

**CARACTERIZACIÓN DE LA APARICIÓN Y DESARROLLO DE
TOLERANCIA A LA MORFINA EN UN MODELO DE
INFLAMACIÓN MONOARTICULAR EN RATÓN**

Víctor Fernández Dueñas

ÍNDICE

I. Introducción	1
1. Sistemas de transmisión nociceptiva	2
1.1. Fibras aferentes primarias. Nociceptores y ganglios de la raíz dorsal.....	2
1.2. Transmisión nociceptiva en la médula espinal	5
1.3. Transmisión nociceptiva a nivel supra-espinal	8
2. Inflamación periférica	10
3. Sistema opioide endógeno	14
3.1. Péptidos opioides endógenos y receptores opioides.....	15
3.2. Activación de los receptores opioides. Consecuencias moleculares.....	18
3.3. Activación del sistema opioide endógeno durante la inflamación periférica	21
4. Tolerancia opioide	22
4.1. Efectos de la administración crónica de opioides a nivel celular	23
4.2. Efectos de los opioides sobre los sistemas de transmisión nociceptiva	30
4.3. Tolerancia opioide en presencia de inflamación.....	32
II. Hipótesis y objetivos	37
III. Material y métodos	39
1. Animales y estabulación	39
2. Inducción y evaluación de la inflamación	39
3. Inducción y evaluación de tolerancia a la morfina en presencia de inflamación	40
4. Parámetros conductuales	42
4.1. Evaluación del tránsito gastrointestinal	42
4.2. Determinación de la extravasación de plasma.....	42
4.3. Evaluación de la hiperalgesia térmica: plantar test	43
4.4. Determinación de la hiperalgesia mecánica: test de Randall y Selitto	44

4.5.	Evaluación de la alodinia: test de Von Frey	45
4.6.	Determinación de la actividad locomotora: test de <i>holeboard</i>	45
5.	Determinación de la expresión del receptor opioide μ	46
5.1.	Aislamiento de las muestras de los tejidos	46
5.2.	Extracción y preparación de las proteínas totales de membrana	46
5.3.	Western blot	47
6.	Grupos de experimentos	49
7.	Fármacos utilizados y vía / modo de administración	53
8.	Análisis estadístico	53
IV.	Resultados	55
1.	Inflamación monoarticular inducida por CFA	56
1.1.	Evolución del peso y la temperatura corporal de animales sin y con inflamación	56
1.2.	Efectos de la administración subplantar de CFA sobre el diámetro y el peso de las patas, la extravasación de plasma, y la respuesta nociceptiva (hiperalgesia y alodinia)	57
1.3.	Efecto de la administración subplantar de CFA sobre el tránsito gastrointestinal	61
2.	Efectos anti-nociceptivos de los opioides durante la inflamación inducida por CFA	62
2.1.	Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la hiperalgesia térmica	62
2.2.	Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la hiperalgesia mecánica	65
2.3.	Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la alodinia	67
2.4.	Efectos de la administración sistémica de antagonistas opioides μ sobre la hiperalgesia térmica	69

2.5.	Reversión de los efectos de la morfina mediante antagonistas opioides μ , sobre la hiperalgesia mecánica	71
2.6.	Reversión del efecto anti-alodínico de la morfina mediante la administración de antagonistas opioides μ específicos	72
3.	Efectos de los opioides sobre la extravasación de plasma durante la inflamación inducida por CFA	74
3.1.	Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la extravasación de plasma	74
3.2.	Reversibilidad de los efectos inhibitorios de la morfina sobre la extravasación de plasma tras la administración de antagonistas opioides μ	76
4.	Inducción de tolerancia a la morfina durante la inflamación periférica	77
4.1.	Niveles plasmáticos de morfina después de la implantación de un comprimido de morfina de 75 mg en el ratón	77
4.2.	Evolución del peso y la temperatura corporal de animales placebo y tolerantes a la morfina	79
4.3.	Efectos de la implantación del comprimido de morfina en presencia de inflamación, sobre el diámetro y el peso de la patas, la extravasación de plasma, la hiperalgesia y la alodinia	80
5.	Efectos de la administración aguda de morfina subcutánea, sobre la nocicepción y la extravasación de plasma en animales placebo y tolerantes	82
5.1.	Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la hiperalgesia térmica	82
5.2.	Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la hiperalgesia mecánica	84
5.3.	Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la alodinia	86
5.4.	Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la extravasación de plasma	87
5.5.	Efecto de la morfina sobre la actividad locomotora	88

6. Efecto de la administración aguda subplantar de morfina en animales placebo y tolerantes	89
7. Determinación de la expresión de receptores opioides μ durante la inflamación periférica y la tolerancia a la morfina	91
7.1. Determinación de la expresión de receptores opioides μ en los distintos tejidos	91
7.2. Expresión de receptores opioides μ en la almohadilla plantar	92
7.3. Niveles proteicos de receptores opioides μ en los ganglios de la raíz dorsal	94
7.4. Determinación de los niveles proteicos de receptores opioides μ en la médula espinal	95
V. Discusión	97
VI. Conclusiones	123
VII. Bibliografía	125
VIII. Abreviaturas	143

Los procesos inflamatorios osteoarticulares crónicos afectan a la población adulta con una elevada prevalencia, y como en la mayoría de casos se desconocen los mecanismos patofisiológicos que originan estos procesos, su tratamiento es sintomático. Los opioides han sido recientemente introducidos en el tratamiento del dolor osteoarticular, pero estos fármacos pueden presentar efectos indeseables (tales como estreñimiento, sedación, depresión respiratoria, alucinaciones, etc.), que pueden resultar molestos y/o peligrosos para el paciente (Perrot, 1999a). Por otra parte, la administración crónica de opioides puede inducir tolerancia a sus efectos anti-nociceptivos, requiriéndose dosis más elevadas del fármaco para obtener el mismo nivel o grado de analgesia. La tolerancia opioide aparece también para los efectos indeseables, pero su evolución temporal es más tardía, por lo que el aumento en las dosis de opioides requeridas para mantener una analgesia adecuada, va acompañado de efectos adversos incompatibles con el bienestar del paciente (Nestler, 2001).

El fenómeno de la tolerancia opioide ha sido ampliamente estudiado *in vivo* e *in vitro*, con resultados contradictorios tanto en lo referente a los mecanismos implicados en el proceso como en la definición de su etiología (Taylor y Fleming, 2001). Sin embargo, la mayoría de trabajos experimentales sobre tolerancia opioide han sido realizados en modelos animales en ausencia de inflamación. Este hecho dificulta la extrapolación de los resultados a la práctica clínica, puesto que en el hombre, la administración de opioides durante el tratamiento de las enfermedades osteoarticulares se lleva a cabo en pacientes que presentan dolor e inflamación.

La lesión inflamatoria periférica induce alteraciones en los sistemas de transmisión y modulación nociceptiva, con cambios plásticos que de momento están poco caracterizados (expresión de canales iónicos, transmisores, receptores, etc.); estos cambios se producen tanto a nivel del sistema nervioso periférico (terminaciones sensoriales primarias) como en el sistema nervioso central (SNC), principalmente a nivel de la médula espinal (Scholz y Wolf, 2002). Los mismos sistemas también se ven afectados por la administración crónica de opioides, hecho que sugiere que el desarrollo de tolerancia opioide durante la inflamación podría presentar una evolución y características diferentes a las observadas en ausencia de ésta. Para evaluar esta hipótesis, en el presente trabajo hemos estudiado la aparición y desarrollo de tolerancia a la morfina en un modelo de inflamación monoarticular en ratón.

Esta aproximación, además de permitir estudiar los mecanismos implicados en estas condiciones (inflamación y tolerancia opioide), se asemeja a la situación clínica donde los opioides y distintas combinaciones de fármacos analgésicos se administran, de forma crónica, a pacientes con inflamación osteoarticular.

1. SISTEMAS DE TRANSMISIÓN NOCICEPTIVA.

En los procesos inflamatorios crónicos, el daño tisular induce una estimulación persistente o continua de las terminaciones sensoriales (nociceptores–terminaciones nerviosas periféricas de las fibras aferentes primarias) encargadas de la transmisión del dolor. La activación crónica de los nociceptores por distintos mediadores induce *hipersensibilidad* o sensibilización nociceptiva, que se refleja en cambios en los niveles de activación basal de las neuronas, en la excitabilidad del sistema (amplificación) y alteraciones en la transcripción génica (plasticidad). Esta situación comporta la aparición de hiperalgesia (respuesta exagerada a un estímulo nociceptivo) y alodinia (respuesta nociceptiva frente a un estímulo inocuo), y en ocasiones dolor espontáneo (Cerveró y Laird, 1996). Esta respuesta, por otra parte, no depende sólo de la activación de los sistemas periféricos, sino que la información originada en la periferia es transmitida a niveles de integración superiores, donde es procesada y sometida a múltiples influencias excitadoras e inhibitoras, incluyendo los sistemas cognitivos y afectivos de cada individuo. De forma resumida, la transmisión nociceptiva se procesa en tres niveles anatómicos diferentes: periférico, espinal y supra-espinal. A continuación, revisaremos las distintas estructuras implicadas en la percepción del dolor, desde el origen y la transmisión nociceptiva hasta su integración y generación de una respuesta. Asimismo, describiremos los cambios que se producen (neuroplasticidad) en dichos sistemas durante procesos inflamatorios periféricos crónicos.

