolayers. *Anesth Analg* 87 (5): 1181-5.
- Holliday MA (1999).** Extracaeillular fluid and its proteins: dehydration, shock, and recovery. *Pediatr Nephrol* 13: 989-95.
- Holzer P (1998).** Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen Pharmacol* 30 (1): 5-11.
- Homayoun H, Khavandgar S, Namiranian K, Gaskari SA y Dehpour (2002).** The role of nitric oxide in anticonvulsant and proconvulsant effects of morphine in mice. *Epilepsy Res* 48(1-2): 33-41.
- Hong Y y Abbott FV (1995).** Peripheral opioid modulation of pain and inflammation in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 277(1): 21-8.
- Hornyak ME, Naver HK, Rydenhag B y Wallin BG (1990).** Sympathetic activity influences the vascular axon reflex in the skin. *Acta Physiol Scand* 139: 77-84.
- Hough LB, Nalwalk JW, Chen Y, Schuller A, Zhu Y, Zhang J, Menge WM, Leurs R, Timmerman H, Pintar JE (2000).** Imrogran, a cimetidine analog, induces morphine-like antinociception in opioid receptor-knockout mice. *Brain Res* 880(1-2): 102-8.
- Hough LB, Nalwalk JW, Barnes WG, Leurs R, Menge WMPB, Timmerman H y Wentland M (2000).** A third life for burimamide: discovery and characterization of a novel class of non-opioid analgesics derived from histamine antagonists. *Annals NY Acad Sciences* 909: 25-40.
- Hough LB y Nalwalk JW (1992).** Inhibition of morphine antinociception by centrally administered histamine H<sub>2</sub> receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 215 (1): 69-74.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA y Morris HR (1975).** Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258 (5536): 577-9.
- Ichinose M, Belvisi MG y Barnes PJ (1990).** Histamine H<sub>3</sub>-receptors inhibit neurogenic microvascular leakage in airways. *J Appl Physiol* 68 (1): 21-5.
- Inoue M, Kobayashi M, Kozaki S, Zimmer A y Ueda H (1998).** Nociceptin/orphanin FQ-induced nociceptive responses through substance P release from peripheral nerve endings in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (18): 10949-53.
- James IF y Goldstein A (1984).** Site-directed alkylation of multiple opioid receptors. I. Binding selectivity. *Mol Pharmacol* 25 (3): 337-42.

**Jancsó N, Gabor A y Szolcsányi J (1967).** Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol* 31: 138.

**Jänig W y Lisney SJ (1989).** Small diameter myelinated afferents produce vasodilatation but not plasma extravasation in rat skin. *J Physiol* 415: 477-86.

**Jänig W, Levine JD y Michaelis M (1996).** Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *Prog Brain Res* 113: 161-84.

**Jeanjean AP, Moussaoui SM, Maloteaux J-M y Laduron PM. (1995).** Interleukin-1 $\beta$  induces long-term increase of axonally transported opiate receptors and substance P. *Neuroscience* 68 (1): 151-7.

**Ji RR, Zhang Q, Law PY, Low HH, Elde R y Hokfelt T (1995).** Expression of  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J Neurosci* 15 (12): 8156-66.

**Jiang Q, Takemori AE, Sultana M, Portoghesi PS, Bowen WD, Mosberg HI y Porreca F (1991).** Differential antagonism of opioid delta antinociception by [D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Cys<sup>6</sup>] enkephalin and naltrindole 5'-isothiocyanate: evidence for delta receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 257 (3): 1069-77.

**Jin W, Lee NM, Loh HH y Thayer SA (1994).** Opioids mobilize calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores in NG108-15 cells. *J. Neurosci.* 14 (4): 1920-9.

**Johnson PS, Wang JB, Wang WF y Uhl GR (1994).** Expressed mu opiate receptor couples to adenylate cyclase and phosphatidyl inositol turnover. *NeuroReport* 5 (4): 507-9.

**Jordan B y Devi LA (1998).** Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. *Br J Anaesth* 81 (1): 12-9.

**Joris J, Costello A, Dubner R y Hargreaves KM (1990).** Opiates suppress carrageenan-induced edema and hyperthermia at doses that inhibit hyperalgesia. *Pain* 43 (1): 95-103.

**Junger H y Sorkin LS (2000).** Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNF alpha. *Pain* 85 (1-2): 145-51.

**Kangra I y Randic M (1991).** Outflow of endogenous aspartate and glutamate from the rat spinal dorsal horn in vitro by activation of low- and high-threshold primary afferent fibers. Modulation by mu-opioids. *Brain Res* 553 (2): 347-52.

**Kanjhan R (1995).** Opioids and pain. *Clin Exp Pharm Physiol* 22 (6-7): 397-403.

**Karasawa F, Iwanov V y Moulds RF (1993).** Sufentanil and alfentanil cause vasorelaxation by mechanisms independent of the endothelium. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 20 (11): 705-11.

**Karasawa F, Iwanov V y Moulds RF (1993).** Effects of fentanyl on the rat aorta are mediated by alpha-adrenoceptors rather than by the endothelium. *Br J Anesth* 71 (6): 877-80.

**Kathmann M, Schlicker E, Marr I, Werthwein S, Stark H y Schunack W (1998).** Ciproxifan and chemically related compounds are highly potent and selective histamine H<sub>3</sub>-receptor antagonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 358: 623-7.