1.1. Fibras aferentes primarias. Nociceptores y ganglios de la raíz dorsal.

En el ámbito periférico, las estructuras sensoriales especializadas en captar la información nociceptiva son los nociceptores, localizados en la piel, el tejido subcutáneo,

músculos, articulaciones y vísceras (Cerveró y Laird, 1996). Fisiológicamente, los nociceptores son terminaciones periféricas de neuronas bipolares o pseudo-unipolares, cuyo cuerpo celular se encuentra en los ganglios de las raíces dorsales (GRD) y cuyas terminaciones centrales se dirigen y penetran el asta posterior o dorsal de la médula espinal (ADME). En condiciones fisiológicas, los nociceptores son capaces de distinguir entre señales nocivas o inocuas, según la intensidad del estímulo, aunque el umbral de activación de los nociceptores depende del tejido inervado y del tipo de estímulo. En la membrana de los nociceptores se expresan receptores especializados que se activan por estímulos específicos, por ejemplo canales iónicos sensibles al calor, o receptores sensibles a la estimulación por agentes químicos (Caterina y col, 1999).

Cuando un estímulo específico o de una intensidad suficiente activa los nociceptores, se genera una corriente de despolarización como respuesta. La mayoría de células animales presentan una diferencia de potencial (voltaje) entre el interior y el exterior de la membrana celular. Este voltaje se debe al desequilibrio que existe entre la concentración de iones del citoplasma y el líquido extracelular. En general, la concentración de iones Na^+ es mucho mayor en el exterior de la célula que en el interior, mientras que sucede lo contrario con los iones K^+ . Cuando la membrana celular se encuentra en reposo se acumula un exceso de iones negativos (Cl^-) en el interior de la membrana, de manera que en estado de reposo existe un potencial de membrana negativo. Cuando se inicia un potencial de acción (por un estímulo nociceptivo, por ejemplo), aumenta bruscamente la permeabilidad de la membrana a los iones de Na^+ y en menor proporción a los de K^+ , de forma que éstos penetran en la célula y se invierte el potencial de membrana (despolarización), generando un impulso nervioso que se propaga por la fibra nerviosa. Casi inmediatamente después la membrana se repolariza, ya que se bloquean los canales de Na^+ (pero no los de K^+), hecho que permite la vuelta al potencial de reposo. Posteriormente, la concentración de los distintos iones a ambos lados de la membrana es restituida mediante transporte activo.

La estimulación repetida o continuada de los nociceptores puede conllevar su sensibilización, de forma que disminuye el umbral de excitación necesario para generar un potencial de acción; es decir, aumenta la excitabilidad de los nociceptores, de modo que el grado de despolarización requerido para iniciar la descarga de un estímulo nervioso es menor.

Algunas de las sustancias liberadas durante el proceso inflamatorio (que se revisan más adelante) actúan, directa o indirectamente, modulando o aumentando la sensibilidad de los receptores. Básicamente, la activación o inactivación de los nociceptores se produce en relación con cambios en la conductancia a los iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , que derivan en la apertura de canales asociados a receptores de membrana o a cascadas de segundos mensajeros en el interior de la célula (Richardson y Vasko, 2002). Por ejemplo, las citoquinas liberadas por células del sistema inmune que infiltran el tejido inflamado, aumentan la conductancia del Ca^{2+} y Na^+ ; la serotonina, una amina liberada por las plaquetas y los mastocitos cuando hay lesión tisular, produce un efecto similar, a la vez que disminuye la conductancia del K^+ . Otros factores, como la histamina, la bradicinina, la sustancia P o las prostaglandinas, también inducen una disminución de la conductancia del K^+ , y un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, por medio de la activación de cascadas de señalización intracelular, como la vía de la fosfolipasa C (PLC), que se describe más adelante (Millan, 1999).

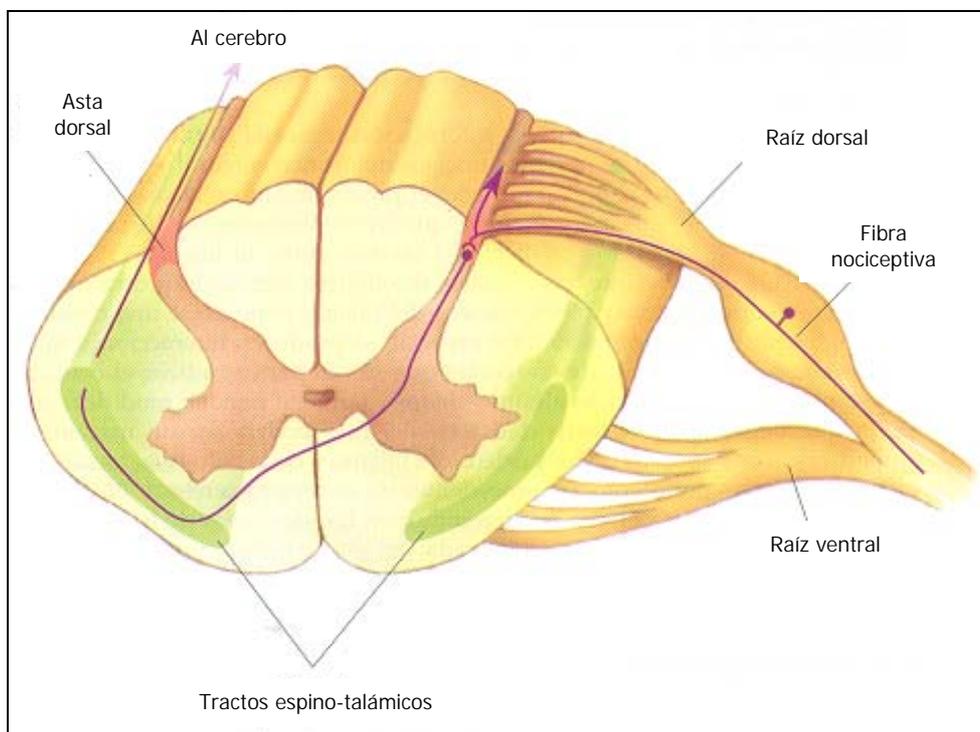
Las vías de transducción de señales intracelulares (PLC, Ca^{2+} , etc.), implicadas en la *sensibilización* de los nociceptores, incrementan la intensidad y la duración del estímulo de futuras descargas. Por otra parte, modifican la transcripción génica induciendo alteraciones fenotípicas en estas células (neuroplasticidad). Por ejemplo, se ha demostrado un aumento en la expresión de ciertos subtipos de canales de Na^+ (resistentes a la tetrodotoxina) expresados en las terminaciones nerviosas periféricas, que se activan por estímulos nociceptivos y contribuyen al aumento de la excitabilidad neuronal (Dubner y Gold, 1999).

Los ganglios de la raíz dorsal están formados por los cuerpos celulares de las neuronas aferentes sensoriales primarias y sintetizan toda una serie de proteínas (transmisores, receptores, etc.) que viajan en dirección periférica y central, donde ejercen distintas funciones. Durante la inflamación periférica, se produce una estimulación o "*up-regulation*" de estos transmisores / moduladores y de sus receptores. De momento, se desconoce el tipo específico de señal que desde la periferia induce la expresión de un determinado sustrato en los GRD. La modificación fenotípica de estas neuronas altera sus propiedades de transducción, conducción y/o transmisión de señales, contribuyendo a la sensibilización al dolor y a los fenómenos de plasticidad neuronal que aparecen tanto a nivel periférico como central (Scholz y Wolf, 2002).

1.2. Transmisión nociceptiva en la médula espinal.

La información recogida por los nociceptores es conducida por las fibras aferentes primarias hasta la médula espinal, donde hacen sinapsis y transmiten la información nociceptiva a neuronas de segundo orden, situadas en el asta dorsal de la médula espinal (figura 1). Estas neuronas de segundo orden, transmiten la información hacia centros supra-espinales mediante vías ascendentes (espino-talámicas, entre otras). El ADME (asta dorsal de la médula espinal) se considera un centro de integración, ya que a este nivel, la señal nociceptiva sufre transformaciones profundas de filtración, discriminación y codificación; tras lo cual, la información resultante se distribuye hacia unas u otras vías ascendentes hasta alcanzar centros supra-espinales y la corteza cerebral. El ADME recibe, además, proyecciones axónicas desde centros nerviosos superiores (tronco del encéfalo), que pueden ser excitadoras o inhibitoras, lo que implica un control supra-espinal de la transmisión nociceptiva a nivel espinal.

Figura 1. Transmisión de la información sensorial primaria en la médula espinal.



Se muestra en la figura como un haz de fibras sensoriales aferentes primarias penetra en la médula espinal y manda axones que hacen sinapsis con neuronas del asta dorsal. Las neuronas de segundo orden mandan fibras ascendentes que forman los haces o tractos espino-talámicos, los cuales hacen sinapsis a nivel de distintos centros supra-espinales hasta alcanzar la corteza cerebral (modificado de Bear y col, 1998).

Las neuronas sensoriales primarias transmiten la información a las neuronas de segundo orden mediante la liberación de neurotransmisores sintetizados en los GRD; entre los principales neurotransmisores excitadores encontramos aminoácidos (glutamato, aspartato) y/o péptidos (sustancia P, CGRP, etc.), que actúan uniéndose a receptores específicos post-sinápticos. En la actualidad se acepta que el principal transmisor excitador es el glutamato, que activa principalmente dos clases de receptores: los *ionotrópicos*, de los cuales se han caracterizado tres subtipos (NMDA, AMPA y kainato), y que participan en la regulación de la abertura de los canales de Na⁺ y K⁺; y los *metabotrópicos*, que están acoplados a proteínas G, y tras su activación aumentan el contenido de inositoltrifosfato (IP₃) y la liberación de Ca²⁺ desde los depósitos intracelulares.

En el ADME, los receptores NMDA del glutamato y probablemente los receptores NK-1 de la sustancia P, están implicados en los fenómenos de "*wind up*" y plasticidad neuronal que tienen lugar durante la inflamación periférica. De esta forma, la médula espinal se comporta como una estructura dinámica. La estimulación repetida de las neuronas de segundo orden resulta en la suma temporal de potenciales post-sinápticos excitadores, que tienen como consecuencia un incremento no lineal en la respuesta de las neuronas del ADME. De esta forma, la respuesta a cada señal de entrada se va incrementando. Este fenómeno se ha designado como "*wind up*" (Budai, 2000). La estimulación repetida de los receptores NMDA induce, por tanto, un aumento progresivo de las descargas neuronales (amplificación de la respuesta) hasta llegar a producir la activación espontánea de las neuronas de segundo orden (Dickenson y col, 1997; Bennett, 2000).

En el asta dorsal de la médula espinal, además del fenómeno de "*wind up*", tienen lugar otros procesos de plasticidad neuronal más complejos, que inducen cambios en la sensibilidad al dolor que pueden ser incluso irreversibles. Estos cambios implican alteraciones en la expresión de neurotransmisores, receptores o canales iónicos. Durante la inflamación periférica, por ejemplo, el aumento de los receptores NMDA en estas neuronas es paralelo al aumento en la síntesis de glutamato en los GRD de las fibras aferentes primarias, lo que implica una facilitación y un aumento de la acción de los mismos, favoreciendo la transmisión nociceptiva.

En la médula espinal, la activación de los receptores NMDA aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular, que induce la estimulación de una serie de cascadas intracelulares que tienen como consecuencia (entre otros efectos) la activación de la proteína kinasa C (PKC) y la inducción de las enzimas COX-2 e iNOS a nivel medular (Trujillo y Akil, 1995; Przewlocki y Przewlocka, 2001). La activación de la PKC aumenta la excitabilidad post-sináptica, ya sea incrementando la eficacia de la respuesta inducida por la activación de los receptores acoplados a canales iónicos (se desplaza a los iones de Mg^{2+} que bloquean el paso de Ca^{2+} a través de dichos canales), o modificando la distribución intracelular de los receptores, modulando y/o regulando su interacción con proteínas del citoesqueleto (Guo y Huang, 2001). También pueden producirse fenómenos o procesos *desinhibitorios*, como por ejemplo aquellos que permiten que aumente de forma excesiva la concentración intracelular de Ca^{2+} , y que pueden inducir toxicidad neuronal (excito-toxicidad), hasta provocar la muerte celular (Mayer y col, 1999). La activación del receptor NMDA también induce la enzima COX-2 en la médula, y como consecuencia aumentan los niveles de prostaglandinas, que incrementan o facilitan la transmisión post-sináptica, y tienen un papel relevante en la sensibilización nociceptiva y en la inducción y el mantenimiento de la hiperalgesia y la alodinia (Hay y col, 1997; Du y col, 2003). La síntesis de prostaglandinas aumenta también por la acción de la sustancia P, actuando a través de los receptores NK-1, que también están sobre-expresados durante la inflamación crónica (Yaksh y col, 1999). Se acepta en la actualidad que las prostaglandinas también facilitan la acción de los transmisores excitadores interaccionando con receptores específicos situados en las terminaciones pre-sinápticas. Como consecuencia aumenta la liberación de neurotransmisores por las fibras aferentes primarias, es decir, se produce un proceso de retroalimentación positiva que explicaría (al menos en parte) el papel de las prostaglandinas en la hiperexcitabilidad neuronal en el ámbito espinal (Dirig y Yaksh, 1999). La inducción de la enzima iNOS produce un aumento en los niveles de NO, que activa la enzima guanilato ciclasa, lo que aumenta el contenido de GMPc intracelular; el GMPc tiene múltiples efectos sobre diversas cascadas de señalización intracelular, tales como el aumento de la PKC y la facilitación de las respuestas excitadoras inducidas por mecanismos directos e indirectos sobre algunos

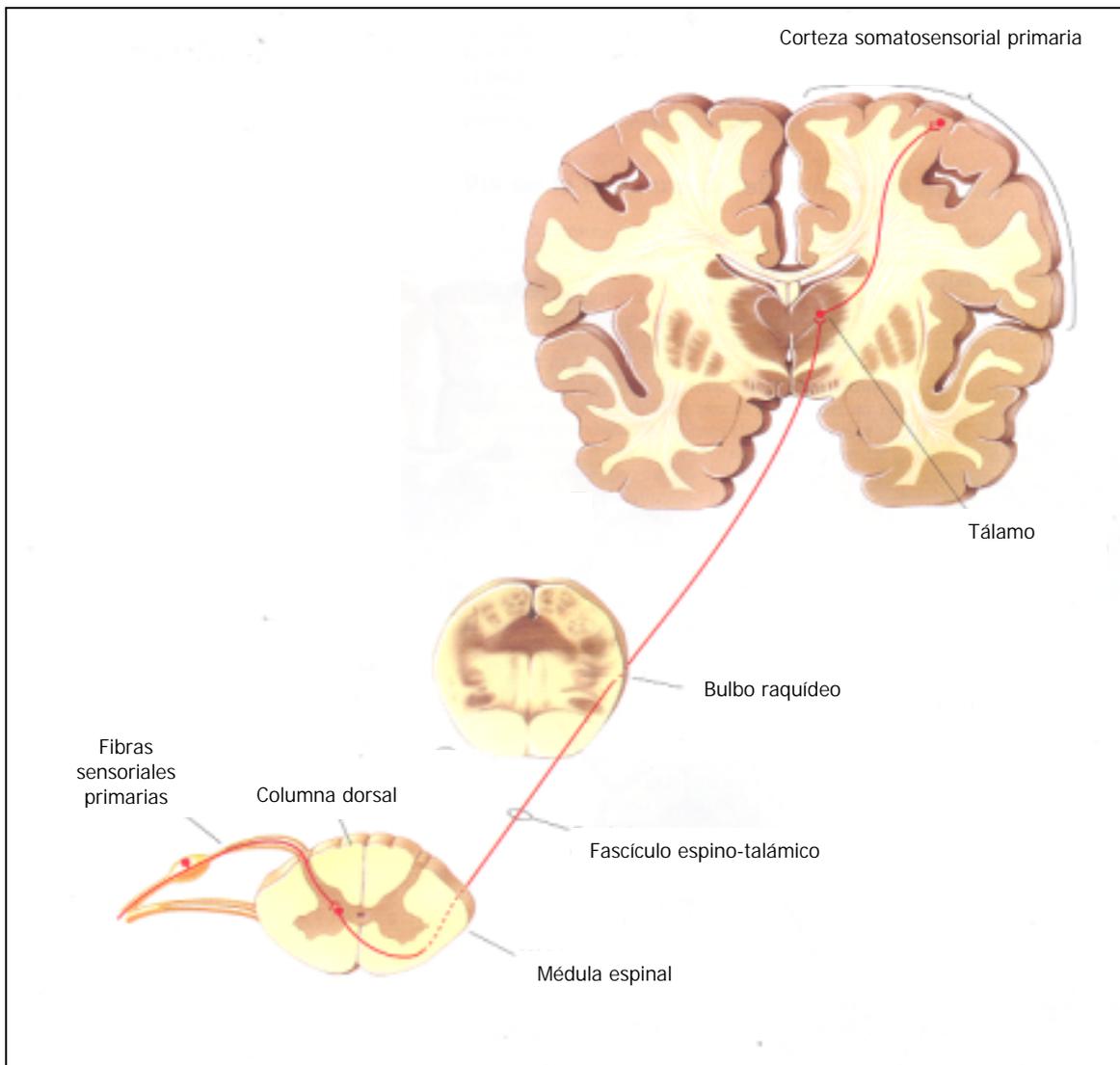
sistemas intrínsecos espinales. Las propiedades gaseosas del NO le permiten difundir a la terminal pre-sináptica y amplificar la respuesta excitadora (Przewlocki y Przewelocka, 2001).

Hemos revisado brevemente los principales componentes implicados en la sensibilización central en el nivel del asta dorsal de la médula, donde la transmisión nociceptiva se produce a través de la primera sinapsis (terminación central de las fibras aferentes primarias) hasta las neuronas de segundo orden. A este nivel, existen otros transmisores y moduladores que podrían participar en la sensibilización central que aparece durante procesos inflamatorios periféricos. De esta forma, la dinorfina, que es un péptido opioide endógeno (POE), en determinadas condiciones puede tener una acción pro-nociceptiva a nivel de la médula espinal, probablemente por interacción directa o indirecta con los receptores NMDA (Wang y col, 2001). Por otra parte, a través de algunos mediadores tales como el NO, se puede inducir la inhibición de interneuronas inhibitorias (GABA), de forma que el resultado final es que se favorece la transmisión excitadora (Ferreira y col, 1999). Otros péptidos que tienen un papel relevante en la transmisión nociceptiva son la familia de las colecistocininas (CCK), que modulan la transmisión nociceptiva en el ámbito espinal mediante una acción indirecta sobre el sistema opioide endógeno (sistema anti-opioide), así como actuando sobre otros neuropéptidos.