- Keith DE, Anton B, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin DV, Moiteillet-Agius G, Stewart PL, Evans CJ y von Zastrow M (1998).**  $\mu$ -opioid receptor internalization: opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism *in vitro* and in the mammalian brain. *Mol Pharm* 53 (3): 377-84.
- Keith DE, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin DV, Kang L, Evans CJ y von Zastrow M (1996).** Morphine activates opioid receptors without causing their internalization. *J Biol Chem* 271: 19021-4.
- Khachaturian H, Lewis ME y Watson SJ (1983).** Colocalization of proenkephalin peptides in rat brain neurons. *Brain Res* 279 (1-2): 369-73.
- Khalil Z y Helme RD (1990).** Serotonin modulates substance P-induced plasma extravasation and vasodilation in rat skin by an action through capsaicin-sensitive primary afferent nerves. *Brain Res* 527 (2): 292-8.
- Khalil Z y Helme RD (1990).** Modulation of peripheral inflammatory response to substance P by locally administered opioid receptor agonists. *Neuropeptides* 17 (1): 45-53.
- Kieffer B (1997).** Molecular aspect of opioid. In: Dickenson AH., Besson JM (Eds) *The Pharmacology of Pain, Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 130. Berlin: Springer-Verlag, pp 281-304.
- Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C y Hirth CG (1992).** The  $\delta$ -opioid receptor: Isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 12048-52.
- Kirschfink M (1997).** Controlling the complement system in inflammation. *Immunopharmacology* 38 (1-2): 51-62.
- Kolesnikov YA, Jain S, Wilson R y Pasternak GW (1996).** Peripheral morphine analgesia: synergy with central sites and a target of morphine tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 279 (2): 502-6.
- Koltzenburg MK, Krees M y Reeh PW (1992).** The nociceptor sensitization by bradykinin does not depend on sympathetic neurons. *Neuroscience* 46 (2): 465-73.
- Kowalski ML, Sliwinska-Kowalska M y Kaliner MA (1990).** Neurogenic inflammation, vascular permeability, and mast cells. II. Additional evidence indicating that mast cells are not involved in neurogenic inflammation. *J Immunol* 145(4): 1214-21.
- Kromer W (1990).** Endogenous opioids, the enteric nervous system and gut motility. *Dig Dis* 8(6): 361-73.
- LaMotte C, Pert CB y Synder SH (1976).** Opiate receptor binding in primate spinal cord: distribution and changes after dorsal root section. *Brain Res* 112: 407-12.
- Lang ME, Jourd'Heuil D, Meddings JB y Swain MG (1995).** Increased opioid binding to peripheral white blood cells in a rat model of acute cholestasis. *Gastroenterology* 108 (5): 1479-86.
- Law PY, Wong YH y Loh HH (2000).** Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40 (1): 389-430.

**Lawrence T, Willoughby DA y Gilroy DW (2002).** Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2 (10): 787-95.

**Lecci A, Giuliani S, Tramontana M, Carini F, Maggi CA (2000).** Peripheral actions of tachykinins. *Neuropeptides* 34 (5): 303-13.

**Lee A, Coderre TJ, Basbaum AI y Levine JD (1991).** Sympathetic neuron factors involved in bradykinin-induced plasma extravasation in the rat. *Brain Res* 557 (1-2): 146-8.

**Le Filliatre G, Sayah S, Latournerie V, Renaud JF, Finet M y Hanf R (2001).** Cyclo-oxygenase and lipoxygenase pathways in mast cell dependent-neurogenic inflammation induced by electrical stimulation of the rat saphenous nerve. *Br J Pharmacol* 132 (7): 1581-9.

**Lei YH y Rogers DF (1999).** Effects and interactions of opioids on plasma exudation induced by cigarette smoke in guinea pig bronchi. *Lung Cell Mol Physiol* 276 (3): L391-7.

**Lembeck F y Donnerer (1985).** Opioid control of the function of primary afferent substance P fibres. *Eur J Pharmacol* 114: 241-6.

**Lence P (1962).** *Arch Int Pharmacodyn* 136: 237-41.

**Levine J y Taiwo Y (1994).** Inflammatory pain. In: Wall PD, Melzack R (eds). *Textbook of pain*, 3<sup>rd</sup> edn. Churchill Livingstone, Edinburgh, p 45.

**Levine JD, Dardick SJ, Roizen MF, Helms C y Basbaum AI (1986).** Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. *J Neurosci* 6: 3423-9.

**Levine JD, Taiwo YO, Collins SD y Tam JK (1986).** Noradrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic postganglionic neurone terminals rather than activation of primary afferent nociceptors. *Nature* 323: 158-60.

**Li JL, Kaneko T y Mizuno N (1996).** Effects of peripheral nerve ligation on expression of mu-opioid receptor in sensory ganglion neurons: an immunohistochemical study in dorsal root and nodose ganglion neurons of the rat. *Neurosci Lett* 214(2-3):91-4.

**Li C, Peoples RW y Weight FF (1996).** Acid pH augments excitatory action of ATP on a dissociated mammalian sensory neuron. *Neuroreport* 7 (13): 2151-4.

**Li CH y Chung D (1976).** Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 73 (4): 1145-8.

**Li LY y Chang KJ (1996).** The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express  $\mu$ -opioid receptors. *Mol Pharmacol* 50 (3): 599-602.

**Li S, Zhu J, Chen C, Chen YW, Deriel JK, Ashby B y Liu-Chen LY (1993).** Molecular cloning and expression of a rat  $\kappa$  opioid receptor. *Biochem J* 295 (Pt 3): 629-33.

**Liang-Suo J, Gómez-Flores R y Weber R (2002).** Immunosuppression induced by central action of morphine is not blocked by mifepristone (RU 486). *Life Sci* 71 (22): 2595.

**Lippe IT, Stabentheiner A y Holzer P (1993).** Participation of nitric oxide in the mustard oil-induced neurogenic inflammation of the rat paw skin. *Eur J Pharmacol* 232 (1): 113-20.

- Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A, Jackson MR, Erlander MG (1999).** Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol Pharmacol* 55 (6): 1101-7.
- Luza J (1992).** Effect of morphine on phagocytic activity of the polymorphonuclears and monocytes. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med* 134: 47-50.
- Lynn B (1990).** Capsaicin: actions on nociceptive C-fibres and therapeutic potential. *Pain* 41: 61-9.
- Maggi CA (1995).** The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol* 26 (5): 911-44.
- Maissonneuve IM, Warner LM y Glick SD (2001).** Biphasic dose-related effects of morphine on dopamine release. *Drug Alcohol Depend* 65 (1): 55-63.
- Majno G y Palade G (1961).** Studies on inflammation I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol* 11: 571-605.
- Makman MH, Dobrenis K y Surratt CK (1998).** Properties of mu 3 opiate alkaloid receptors in macrophages, astrocytes and HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Adv Exp Med Biol* 437: 137-48.
- Mansour A, Burke S, Pavlic RJ, Akil H y Watson SJ (1996).** Immunohistochemical localization of the cloned kappa 1 receptor in the rat CNS and pituitary. *Neuroscience* 71: 671-90.
- Mansour A, Fox CA, Akil H y Watson SJ (1995).** Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* 18: 22-9.
- Mansour A, Thompson RC, Akil H y Watson SJ (1993).** Delta opioid receptor mRNA distribution in the brain: comparison to delta receptor binding and proenkephalin mRNA. *J Chem Neuroanat* 6: 351-62.
- Marino MW, Dunn A, Grail D, Ingles M, Noguchi Y, Richards E, Jungbluth A, Wada H, Moore M, Williamson B, Basu S y Old LJ (1997).** Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (15): 8093-8.
- Marone G, Granata F, Spadaro G, Onorati AM y Triggiani M (1999).** Antiinflammatory effects of oxatomide. *J Investig Allergol Clin Immunol* 9: 207-14.
- Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE y Gilbert PE (1976).** The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 197: 517-32.
- Matucci-Cerinic M y Partsch G (1992).** The contribution of the peripheral nervous system and the neuropeptide network to the development of synovial inflammation. *Clin Exp Rheumatol* 10 (3): 211-5.
- McCarson KE y Krause JE (1994).** NK-1 and NK-3 type tachykinin receptor mRNA expression in the rat spinal cord dorsal horn is increased during adjuvant or formalin-induced nociception. *J Neurosci* 14(2): 712-20.

**McDonald DM, Thurston G y Baluk P (1999).** Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. *Microcirculation* 6: 7-22.

**McLachlan EM y Hu P (1998).** Axonal sprouts containing calcitonin gene-related peptide and substance P form pericellular baskets around large diameter neurons after sciatic nerve transection in the rat. *Neuroscience* 84(4): 961-5.

**McMahon B, Mitchell S, Brady HR, Godson C (2001).** Lipoxins: revelations on resolution. *Trends Pharmacol Sci* 22 (8): 391-5.

**Meng F, Xie GX, Thompson RC, Mansour A, Goldstein A, Watso SJ y Akil H (1993).** Cloning and pharmacological characterization of a rat  $\kappa$ -opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9954-8.

**Messersmith DJ, Kim DJ e Iadarola MJ (1998).** Transcription factor regulation of prodynorphin gene expression following rat hindpaw inflammation. *Brain Res Mol Brain Res* 53 (1-2): 260-9.

**Mestek A, Hurley JH, Bye LS, Campbell AD, Chen Y, Tian M, Liu J, Schulman H y Yu L (1995).** The human mu opioid receptor: modulation of functional desensitization by calcium/calmodulin-dependent protein kinase and protein kinase C. *J Neurosci Mar;15(3 Pt 2)*: 2396-406.

**Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B et al. (1995).** Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1. *Nature* 377 (6549): 532-5.

**Meyer DJ Jr y Huxley VH (1992).** Capillary hydraulic conductivity is elevated by cGMP-dependent vasodilators. *Circ Res* 70 (2): 382-91.

**Miao FJ, Jänig W y Levine J (1996).** Role of sympathetic postganglionic neurons in synovial plasma extravasation induced by bradykinin. *J Neurophysiol* 75 (2): 715-24.

**Miller FN y Sims DE (1986).** Contractile elements in the regulation of macromolecular permeability. *Fed Proc* 45 (2): 84-8.

**Minami M, Nakagawa T, Seki T, Onogi T, Aoki Y, Katao Y, Katsumata S y Satoh M. (1996).** A single residue, Lys108, of the delta-opioid receptor prevents the mu-opioid-selective ligand [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>,Gly-ol<sup>5</sup>]enkephalin from binding to the delta-opioid receptor. *Mol Pharmacol* 50 (5): 1413-22.

**Mitchell D y Tym K (1996).** Nitric oxide release in rat skeletal muscle capillary. *Am J Physiol* 270 (5 Pt 2): H1696-703.

**Mitchell S, Thomas G, Harvey K, Cottell D, Reville K, Berlasconi G, Petasi NA, Erwing L, Rees AJ, Savill J, Brady HR y Godson C (2002).** Lipoxins, aspirin-triggered epi-lipoxins, lipoxin stable analogues, and the resolution of inflammation: stimulation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils in vivo. *J Am Soc Nephrol* 13 (10): 2497-507.

**Moises HC, Rusin KI y Macdonald RL (1994).** Mu-opioid receptor-mediated reduction of neuronal calcium current occurs via a G<sub>(0)</sub>-type GTP-binding protein. *J Neurosci* 14: 3842-51.