1.3. Transmisión nociceptiva a nivel supra-espinal.

Las neuronas del asta dorsal de la médula espinal proyectan sus axones hacia centros supra-espinales (predominantemente bulbares y talámicos), dando lugar a los haces o vías ascendentes. Entre ellas las mejor definidas son: el haz espino-talámico (figura 2), el haz espino-reticular y el haz espino-mesencefálico, los cuales transmiten además de información nociceptiva, otros tipos de información sensorial. Las neuronas nociceptivas de estas vías pueden terminar en más de un núcleo supra-espinal, ya que envían colaterales axónicas y abundantes ramificaciones que les permiten enviar su mensaje a más de un centro nervioso.

Figura 2. Vía espino-talámica de transmisión de la información nociceptiva.



La vía espino-talámica es la principal vía por medio de la cual la información nociceptiva alcanza la corteza cerebral (modificado de Bear y col, 1998).

Dentro de las estructuras superiores de proyección de las vías nociceptivas existen zonas o núcleos de especial importancia, tales como el núcleo ventro-postero-lateral del tálamo (la localización y cuantificación del dolor parecen estar mediados por la proyección de este complejo a la corteza somatosensorial primaria), los núcleos de la formación reticular bulbar y protuberancial, entre los que destacan el núcleo del rafe y la sustancia gris periacueductal.

La transmisión nociceptiva en el tronco encefálico, donde los axones del haz espino-talámico envían colaterales a distintos núcleos, se lleva a cabo mediante la liberación de neurotransmisores, que al igual que en la médula espinal, pueden ser aminoácidos (tales como

el glutamato) y péptidos (sustancia P, dinorfina, etc.). De esta forma, se han descrito fibras que tienen su origen en el tronco del encéfalo y proyectan a los núcleos del tálamo, que contienen sustancia P, glutamato y receptores del NMDA, entre otros (Inoue y col, 2003). De tal forma que, aunque no está bien caracterizado, es posible que a nivel del SNC se produzcan también fenómenos de neuroplasticidad como consecuencia de una lesión periférica crónica.

En resumen, los estímulos producidos por la lesión inflamatoria periférica inducen cambios en los sistemas de transmisión / modulación nociceptiva en los ámbitos periférico, espinal y supra-espinal, que explican (al menos en parte) los fenómenos de sensibilización al dolor que tienen como consecuencia la aparición de hiperalgesia y alodinia. Los fenómenos de plasticidad neuronal han sido caracterizados a nivel periférico y en el asta dorsal de la médula espinal, sin que se conozca de momento si cambios similares se producen en centros superiores implicados en la transmisión nociceptiva a nivel supra-espinal.

2. INFLAMACIÓN PERIFÉRICA.

Los sistemas de transmisión nociceptiva descritos se activan como respuesta a la lesión inflamatoria periférica. La aparición de hiperalgesia y alodinia tienen de hecho una finalidad protectora del tejido inflamado, ya que previenen el daño posterior del área lesionada (Cerveró y Laird, 1996). Por otra parte, la lesión tisular provoca una respuesta inflamatoria que tiene como primer objetivo destruir, inactivar o neutralizar los agentes responsables de la lesión, y en segundo lugar eliminar los detritus tisulares del área lesionada, todo ello con el fin de facilitar la reparación del tejido. En muchos casos la inflamación no llega a resolverse de forma definitiva, y entonces se produce una fase crónica proliferativa en la que el tejido sufre distintos grados de degeneración.

La respuesta inflamatoria local consiste en la liberación, por parte de las células inmunes y de las terminaciones nerviosas, de un gran número de mediadores pro-inflamatorios (que inducen vasodilatación, edema y extravasación de plasma), y de sustancias pro-nociceptivas que bien directa o indirectamente activan las terminaciones sensoriales primarias. A continuación revisaremos los principales mediadores que participan en la respuesta inflamatoria, tanto a nivel vascular (edema, etc.) como nociceptivo.

La respuesta inflamatoria se produce en cualquier tejido vascularizado y los primeros cambios se producen en el ámbito vascular. Las sustancias vasoactivas y quimiotácticas, que se liberan a partir de las células / tejidos lesionados, producen efectos diferentes que tienen como consecuencia la aparición de los signos / síntomas clásicos de la inflamación: "*dolor, calor y rubor*". Por una parte, estos mediadores de la inflamación tienen un efecto vasodilatador, aumentando además la permeabilidad capilar y provocando un incremento del flujo sanguíneo que favorece la difusión de fluido, componentes plasmáticos y células del sistema inmune, desde la circulación al tejido afectado. Al poco tiempo de comenzar la inflamación aparece edema debido a la extravasación de agua y electrolitos al tejido; aparentemente este hecho está en relación con la acción vasodilatadora de los factores lisosomales de las células dañadas y de la histamina liberada a partir de los mastocitos, que se encuentran localizados principalmente en los vasos sanguíneos. Los mastocitos también liberan serotonina, un transmisor esencial en la regulación del tono vascular y la agregación plaquetaria, y que en los tejidos periféricos también activa los nociceptores y por tanto puede producir dolor (Khalil y Helme, 1990; Parada y col, 2001).

En el tejido lesionado van apareciendo de manera gradual otros componentes, entre ellos el factor de coagulación XII, que al entrar en contacto con el colágeno tisular activa la síntesis de cininas (Colman, 1999). Las cininas son péptidos implicados en procesos vasculares (incrementan la permeabilidad vascular) y nociceptivos (activan o estimulan los nociceptores polimodales C y la síntesis de prostaglandinas). El papel de la bradicinina en el ámbito vascular consiste en inducir quimiotaxis de neutrófilos (principalmente), a la vez que favorecer la liberación de óxido nítrico (NO) de las células endoteliales, que una vez liberado produce vasodilatación. En el nivel de las fibras aferentes sensoriales, la bradicinina sensibiliza las fibras nociceptivas, efecto que aumenta por la disminución del pH (aumento en la concentración de H^+) que tiene lugar en el tejido inflamado (Bevan y Geppetti, 1994). La bradicinina también estimula la liberación de taquicinas, como la sustancia P o el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), a partir de las fibras nociceptivas. Estos neuropéptidos, una vez liberados localmente, actúan sobre los vasos y producen vasodilatación, extravasación de plasma, favorecen la quimiotaxis leucocitaria, la liberación de citoquinas, etc. (Donaldson y col,

1992; Green y col, 1997; Salo, 1999). La presencia de receptores específicos para la bradicinina, situados en las fibras simpáticas y en los macrófagos, podría tener relación con un proceso de retroalimentación positiva de la inflamación.

La excitabilidad de las fibras nociceptivas también incrementa por la presencia de otros factores, tales como el factor de crecimiento neuronal (NGF). Este factor trófico controla el desarrollo de las fibras nociceptivas y simpáticas, y regula la síntesis de sustancia P y CGRP a nivel de los cuerpos neuronales situados en los ganglios de la raíz dorsal nociceptivos y simpáticos. La liberación de NGF, a partir de los fibroblastos del tejido inflamado, estimula la liberación de taquicinas de las fibras nociceptivas, y de histamina y serotonina a partir de las células inflamatorias (Salo, 1999).

Los cambios de flujo sanguíneo local producidos durante la inflamación inducen la síntesis, por parte de las células endoteliales, de radicales libres y óxido nítrico. Este último tiene una acción principalmente vasodilatadora, aunque también participa en la modulación de múltiples procesos relacionados con la circulación sanguínea, la neurotransmisión y la respuesta inmunitaria. Tal como se ha mencionado anteriormente, durante la inflamación se induce la síntesis de la isoforma inducible de la iNOS, cuya función principal es aumentar la síntesis de NO y a la vez estimular la producción de prostanoideos (Dolan y col, 2000). Los prostanoides (prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina, leucotrienos) se sintetizan a partir del ácido araquidónico, por la acción de las enzimas ciclooxigenasa (COX) y lipoxigenasa. Durante la inflamación periférica tiene especial relevancia la isoforma ciclooxigenasa-2 (COX-2), que es inducible por la acción de mediadores pro-inflamatorios. En la periferia, esta enzima se expresa en el sistema inmune y en las fibras sensoriales y simpáticas, e induce un aumento en los niveles locales de prostaglandinas (Dray y col, 1995). Las prostaglandinas liberadas al medio actúan sobre las fibras nociceptivas, sensibilizando los nociceptores y estimulando la liberación de sustancia P y CGRP, y de leucotrienos, que tienen una importante acción quimiotáctica, favoreciendo la adhesión de células inflamatorias (Bley y col, 1998).

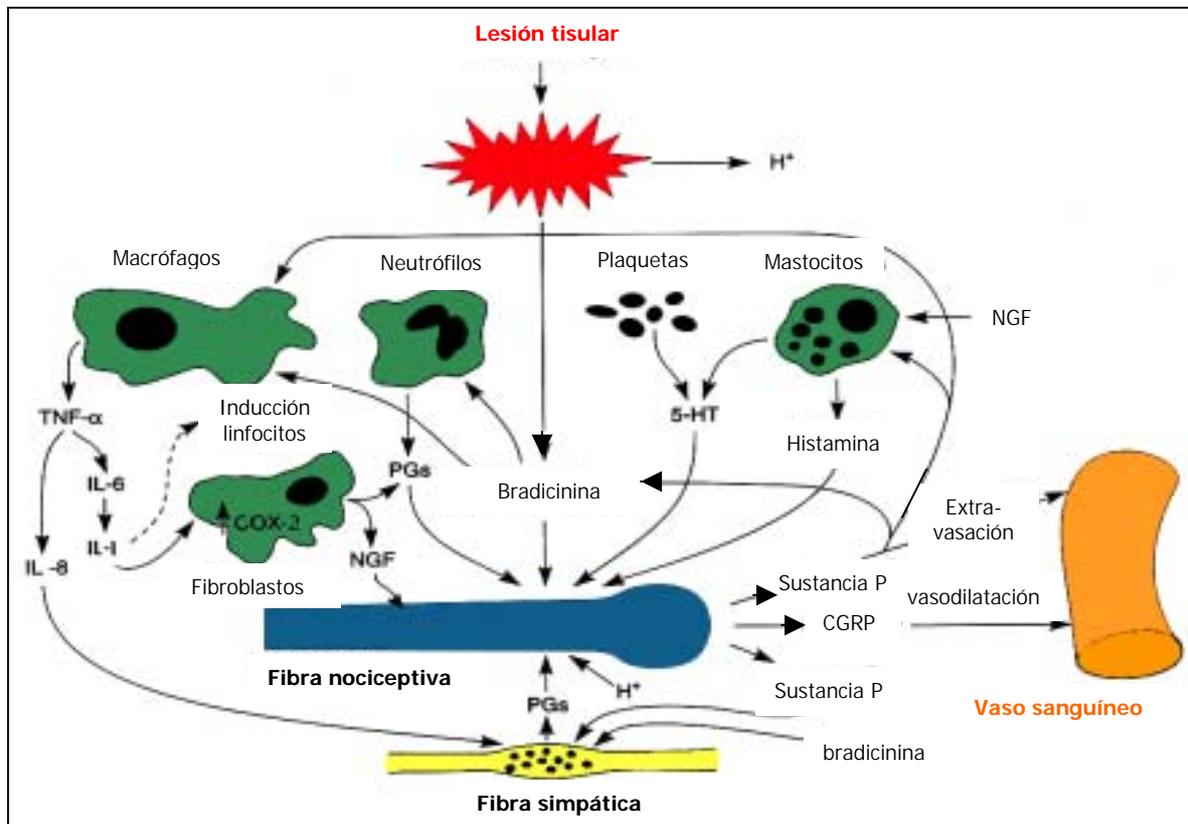
Las células endoteliales afectadas por el proceso inflamatorio expresan moléculas especiales (selectinas, integrinas, etc.) que permiten establecer uniones con los leucocitos y de esta forma favorecen su migración al lugar de la inflamación. Las primeras células leucocitarias

que llegan al tejido inflamado son los denominados *fagocitos*, y también las plaquetas, que pueden aumentar la permeabilidad de los vasos y el flujo sanguíneo. Las principales células fagocíticas son los neutrófilos y los macrófagos; los primeros son células granulocíticas polimorfonucleares, encargadas de destruir, fagocitar y eliminar el agente agresor, además de estimular la liberación de cininas. Los macrófagos son células derivadas de los monocitos, que se diferencian cuando llegan al lugar de la lesión; tienen también una función fagocitaria, y además, tras procesar el antígeno, lo presentan a los linfocitos para la formación de inmunoglobulinas. Finalmente, las plaquetas liberan serotonina, activan al sistema de complemento, unen complejos inmunológicos y favorecen la permeabilidad vascular (Janeway y Bottomly, 1994).

La acción de los componentes del sistema linfoide durante la inflamación es más tardía, y se produce principalmente por la acción de los linfocitos (células B y T), que poseen muchas y variadas funciones, tales como la formación de anticuerpos durante la respuesta inmune adaptativa, la activación del sistema del complemento, o la síntesis y liberación de citoquinas. Los linfocitos se unen y activan el sistema del complemento, que es una cascada de proteínas solubles, las cuales son capaces de reconocer y destruir organismos patógenos. Este sistema induce además la degranulación de mastocitos y basófilos, favorece la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, y tiene una importante acción quimiotáctica, estimulando la migración de las células inflamatorias (Kirschfink, 1997). Las citoquinas también inducen la movilización y activación de leucocitos, activan la proliferación y diferenciación de linfocitos T y B, inducen la COX-2, la iNOS, moléculas de adhesión, etc. (Ihle, 1995). Entre las citoquinas destaca por su especial relevancia durante el proceso inflamatorio el factor de necrosis tumoral (TNF α), liberado por los macrófagos. Su papel principal es la amplificación de la respuesta inflamatoria, ya que induce la liberación de quimioquinas que favorecen la infiltración y activación de las células leucocitarias, y también la activación de la cascada pro-inflamatoria de otras citoquinas (interleuquinas: IL-1, IL-6, etc.; Feldmann y col, 1996). La interleuquina-1 (IL-1), una vez liberada a nivel del tejido inflamado, ejerce un papel fundamental en la inflamación, ya que también induce la expresión de COX-2 y de iNOS, e incrementa la liberación de neuropéptidos a partir de las terminales sensoriales y simpáticas; como consecuencia participa

en los fenómenos de *sensibilización* nociceptiva, facilitando además que se mantenga y prolongue la respuesta inflamatoria (Niissalo y col, 2001).

Figura 3. Acción de los mediadores pro-inflamatorios y pro-nociceptivos sobre los distintos componentes implicados en la respuesta inflamatoria.



Se muestran, de forma esquemática, los componentes y los distintos factores liberados localmente por la lesión tisular, y su interacción. IL: Interleuquina; PGs: prostaglandinas, 5-HT: serotonina; NGF: factor de crecimiento neuronal; TNF α : factor de necrosis tumoral (Modificado de Dray y Bevan, 1993).

3. SISTEMA OPIOIDE ENDÓGENO.

La lesión inflamatoria activa simultáneamente sistemas facilitadores e inhibidores que participan en el control de la respuesta inflamatoria y la transmisión nociceptiva. De esta forma, además de la activación de los mecanismos excitadores descritos anteriormente, la inflamación periférica induce también cambios en los mecanismos inhibitorios que modulan (inhibiéndola) esta respuesta. Entre ellos, el más importante es el sistema opioide endógeno (SOE), que está constituido por receptores opioides (RO) y transmisores, que por ser de naturaleza opioide se denominan péptidos opioides endógenos (POE). Este sistema regula la transmisión nociceptiva y la liberación de neurotransmisores excitadores tanto a nivel de la médula espinal como en el

ámbito periférico (Stein y col, 2001). El SOE se encuentra ampliamente distribuido en el organismo de los mamíferos y además de modular la transmisión nociceptiva (y posiblemente la inflamación periférica), participa en otras funciones del organismo (nerviosas o no) tales como el aprendizaje, la afectividad y la memoria, la actividad locomotora, la secreción neuroendocrina, funciones vegetativas, y respuestas inmunológicas, entre otras (Cabot, 2001; Schultz y Gross, 2001; Zubieta y col, 2001). La amplia distribución del SOE en el organismo, y su participación en diversas funciones fisiológicas, se refleja en el hecho que tras la administración sistémica de opioides, éstos se unen a los RO y como consecuencia inducen no sólo analgesia, sino que además pueden inducir de forma simultánea otros efectos, tales como rigidez torácica, depresión respiratoria, náuseas y vómitos, inhibición de la motilidad intestinal, etc. La administración de opioides induce también tolerancia y dependencia, que tienen diferentes características según la administración sea aguda (tolerancia aguda) o crónica (Nestler y col, 2001; Przewlocki y Przewlocka, 2001).