**Moss J (1995).** Muscle relaxants and histamine release. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 106: 7-12.

- Mousli M, Bueb JL, Rouot B, Landry Y, y Bronner C (1991).** G-proteins as targets for non-immunological histamine releasers. *Agents Actions* 33(1-2): 81-3.
- Mousli M, Bronner C, Landry Y, Bockaert J y Rouot B (1990).** Direct activation of GTP-binding regulatory proteins (G-proteins) by substance P and compound 48/80. *FEBS Lett* 259(2): 260-2.
- Moyer CF, Dennis PA, Majno G y Joris I (1988).** Venular endothelium in vitro: isolation and characterization. *In Vitro Cell Dev Biol* 24 (4): 359-68.
- Nakagami T, Toyomura K, Kinoshita T y Morisawa SA (1993).** A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. *Biochim Biophys Acta* 1158 (2): 189-93.
- Nakamura M y Ferreira SH (1987).** A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 135 (2): 145-53.
- Nantel F, Denis D, Gordon R, Northey A, Cirino M, Metters KM y Chan CC (1999).** Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br J Pharmacol* 128: 853-9.
- Narita M, Narita M, Mizoguchi H y Tseng LF (1995).** Inhibition of protein kinase C, but not of protein kinase A, blocks the development of acute antinociceptive tolerance to an intrathecally administered mu-opioid receptor agonist in the mouse. *Eur J Pharmacol* 280(2):R1-3.
- Navarro X, Verdu E, Wendelschafer-Crabb G y Kennedy WR (1995).** Innervation of cutaneous structures in the mouse hind paw: a confocal microscopy immunohistochemical study. *J Neurosci Res* 41(1): 111-20.
- Neer EJ y Smith TF (1996).** G protein heterodimers: new structures propel new questions. *Cell* 84: 175-8.
- Neer y Clapham (1988).** Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature* 333(6169):129-34.
- Noble F, Derrien M y Roques BP (1993).** Modulation of opioid analgesia by CCK at the supraspinal level: evidence of regulatory mechanisms between CCK and enkephalin systems in the control of pain. *Br J Pharmacol* 109 (4):1064-70.
- Noguchi K y Ruda MA (1992).** Gene regulation in an ascending nociceptive pathway: inflammation-induced increase in preprotachykinin mRNA in rat lamina I spinal projection neurons. *J Neurosci* 12 (7): 2563-72.
- North RA, Williams JT, Surprenant A, Christie MJ. (1987).** Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84 (15): 5487-91.
- Ohkubo T, Shibata M, Inoue M, Kaya H y Takahashi H (1995).** Regulation of substance P release mediated via prejunctional histamine H<sub>3</sub> receptors. *Eur J Pharmacol* 273 (1-2): 83-8.
- O'Flynn NM, Helme RD, Watkins DJ y Burcher E (1989).** Autoradiographic localization of substance P binding sites in rat footpan skin. *Neurosci Lett* 106 (1-2): 43-8.
- Olgart L (1996).** Neural control of pulpal blood flow. *Crit Rev Oral Biol Med* 7(2): 159-71.

**Olianás MC y Onali P (1999).** Mediation by G protein  $\beta\gamma$  subunits of the opioid stimulation of adenylyl cyclase activity in rat olfactory bulb. *Biochem Pharmacol* 57: 649-52.

**Oliver JM, Kepley CL, Ortega E, Wilson BS (2000).** Immunologically mediated signaling in basophils and mast cells: finding therapeutic targets for allergic diseases in the human Fc $\epsilon$ RI signaling pathway. *Immunopharmacology* 48 (3): 269-81.

**Olsson Y (1990).** Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions. *Crit Rev Neurobiol* 5 (3): 265-311.

**Ossipov MH, Kovelowski CJ y Porreca F (1995).** The increase in morphine antinociceptive potency produced by carrageenan-induced hindpaw inflammation is blocked by naltrindole, a selective delta-opioid antagonist. *Neurosci Lett* 184:173-6.

**Ossipov MH, Harris S, Lloyd P y Messineo E (1990).** An isobolographic analysis of the antinociceptive effect of systemically and intrathecally administered combinations of clonidine and opiates. *J Pharmacol Exp Ther* 255 (3): 1107-16.

**Otero MJ, Iglesias T y Fuentes JA (1993).** Hypoalgesic action of bestatin analogues that inhibit central aminopeptidases, but not neutral endopeptidase. *Neuropeptides* 25 (3): 175-82.

**Palacios JM, Waeber C, Hoyer D, Mengod G (1990).** Distribution of serotonin receptors. *Ann NY Acad Sci* 600: 36-52.

**Pan Y (2002).** Identification and characterization of a novel promoter of the mouse mu opioid receptor gene (*Oprm*) that generates eight splice variants. *Gene* 295 (1): 97-108.

**Pan ZZ (1998).**  $\mu$ -opposing actions of the  $\kappa$ -opioid receptor. *TiPS* 19: 94-8.

**Panerai AE y Sacerdote P (1997).**  $\beta$ -Endorphin in the immune system: a role at last? *Immunol Today* 18 (7): 317-9.

**Pasternak GW (2001).** Insights into mu opioid pharmacology the role of mu opioid receptor subtypes. *Life Sci* 68 (19-20): 2213-9.

**Pedersen-Bjergaard U, Nielsen LB, Jensen K, Edvinsson L, Jansen I, Olesen J (1991).** Calcitonin gene-related peptide, neuropeptide A and substance P: effects on nociception and neurogenic inflammation in human skin and temporal muscle. *Peptides* 12 (2): 333-7.

**Pego-Reigosa R, Covñas R, Tramu G y Pesini P (2000).** Distribution of met-enkephalin immunoreactivity in the diencephalon and the brainstem of the dog. *J Chem Neuroanat* 19 (4): 243-58.

**Peluso J, LaForge KS y Matthes HW (1998).** Distribution of nociceptin/orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells. *J Neuroimmunol* 81: 184-92.

**Pert CB y Snyder SH (1973).** Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179:1011-4.

**Petho G, Derow A, Reeh PW (2001).** Bradykinin-induced nociceptor sensitization to heat is mediated by cyclooxygenase products in isolated rat skin. *Eur J Neurosci* 14 (12): 210-8.

- Pierce PA, Xie GX, Peroutka SJ, Green PG y Levine JD (1995).** 5-hydroxytryptamine-induced synovial plasma extravasation is mediated via 5-hydroxytryptamine 2 $\alpha$  receptors on sympathetic efferent terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 275 (1): 502-8.
- Piper PJ (1984).** The evolution and future horizons of research on the metabolism of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *J Allergy Clin Immunol* 74 (3 Pt 2): 441-4.
- Piros ET, Prather PL, Law PY, Evans CJ y Hales TG (1996).** Voltage-dependent inhibition of Ca<sup>2+</sup> channels in GH3 cells by cloned mu- and delta-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 50 (4): 947-56.
- Pitzalis C, Pipitone N y Perretti M (2002).** Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci.* 966:108-18.
- Planas ME, Rodriguez L, Sanchez S, Pol O y Puig MM (1995).** Pharmacological evidence for the involvement of the endogenous opioid system in the response to local inflammation in the rat paw. *Pain* 60: 67-71.
- Pol O, Planas E y Puig MM (1996).** Effects of morphine and liposomal morphine in a model of intestinal inflammation in mice. *Pharmacology* 53 (3):180-9.
- Pol O, Ferrer I, Puig MM (1994).** Diarrhea associated with intestinal inflammation increases the potency of mu and delta opioids on the inhibition of gastrointestinal transit in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 270 (1): 386-91.
- Polakiewicz RD, Schieferl SM, Gingras AC, Sonenberg N y Comb MJ (1998).** mu-Opioid receptor activates signaling pathways implicated in cell survival and translational control. *J Biol Chem* 273: 23534-41.
- Pommier B, Beslot F, Simon A, Pophillat M, Matsui T, Dauge V, Roques BP y Noble F (2002).** Deletion of CCK2 receptor in mice results in an upregulation of the endogenous opioid system. *J Neurosci* 22 (5): 2005-11.
- Prather PL, McGinn TM, Claude PA, Liu-Chen LY, Loh HH y Law PY (1995).** Properties of a kappa-opioid receptor expressed in CHO cells: interaction with multiple G-proteins is not specific for any individual G alpha subunit and is similar to that of other opioid receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 29:336-46.
- Prather PL, McGinn TM, Erickson LJ, Evans CJ, Loh HH y Law PY (1994).** Ability of delta-opioid receptors to interact with multiple G-proteins is independent of receptor density. *J Biol Chem* 269: 21293-302.
- Przewlocki R, Hassan AH, Lason W, Epplen C, Herz A y Stein C (1992).** Gene expression and localization of opioid peptides in immune cells of inflamed tissue: Functional role in antinociception. *Neuroscience* 48 (2): 491-500.
- Przewlocki R, Gramsch C, Pasi A y Herz A (1983).** Characterization and localization of immunoreactive dynorphin,  $\alpha$ -neoendorphin, Met-enkephalin and substance P in human spinal cord. *Brain Res* 280 (1): 95-103.
- Quartara L y Maggi CA (1998).** The tachykinin NK1 receptor. Part II: Distribution and pathophysiological roles. *Neuropeptides* 32: 1-49.

**Stocker R, Y. Yamamoto, A.F. McDonagh, A.N Glazer y B.N. Ames (1987).** Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235: 1043-6.

**Randall LO y Selitto GL (1957).** A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn* 111: 409-19.

**Reinscheid RK, Nothacker H-P y Bourson A (1995).** Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 270: 792-4.

**Riba P, Ben Y, Smith AP, Furst S y Lee NM (2002).** Morphine tolerance in spinal cord is due to interaction between mu and delta receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 265-72.

**Rojavin M, Szabo I, Bussiere JL, Rogers TJ, Adler MW y Eisenstein TK (1993).** Morphine treatment in vitro or in vivo decreases phagocytic functions of murine macrophages. *Life Sciences* 53 (12): 997-1006.

**Roques BP, Noble F, Dauge V, Fournie-Zaluski MC y Beaumont A (1993).** Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 45 (1): 88-146.

**Rosei MA, Mosca L, Coccia R, Blarzino C, Musci G y De Marco C (1994).** Some biochemical properties of melanins from opioid peptides. *Biochim Biophys Acta* 1199 (2): 123-9.

**Rouleau A, Stark H, Schunack W y Schwartz JC (2000).** Anti-inflammatory and antinociceptive properties of BP 2-94, a histamine H<sub>3</sub> receptor agonist prodrug. *Pharmacology* 295 (1): 219-25.

**Rouleau A, Garbarg M, Ligneau X, Mantion C, Lavie P, Advenier C, Lecomte JM, Krause M, Stark H, Schunack W y Schwartz JC (1997).** Bioavailability, antinociceptive and antiinflammatory properties of BP 2-94, a histamine H<sub>3</sub> receptor agonist prodrug. *J Pharmacol Exper Ther* 281: 1085-94.