3.1. Péptidos opioides endógenos y receptores opioides.

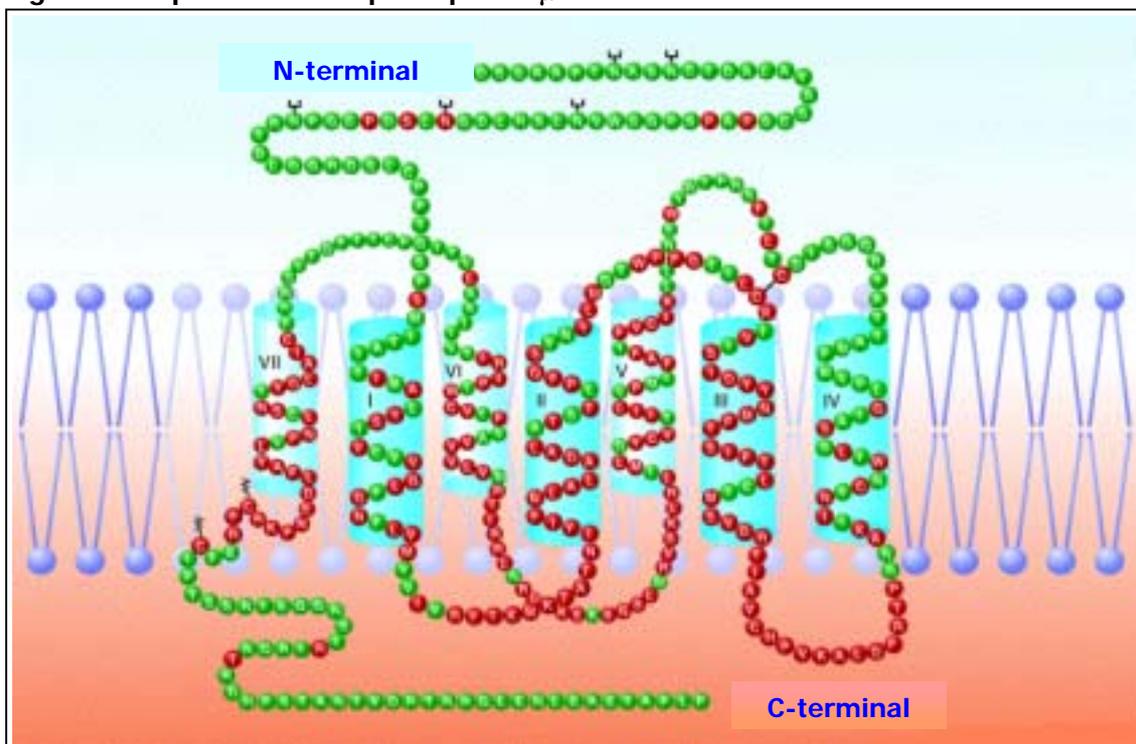
Inicialmente se identificaron tres familias genéticamente distintas de **péptidos opioides endógenos**: encefalinas, endorfinas y dinorfinas, cada una de ellas derivada de una proteína precursora diferente (pro-encefalina A, pro-opiomelancortina y pro-dinorfina), y que activan los receptores opioides δ (ROD), μ (ROM) y κ (ROK), respectivamente (tabla 1). Los péptidos derivados de las encefalinas, pero no de la pro-dinorfina, también pueden activar a los ROM. Posteriormente, se identificó la nociceptina, que es un péptido de 17 aminoácidos que posee un cierto parecido con la dinorfina, y en la actualidad se considera que es otro ligando endógeno de un nuevo subtipo de receptor opioide denominado ORL-1 (Meunier y col, 1995). Por otra parte, se ha caracterizado un nuevo grupo de posibles transmisores peptídicos denominados endomorfina, estructuralmente distintos a los POE y que se unen de forma selectiva a los ROM (Zadina y col, 1997). Otros péptidos endógenos que poseen acción sobre los ROM derivan de la leche (β -caseomorfinas) y de la cadena β de la hemoglobina (hemomorfinas) (Teschmacher y col, 1997; Zhao y col, 1997).

Tabla 1. Principales péptidos opioides endógenos.	
POE	Secuencia
β -endorfina	Tyr-Gly-GlyPhe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Lys-Gly-Glu
[Met-encefalina]	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
[Leu-encefalina]	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
Dinorfina A	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln
Dinorfina B	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr
α -Neoendorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys
β -Neoendorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro
Nociceptina	Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln
Endomorfina 1	Tyr-Pro-Trp-Phe-NH ₂
Endomorfina 2	Tyr-Pro-Phe-Phe-NH ₂

Actualmente se han descrito y clonado cuatro tipos de **receptores opioides** (RO), denominados δ , μ , κ y ORL-1 (Evans y col, 1992; Chen y col, 1993; Li y col, 1993; Mollereau y col, 1994). Cada uno de estos receptores está codificado por un solo gen, con distinta distribución cromosómica. En el ratón, el gen que codifica el ROM ha sido localizado en el cromosoma 10, y los que codifican para los ROD y ROK se encuentran en los cromosomas 4 y 1, respectivamente. La presencia alternada de intrones y exones en la secuencia de estos genes es lo que permite un *splicing* alternativo durante la transcripción génica, y como consecuencia, la formación de los distintos subtipos de RO descritos en la literatura (Pan, 2002). Las proteínas receptoras contienen entre 372 y 400 aminoácidos, y poseen diferentes pesos moleculares, debido a que sufren procesos de modificación post-traduccionales tales como glicosilación, palmitoilación, fosforilación, etc.; también se ha descrito que pueden formar dímeros o trímeros (por ejemplo, ROM / ROM), heterodímeros (ROM / ROD), o complejos con otros tipos de receptores tales como los β -adrenérgicos (Aley y Levine, 1997a; Law y Loh, 1999; Levac y col, 2002).

Los RO son miembros de la familia de proteínas que presentan siete dominios transmembrana y están acoplados a las proteínas G sensibles a la toxina de pertusis (figura 4). Los RO presentan un alto grado de homología estructural, principalmente en las regiones transmembrana segunda y tercera, así como en el primer lazo extracelular. Las regiones más divergentes son los extremos N-terminal (extracelular) y C-terminal (intracelular), y las zonas de los lazos segundo y tercero extracelulares, donde se produce la unión a los ligandos (exógenos y endógenos). La unión a las proteínas transductoras se realiza en los lazos 3-4 intracelulares. A pesar de las diferencias en el dominio N-terminal, los distintos tipos de RO tienen lugares similares de modificación post-traducciona, por ejemplo de glicosilación. Los receptores ORL-1 tienen una elevada homología con los demás RO, pero a pesar de ello los péptidos opioides convencionales tienen una baja afinidad por este receptor. Por su parte, la nociceptina, que sería el transmisor *putativo* para el ORL-1, muestra también una escasa afinidad por los demás RO (ROM, ROD, ROK) (Jordan y Devi, 1998).

Figura 4. Esquema del receptor opioide μ en la membrana celular.



Esquema tridimensional del ROM en la membrana celular. Se muestran en rojo los aminoácidos conservados entre los distintos receptores opioides; posibles lugares de glicosilación en el extremo N-terminal y de palmitoilación en el C-terminal; así como un potencial puente disulfuro entre dos loops extracelulares (modificado de Levac y col, 2002).

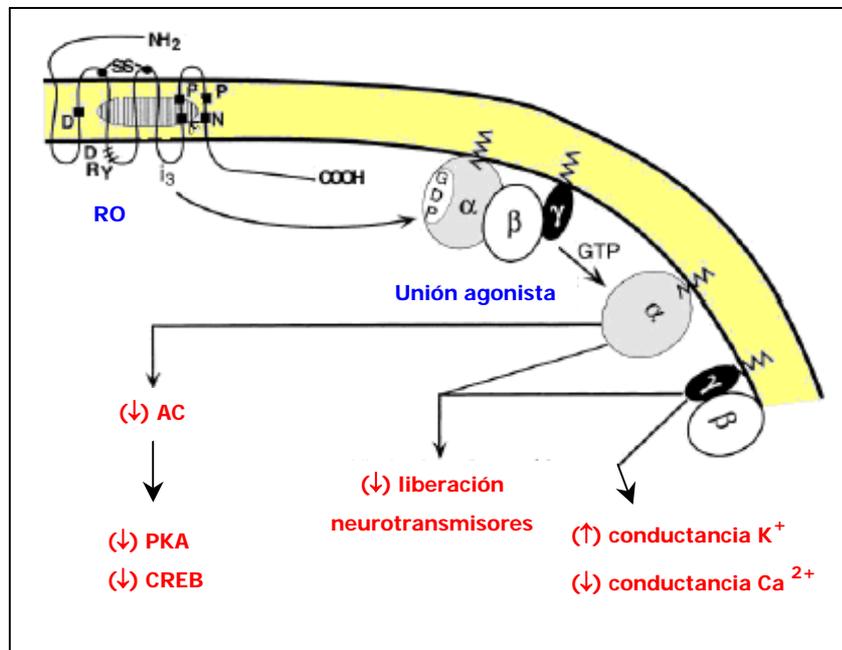
La caracterización molecular de los RO ha permitido estudiar su distribución anatómica con precisión. Los RO funcionales están ubicados en las membranas plasmáticas de células neuronales (y no-neuronales) y localizados a nivel pre, post y extra-sináptico. Están ampliamente distribuidos tanto en el sistema nervioso central como periférico, y su distribución varía en función del tipo / subtipo de RO. En las estructuras supra-espinales, los ROM se encuentran principalmente localizados en el caudado-putamen, el núcleo acumbens y el tálamo. Una densidad relativamente baja de ROM y ROD ha sido observada en la zona periacueductal, el locus coeruleus, la sustancia negra, el área ventral tegmental y los núcleos del rafe y del tracto solitario. La mayor densidad de ROD se encuentra localizada en el bulbo olfatorio, el caudado-putamen, el hipotálamo y el neocórtex. En la médula espinal, los RO están localizados principalmente en las láminas superficiales del asta dorsal, con variaciones en función del tipo de receptor. Por ejemplo, los ROM y ROK están principalmente localizados en las láminas I y II, mientras que su expresión es menor en las láminas III-VIII y muy escasa en la lámina IX. En cambio, los ROD, se expresan en gran proporción entre las láminas III-VIII y muy escasamente en las láminas I, II y IX. Finalmente, los RO también están ampliamente distribuidos en la periferia, tanto en el ámbito neuronal (GRD, terminaciones sensoriales y simpáticas, plexos mientérico y submucoso del intestino, plexos intramurales del conducto deferente, etc.) como extra-neuronal (células del sistema inmune, como macrófagos y linfocitos, médula suprarrenal, glándulas exocrinas, células del endotelio vascular y músculo liso) (Stein y col, 1995; Zhou y col, 1998; Przewlocki y Przewlocka, 2001; Pol y Puig, 2004).