**Sacerdote P, Bianchi M y Panerai AE (1996).** Involvement of beta-endorphin in the modulation of paw inflammatory edema in the rat. *Regul Pept* 63: 79-83.

**Saklatvala J (2002).** Glucocorticoids: do we know how they work? *Arthritis Res* 4 (3):146-50.

**Sala A, Zarini S y Bolla M (1998).** Leukotrienes: lipid bioeffectors of inflammatory reactions. *Biochemistry* 63 (1): 84-92.

**Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT y Currie MG (1996).** Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol* 118: 829-38.

**Sampson AP (2000).** The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy* 30 (1): 22-7.

**Sanderson K, Nyberg F y Khalil Z (1998).** Modulation of peripheral inflammation by locally administered hemorphin-7. *Inflamm Res* 47 (2): 49-55.

**Sarne Y, Fields A, Keren O y Gafni M (1996).** Stimulatory effects of opioids on transmitter release and possible cellular mechanisms: overview and original results. *Neurochem Res* 21 (11): 1353-61.

- Sasano T, Shoji N, Kuriwada-Satoh, Iikubo M, Izumi H y Karita K (2002).** Dependence of pulpal blood-flow responses on baseline blood-flow in the cat. *Arch Oral Biol* 47: 131-7.
- Sato T, Sakurada S, Sakurada T, Kisara K y Suzuki K (1992).** Comparison of opioid properties between D-Arg-containing dipeptides and tetrapeptides. *Biochem Pharmacol* 43 (4): 717-23.
- Schäfer M, Zhou L, Carter L, Wang XB, Uhl GR y Stein C (1997).** Sympathetic postganglionic neurons contain kappa opioid receptor mRNA but do not contribute to peripheral antinociceptive effects of U50,488H. *Soc Neurosci Abstr* 23: 164.
- Schäfer M, Imai Y, Uhl GR y Stein C (1995).** Inflammation enhances peripheral  $\mu$ -opioid receptor-mediated analgesia, but not  $\mu$ -opioid receptor transcription in dorsal root ganglia. *Eur J Pharmacol* 279: 165-9.
- Schäfer MK, Bette M, Romeo H, Schwaebel W y Weihe E (1994).** Localization of kappa-opioid receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat sensory ganglia and spinal cord. *Neurosci Lett* 167: 137-40.
- Schlicker E, Malinowska B, Kathmann M y Göthert M (1994).** Modulation of neurotransmitter release via histamine H<sub>3</sub> heteroreceptors. *Fundam Clin Pharmacol* 8 (2): 128-37.
- Scholzen TE, Kalden DH, Brzoska T, Fastrich M, Schiller M, Bohm Schawrz T, Armstrong CA, Ansel JC y Luger TA (2000).** Expression of proopiomelanocortin peptides in human derm microvascular endothelial cells: evidence for a regulation by ultraviolet light and interleukin-1. *J Invest Dermatol* 115: 1021-8.
- Schuligoi R, Donnerer J y Amann R. (1994).** Bradykinin-induced sensitization of afferent neurons in the rat paw. *Neuroscience* 59: 211-5.
- Schultz JE y Gross GL (2001).** Opioids and cardioprotection. *Pharmacol Ther* 89 (2): 123-37.
- Selley DE, Breivogel CS y Childers SR (1993).** Modification of G protein-coupled functions by low pH pretreatment of membranes from NG108-15 cells: increase in opioid agonist efficacy by decreased inactivation of G proteins. *Mol Pharmacol* 44 (4): 731-41.
- Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP y Yacobi A (1991).** Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Eur J Metabolism Pharmacokinet* 16: 249-55.
- el-Sharkawy TY, al-Shireida MF y Pilcher CW (1991).** Vascular effects of some opioid receptor agonists. *Can J Physiol Pharmacol* 69 (6): 846-51.
- Sharma SK, Klee WA y Nirenberg M (1977).** Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (8): 3365-9.
- Sharp BM, Roy S y Bidlack JM (1998).** Evidence for opioid receptors on cells involved in host defense and the immune system. *J Neuroimmunol* 83: 45-56.
- Shebuski RJ y Kilgore KS (2002).** Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 300 (3): 729-35.
- Shoda T, Fukuda K, Uga H, Mima H y Morikawa H (2001).** Activation of mu-opioid receptor induces expression of c-fos and junB via mitogen-activated protein kinase cascade. *Anesthesiology* 95: 983-9.

- Shook JE, Pelton JT, Hruby VJ y Burks TF (1987).** Peptide opioid antagonist separates peripheral and central opioid antitransit effects. *J Pharmacol Exp Ther* 243(2): 492-500.
- Sibinga NE y Goldstein A (1988).** Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system. *Annu Rev Immunol* 6: 219-49.
- Silvia, RC, Slizgi, GR, Ludens, JH y Tang AH (1987).** Protection from ischemia-induced cerebral edema in the Rat by U-50488H, a kappa opioid receptor agonist. *Brain Res* 403: 52-57.,
- Simon E, Hiller J y Edelman I (1973).** Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic  $^3\text{H}$ -etorphine to rat brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 1947-51.
- Smith GP y Smith RA (2001).** Membrane-targeted complement inhibitors. *Mol Immunol* 38: 249-55.
- Southall MD y Vasko MR (2001).** Prostaglandin receptor subtypes, EP3C and EP4, mediate the prostaglandin  $E_2$ -induced cAMP production and sensitization of sensory Neurons. *J Biol Chem* 276 (19): 16083-91.
- Spencer RJ, Jin W, Thayer SA, Chakrabarti S, Law PY y Loh HH (1997).** Mobilization of  $\text{Ca}^{+2}$  from intracellular stores in transfected neuro2a cells by activation of multiple opioid receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* 54 (7): 809-18.
- Springer TA (1994).** Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301-14.
- Stefano L y Dickenson A (1995).** Spinal opioid systems in inflammation. *Inflamm Res* 44: 231-41.
- Stefano GB (1998).** Autoimmunovascular regulation: morphine and anandamide and anandamide stimulated nitric oxide release. *J Neuroimmunology* 83: 70-6.
- Stefano GB, Hartman A, Bilfinger TV, Magazine HI, Liu Y, Casares F y Goligorsky MS (1995).** Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation. *J Biol Chem* 270 (51): 30290-3.
- Stein C (1995).** The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N Engl J Med* 332 (25): 1685-90.
- Stein C (1993).** Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Anesth Analg* 76 (1): 182-91.
- Stein C, Hassan AH, Przewlocki R, Gramsch C, Peter K y Herz A (1990).** Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5935-9.
- Sternini C, Spann M, Anton B, Keith Jr DE, Bunnett NW, von Zastrow M, Evans C y Brecha NC (1996).** Agonist-selective endocytosis of  $\mu$  opioid receptor by neurons in vivo. *Neurobiology* 93 (17): 9241-6.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN y Ames BN (1987).** Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235 (4792): 1043-6.
- Suárez-Roca H y Maixner W (1995).** Morphine produces a biphasic modulation of substance P release from cultured dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 194 (1-2): 41-4.

- Suárez-Roca H y Maixner W (1993).** Activation of kappa opioid receptors by U-50488H and morphine enhances the release of substance P from rat trigeminal nucleus slices. *J Pharmacol Exp Ther* 264 (2): 648-53.
- Suárez-Roca H y Maixner W (1992).** Morphine produces a multiphasic effect on the release of substance P from rat trigeminal nucleus slices by activating different opioid receptor subtypes. *Brain Res* 579 (2): 195-203.
- Sullivan AF, Kalso EA, McQuay HJ y Dickenson AH (1992).** Evidence for the involvement of the mu but not delta opioid receptor subtype in the synergistic interaction between opioid and alpha 2 adrenergic antinociception in the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 139 (1): 65-8.
- Suprenant A, Shen KZ, North RA y Tatsumi H (1990).** Inhibition of calcium currents by noradrenaline, somatostatin and opioids in guinea-pig submucosal neurones. *J Physiol* 431: 585-608.
- Szolcsányi J (1987).** Selective responsiveness of polymodal nociceptors of the rabbit ear to capsaicin, bradykinin and ultra-violet irradiation. *J Physiol* 388: 9-23.
- Taiwo YO y Levine JD. (1991).** Kappa- and delta-opioids block sympathetically dependent hyperalgesia. *J Neurosci* 11 (4): 928-32.
- Tallent M, Dichter MA, Bell GI y Reisine T (1994).** The cloned kappa opioid receptor couples to an N-type calcium current in undifferentiated PC-12 cells. *Neuroscience* 63 (4): 1033-40.
- Taylor BK, Peterson MA, Roderick RE, Tate J, Green PG, Levine JO y Basbaum AI (2000).** Opioid inhibition of formalin-induced changes in plasma extravasation and local blood flow in rats. *Pain* 84 (2-3): 263-70.
- Terenius L (1973).** Characteristics of the receptor for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol* 33 (5): 377-84.
- Teschemacher H, Koch G y Brantl V (1997).** Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers* 43 (2): 99-117.
- Thomas PT, Bhargava HN y House RV (1995).** Immunomodulatory effects of in vitro exposure to morphine and its metabolites. *Pharmacology* 50 (1): 51-62.
- Thurston G, Baluk P y McDonald DM (2000).** Determinants of endothelial cell phenotype in venules. *Microcirculation* 7: 67-80.
- Udaka K, Takeuchi Y y Movat HZ (1970).** Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability. *Proc Soc Exp Biol Med* 133: 1384-1387.
- Uhl GR, Childers S y Pasternak G (1994).** An opiate receptor gene family reunion. *Trends Neurosci* 17 (3): 89-93.
- Vane JR (1971).** Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231 (25): 232-5.
- Vasko MR, Campbell WB y Waite KJ (1994).** Prostaglandin E2 enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J Neurosci* 14: 4987-97.

**Vaughan CW y Christie MJ (1996).** Increase by the ORL1 receptor (opioid receptor-like 1) ligand, nociceptin, of inwardly rectifying K conductance in dorsal raphe nucleus neurones. *Br J Pharmacol* 117: 1609-11.

**Vinegar R, Truax JF y Selph JL (1976).** Quantitative studies of the pathway to acute carrageenan inflammation. *Federation Proceedings* 35: 2447-54.

**Walker JS, Scott C, Bush KA y Kirkham BW (2000).** Effects of the peripherally selective kappa-opioid asimadoline, on substance P and CGRP mRNA expression in chronic arthritis of the rat. *Neuropeptides* 34(3-4):193-202.

**Walker JS, Wilson J, Binder W, Scott C y Carmody JJ (1997).** The anti-inflammatory effects of opioids: their possible relevance to the pathophysiology and treatment of rheumatoid arthritis. *Res Alerts Rheum Arthritis* 1: 291-9.

**Wallin BG (1990).** Neural control of human skin flow. *J Auton Nerv Syst* 30 Suppl: S185-90.

**Waters SM, Konkoy CS y Davis TP (1996).** Haloperidol and apomorphine differentially affect neuropeptidase activity. *J Pharmacol Exp Ther* 277 (1): 113-20.