3.2. Activación de los receptores opioides. Consecuencias moleculares.

La unión de un agonista opioide con su receptor puede inducir diversas respuestas, entre ellas la inhibición de la transmisión nociceptiva (efectos anti-nociceptivos) y la inhibición de la liberación de componentes pro-inflamatorios (efectos anti-inflamatorios). A escala celular existen múltiples sistemas efectores que se activan como consecuencia de la unión de un opioide al receptor. Los que están mejor caracterizados son: la inhibición de la enzima AC (con la disminución de los niveles de AMPc), el aumento de la conductancia del K^+ (activando canales que permiten la entrada del catión; GIRK, entre otros), el cierre de canales de

Ca^{2+} -voltaje dependientes y la inhibición de la liberación de neurotransmisores (excitadores y/o inhibidores) (figura 5; Williams y col, 2001).

Figura 5. Principales mecanismos después de la activación aguda de los RO.



Se muestran en la figura los principales efectores intracelulares, responsables de la inhibición de la transmisión nociceptiva, después de la activación de los RO por un agonista opioide (modificado de Williams y col, 2001).

La activación del RO por un agonista induce inicialmente el acoplamiento del receptor a las proteínas G, que tiene como consecuencia la transmisión o propagación de la *señal* por medio de distintos sistemas efectores, que incluyen la participación de segundos mensajeros (AC/AMPC, PLC, etc.). Las proteínas G son trímeros constituidos por las subunidades α , β y γ , que han sido clasificadas sobre la base de la subunidad α ; así por ejemplo la $G_{\alpha s}$ (aumenta el AMPC), $G_{\alpha i}$ (disminuye el AMPC e inhibe canales iónicos), $G_{\alpha q}$ (aumenta el IP_3 y DAG), etc. En condiciones basales, cuando el trímero está unido, las proteínas G son inactivas y la subunidad α tiene acoplada una molécula de GDP. Cuando el agonista se une al receptor, éste sufre un cambio de conformación e interacciona con la proteína G, de modo que la subunidad α intercambia un GDP por un GTP, provocando la disociación de las subunidades α y $\beta\gamma$, lo que permite su interacción con distintas proteínas efectoras intracelulares (Ulloa-Aguirre y Conn, 2003). Una vez realizada su función, la recomposición del trímero que constituye la proteína G

se realiza gracias a las proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G (RGS). Estas proteínas activan el metabolismo de GTP a GDP en la subunidad $G\alpha$ y permiten que ésta se una de nuevo al complejo $\beta\gamma$. De esta forma, se restaura la proteína G a su estado inicial, para que pueda ser activada de nuevo tras la interacción del RO con un agonista (Garzón y col, 2001).

De los sistemas efectores, el que está mejor caracterizado es el sistema de la adenilato ciclasa (AC), enzima que transforma el ATP en AMPc. El AMPc tiene distintas funciones intracelulares; entre ellas se une a las subunidades reguladoras de la proteína-kinasa A (PKA), permitiendo la liberación de sus subunidades catalíticas y por tanto activándolas. La PKA fosforila distintas enzimas citosólicas y también factores de transcripción nucleares (CREB). A corto plazo, la disminución del AMPc reduce la excitabilidad de las neuronas, especialmente cuando la vía está activada, es decir, durante la transmisión de una señal nociceptiva. También se produce un efecto más tardío sobre la transmisión, debido a que la disminución en la fosforilación de CREB impide a largo plazo la transcripción de genes de neuropéptidos excitadores (Atcheson y Lambert, 1994). Otro de los sistemas efectores que se activan después de la unión de un agonista al RO es el aumento de la conductancia del K^+ , que produce hiperpolarización de la membrana, reduce la duración de los potenciales de acción, e inhibe la descarga de los mismos por la neurona. Este mecanismo es particularmente efectivo si la neurona ha sido previamente despolarizada de forma repetida, como sucede durante la inflamación periférica. El efecto sobre los canales de Ca^{2+} -voltaje dependientes tiene como consecuencias la disminución de la entrada de este catión, cambios en el potencial de membrana y una disminución en la liberación de neurotransmisores excitadores, tales como el glutamato o la sustancia P (Jordan y Devi, 1998). Por último, en algunos tipos celulares donde predomina la subunidad $G\alpha_q$, la activación de los RO por agonistas comporta la activación de la fosfolipasa C (PLC). Esta enzima hidroliza fosfolípidos de membrana y genera dos moléculas, el diacilglicerol (DAG) y el inositoltrifosfato (IP_3), que se comportan como segundos mensajeros y tienen distintas funciones intracelulares. El DAG se une a un dominio alostérico de la enzima PKC, liberando y por tanto activando la subunidad catalítica. El IP_3 , por su parte, interacciona con receptores específicos situados en el retículo endoplasmático y las mitocondrias, donde se

encuentra Ca^{2+} almacenado, y lo libera al medio intracelular. El Ca^{2+} a su vez induce la liberación de neurotransmisores, activa la PKC, y estimula también otras proteínas a través de su unión con la calmodulina, que activa la AC, la síntesis de NO, etc. (Williams y col, 2001). Esta vía *excitadora*, sin embargo, no está bien caracterizada; podría estar implicada en los fenómenos de hiperalgesia inducida por opioides y/o en el fenómeno de tolerancia que aparece tras su administración aguda y crónica.

3.3. Activación del sistema opioide endógeno durante la inflamación periférica.

La activación del SOE durante la inflamación periférica podría ser un mecanismo fisiológico de "defensa" orientado a contrarrestar la acción de los distintos mecanismos *facilitadores* de la inflamación y la transmisión nociceptiva. De esta forma, ha sido demostrado que la inflamación periférica aumenta la expresión de pro-opiomelanocortina y pro-enkefalina, y como consecuencia de POE, en distintas células inflamatorias e inmunes (linfocitos, macrófagos, etc.) (Stein y col, 2001; Mousa y col, 2002). Entre los múltiples mediadores liberados durante la inflamación, la IL-1 y el factor liberador de corticotropina (CRF), serían los principales responsables de inducir la síntesis y liberación de POE en las células que infiltran los tejidos inflamados (Schäffer y col, 1997; Mousa, 2003). Es posible que la función de estos POE liberados durante la inflamación sea múltiple, aunque de momento no está bien caracterizada. Se ha postulado que los POE liberados localmente se unen a RO localizados en las fibras nociceptivas y disminuyen la excitabilidad de las neuronas, así como la liberación de neuropéptidos pro-inflamatorios y pro-nociceptivos (Przewlocki y Przewlocka, 2001; Puig y col, 2002). Además, los POE también podrían activar RO situados en las fibras simpáticas, el endotelio vascular, los macrófagos, linfocitos, etc., y como consecuencia disminuir la liberación de moléculas de adhesión, reducir el tráfico de células inflamatorias, disminuir la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como el $\text{TNF}\alpha$, etc. (Philippe y col, 2003; Walker, 2003).

Un hecho interesante que merece ser mencionado es que la inflamación periférica aumenta los efectos anti-nociceptivos y anti-inflamatorios de los agonistas opioides (morfina, etc.) administrados exógenamente (Stein y col, 2001). Este hecho se produce como

consecuencia de una *sensibilización* (inflamación aguda) o un aumento en la expresión de los RO (inflamación crónica), tanto en el ámbito central como periférico. En los últimos diez años ha podido ser demostrado que la densidad de RO en las terminaciones nerviosas periféricas no aumenta en los primeros estadios de la inflamación, sino solamente en estados avanzados de la misma (Schäfer y col, 1995; Brack y col, 2004). Sin embargo, la inflamación aguda induce una alteración del perineuro (vaina impermeable que recubre las fibras nerviosas periféricas), que facilita el acceso de los agonistas a los RO neuronales (Antonijevic y col, 1995). Este hecho está también favorecido por la disminución del pH del medio, que incrementa la eficacia de los opioides, al producirse un acoplamiento más efectivo de los RO con las proteínas G (Zhou y col, 1998). En presencia de inflamación crónica, los efectos inhibitorios de los opioides aumentan respecto a la aguda, pero en este caso el incremento en la expresión de RO funcionales sería el principal responsable del efecto observado (Brack y col, 2004). Distintos autores han demostrado que durante la inflamación crónica se produce un aumento en la expresión de RO localizados en los GRD (Zöllner y col, 2003), así como un aumento en el transporte de dichos RO desde los GRD hacia el tejido inflamado (Hassan y col, 1993; Mousa y col, 2001). Como consecuencia, aparece un mayor número de RO funcionales localizados en las terminaciones nerviosas periféricas (Mousa y col, 2002). También se ha demostrado que la lesión inflamatoria induce un aumento en la expresión de RO localizados en células inflamatorias e inmunes (Przewlocki y Przewlocka, 2001); estos hallazgos explicarían el incremento del efecto anti-nociceptivo y anti-inflamatorio de los agonistas opioides durante la inflamación periférica (Schäfer y col, 1995; Rittner y col, 2001).