**van Wetering S, Mannesse-Lazeroms SP, van Sterkenburg MA y Hiemstra PS (2002).** Neutrophil defensins stimulate the release of cytokines by airway epithelial cells: modulation by dexamethasone. *Inflamm Res* 51 (1): 8-15.

**Wei ET, Thomas HA, Gjerde EA, Reed RK, Burov SV, Korolkov VI, Glynskaya OV, Dorosh MY y Vlasov GP (1998).** Dynorphin A(6-12) analogs suppress thermal edema. *Peptides* 19 (4): 767-75.

**Wei LN y Loh HH (2002).** Regulation of opioid receptor expression. *Curr Opin Pharmacol* 2:69-75.

**Weidner C, Klede M, Rukwied R, Lischetzki G, Neisius U, Skov PS, Petersen LJ y Schmelz M (2000).** Acute effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin-a microdialysis study. *J Invest Dermatol* 115 (6): 1015-20.

**Weihe E, Hartschuh W y Weber E (1985).** Prodynorphin opioid peptides in small somatosensory primary afferents of guinea pig. *Neurosci Lett* 58 (3): 347-52.

**Weinberg JB (2000)** Nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase 2 interactions in inflammation. *Immunol Res* 22 (2-3): 319-41.

**Wick MJ, Minnerath SR, Lin X, Elde R, Law P y Loh HH (1994).** Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned  $\mu$ ,  $\delta$  and  $\kappa$  opioid receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 27 (1): 37-44.

**Wiesenfeld-Hallin Z, de Arauja Lucas G, Alster P, Xu XJ y Hökfelt T (1999).** Cholecystokinin/opioid interactions. *Brain Res* 848 (1-2): 78-89.

**Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR y Gilroy D (2000).** Resolution of inflammation. *Int J Immunopharmacol* 22 (12): 1131-5.

**Wilson JL, Nayyar V y Walker JS (1996).** The site of anti-arthritis action of the kappa-opioid, U-50,488H, in adjuvant arthritis: importance of local administration. *Br J Pharmacol* 118(7):1754-60.

- Winter CA, Risley EA y Nuss GW (1962).** Carrageenan induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 111: 544-7.
- Winter J, Walpole CS, Bevan S y James IF (1993).** Characterization of resiniferatoxin binding sites on sensory neurons: co-regulation of resiniferatoxin binding and capsaicin sensitivity in adult rat dorsal root ganglia. *Neuroscience* 57(3): 747-57.
- Wollemann M, Benyhe S y Simon J (1993).** The kappa-opioid receptor: evidence for the different subtypes. *Life Sci* 52 (7): 599-611.
- Wollin MS (1996).** Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirculation* 3 (1): 1-17.
- Wüster M, Schulz R y Herz A (1981).** Multiple opiate receptors in peripheral tissue preparations. *Biochem Pharmacol* 30 (14): 1883-7.
- Xiaochun Y, Weimin A, Jinsong B y Tak Ming W (1999).** Pro and anti-arrhythmic effects of a  $\kappa$  opioid receptor agonist: a model for the biphasic action of a local hormone in the heart. *Clin Exper Pharmacol Physiol* 26(10): 842-4.
- Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL y Simmons DL (1991).** Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2692-6.
- Yaksh TL (1988).** Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. *Brain Res* 458 (2): 319-24.
- Yoshikai Y (2001).** Roles of prostaglandins and leukotrienes in acute inflammation caused by bacterial infection. *Curr Opin Infect Dis* 14 (3): 257-63.
- Yu CY, Boyd NM, Cringle SJ, Su EN, Alder VA, Yu DY (2002).** An in vivo and in vitro comparison of the effects of vasoactive mediators on pulpal blood vessels in rat incisors. *Arch Oral Biol* 47 (10): 723-32.
- Yu Y, Zhang L, Yin X, Sun H, Uhl GR y Wang JB (1997).**  $\mu$  opioid receptor phosphorylation, desensitization and ligand efficacy. *J Biol Chem* 272: 28869-74.
- Zadina JE, Hackler L, Ge LJ y Kastin AJ (1997).** A potent and selective endogenous agonist for the  $\mu$ -opiate receptor. *Nature* 386 (6624): 499-502.
- Zaki PA, Bilsky EJ, Vanderah TW, Lai J, Evans CJ y Porreca F (1996).** Opioid receptor types and subtypes: the delta receptor as a model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:379-401.
- Zeitune MG, Bazerque E y Bazerque PM (1991).** Specific opiate effects on dextran-induced inflammation in rats. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 41 (3): 349-58.
- Zhang Q, Schaffer M, Elde R y Stein C (1998).** Effects of neurotoxins and hindpaw inflammation on opioid receptor immunoreactivities in dorsal root ganglia. *Neuroscience* 85 (1): 281-91.
- Zhang X, de Araujo Lucas G, Elde R, Wiesenfeld-Hallin Z y Hökfelt T (2000).** Effect of morphine on cholecystokinin and mu-opioid receptor-like immunoreactivities in rat spinal dorsal horn neurons after peripheral axotomy and inflammation. *Neuroscience* 95 (1):197-207.

## **Bibliografía**

---

**Zhao Q, Garreau I, Sannier F y Piot JM (1997).** Opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. *Biopolymers* 43 (2): 75-98.

**Zhu J, Luo L-Y, Mao G-F, Ashby B y Liu-Chen L-Y (1998).** Agonist-induced desensitization and down-regulation of the human kappa opioid receptor expressed in chinese hamster ovary cells. *J Pharmacol Exp Ther* 285 (1): 28-36.