4. TOLERANCIA OPIOIDE.

La tolerancia se define como una disminución del efecto producido por un determinado fármaco, que aparece después de su administración aguda o crónica. Numerosos estudios muestran que se desarrolla tolerancia a los efectos anti-nociceptivos de los opioides tras su administración continuada, de manera que se requieren dosis cada vez mayores para obtener el mismo efecto (Honoré y col, 1997; Smith y col, 1999; Bohn y col, 2002). Aunque es fácil de describir y caracterizar desde un punto de vista de comportamiento nociceptivo, el fenómeno de

la tolerancia opioide es muy complejo, y sus mecanismos no han sido establecidos de forma definitiva. Una de las razones es la dificultad para comparar los resultados de los distintos trabajos. Destaca el hecho que existen múltiples protocolos de inducción de tolerancia (ruta / periodicidad / duración de la administración de los fármacos opioides), que suponen un inconveniente a la hora de comparar los resultados obtenidos por los distintos autores. Entre los muchos trabajos publicados, tienen especial relevancia aquellos que investigan la tolerancia opioide a nivel celular, es decir, las modificaciones que ocurren a nivel de los RO y su acoplamiento con las proteínas G, así como en las cascadas de señalización intracelular y los cambios a nivel génico (Nestler y Aghajanian, 1997; Williams y col, 2001). Por otra parte, existen multitud de trabajos que valoran los cambios que produce la administración de opioides sobre las sinapsis y las redes neuronales, estudios que muestran los efectos de los opioides específicamente sobre los sistemas neuronales de transmisión nociceptiva. En la actualidad ha podido ser establecido que los opioides administrados de forma crónica inducen un incremento en la liberación de neurotransmisores y de la excitabilidad neuronal, que conlleva la activación de receptores NMDA, de la PKC, la síntesis de NO y de prostaglandinas, entre otros; como consecuencia se produce una disminución de los efectos anti-nociceptivos de los opioides, es decir, aparece tolerancia (Koob y Bloom, 1988; Zeitz y col, 2001; Mao y Mayer, 2001).

4.1. Efectos de la administración crónica de opioides a nivel celular.

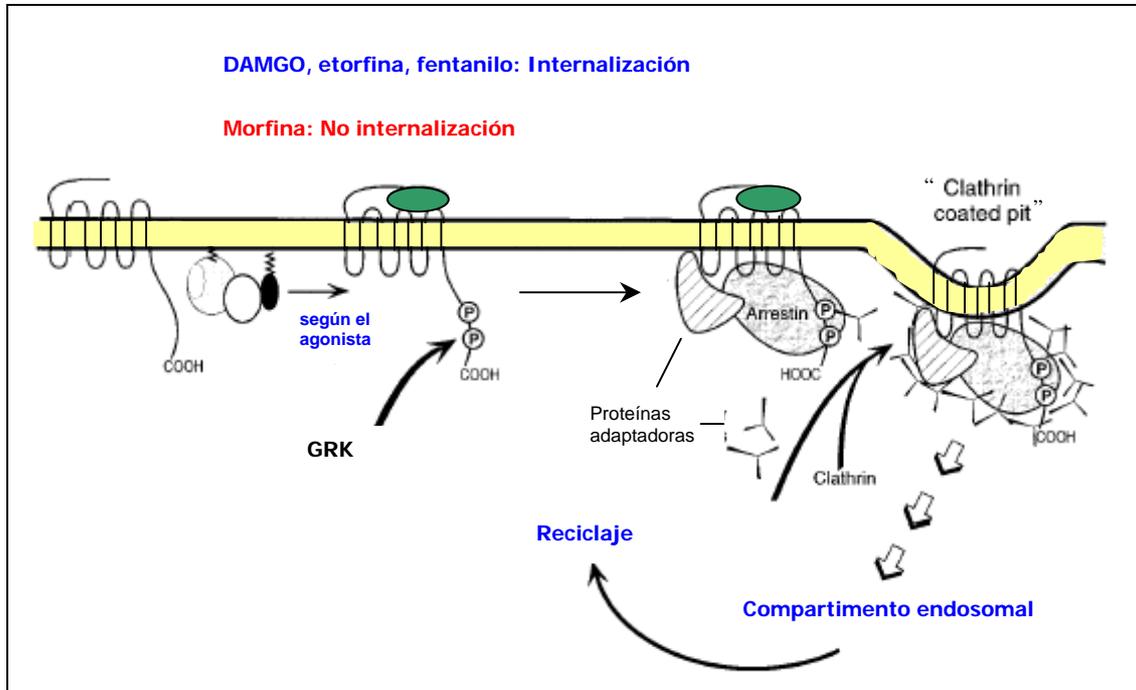
El primer nivel para explicar la tolerancia opioide (crónica) podríamos considerar que se encuentra en la **membrana celular**, a nivel de las alteraciones que se producen en los RO y las proteínas G asociadas a los mismos. Como ya se ha descrito anteriormente, la administración aguda de agonistas opioides estimula los RO que se acoplan a las proteínas G y como consecuencia se activan múltiples sistemas efectores y cascadas intracelulares. Algunos autores sugieren que tras interactuar con las proteínas G, los RO internalizan y posteriormente se reciclan. De forma resumida, los RO se fosforilan por medio de una proteína quinasa (GRK), lo que desacopla a los receptor de la proteína G e incrementa su afinidad por la proteína β -arrestina. Una vez unidos a la β -arrestina se adhieren distintas proteínas

adaptadoras, formando un complejo que es arrastrado a pozos revestidos de clatrina (*clathrin coated pits*), y a un compartimento endosomal. A este nivel, los RO sufren distintos procesos (poco conocidos), tales como defosforilación, para ser reciclados y expresados de nuevo en la membrana celular (re-sensibilización), o bien su paso a compartimentos lisosomales donde son destruidos ("*down-regulation*") (Ferguson y col, 2001; Williams y col, 2001; figura 6).

La internalización podría ser un mecanismo que permitiría explicar parcialmente el fenómeno de la tolerancia aguda (*taquifilaxia*), puesto que durante una fase transitoria disminuiría el número de receptores funcionales en la membrana celular. En cambio, la internalización seguida del reciclaje de los RO sería un mecanismo protector contra la tolerancia crónica, ya que son procesos que permiten restaurar la función normal de los RO, evitando que los receptores ocupados por los agonistas activen continuamente las cascadas de señalización que conducen a mecanismos adaptativos (Kieffer y Evans, 2002; He y col, 2002). Sin embargo, la administración crónica de morfina no produce la internalización de los ROM (Keith y col, 1996), e induce tolerancia opioide, puesto que los receptores permanecen activados en la superficie celular y la señalización se mantiene de forma ininterrumpida (Eisinger y col, 2002). Por otra parte, agonistas μ más eficaces, tales como el fentanilo, el DAMGO, etc., son capaces de inducir internalización de los ROM, y aparentemente inducen un menor grado de tolerancia opioide. También ha podido ser demostrado que la administración simultánea de un agonista μ que induce internalización (como el DAMGO), conjuntamente con la morfina, disminuye la aparición de tolerancia a ésta (que no induce internalización), aparentemente por una dimerización u oligomerización de los ROM (He y col, 2002). El hecho que distintos agonistas opioides μ posean distinta capacidad de activación e inducción de internalización de los ROM, ha conducido a que algunos autores propongan un parámetro predictivo de la capacidad de los distintos agonistas de inducir tolerancia opioide. Este parámetro se denomina RAVE (*relative agonist signalling versus endocytosis*) y valora la capacidad relativa de señalización (eficacia) del agonista *versus* su capacidad de inducir endocitosis (Whistler y col, 1999). La morfina tiene una elevada capacidad para activar las vías de señalización y sin embargo induce escasa internalización de los ROM, por lo que tendría un RAVE elevado que le conferiría un alto potencial para inducir tolerancia. Sin embargo el DAMGO, que combina una alta eficacia con

una buena capacidad de internalización tendría un RAVE bajo y por tanto un potencial menor de inducción de tolerancia (Kieffer y Evans, 2002).

Figura 6. Internalización y tráfico intracelular del ROM.



Se muestra una esquema de la secuencia de eventos que llevan a la internalización del receptor opioide μ . Algunos, pero no todos los agonistas opioides pueden activar esta vía (modificado de Williams y col, 2001).

A pesar de que existen diversos trabajos relacionados con la evaluación de la internalización inducida por distintos agonistas de los ROM, en la actualidad aún no se ha establecido definitivamente si la tolerancia opioide crónica tiene (o no) relación con los procesos de internalización. Hay autores que discrepan sobre el papel que desempeña la β -arrestina en los mecanismos de tolerancia opioide, y postulan que la regulación del tráfico intracelular de los RO depende de múltiples factores (ámbito celular, regiones del SNC, entre otros) y no es uniforme. En esta línea, estudios realizados en ratones deficientes (knockout) en β -arrestina muestran que en estos animales la tolerancia opioide se desarrolla de distinta manera según la región del SNC; no se desarrolla tolerancia supra-espinal, mientras que aparece tolerancia a la morfina a nivel espinal, pero retardada respecto a animales que sí poseen el gen de la β -arrestina (Bohn y col, 2000; 2002). Por otra parte, otros autores han demostrado que, tras la administración crónica de morfina, se produce un aumento en la expresión de proteínas

(GRK, β -arrestina, etc.) implicadas en los procesos de internalización (Eisinger y col, 2002). También hay trabajos donde se postula que la sobre-expresión de GRK durante la tolerancia a la morfina confiere, al menos en parte, capacidad a la β -arrestina para secuestrar al ROM e inducir su internalización (Zhang y col, 1998). Por tanto, e independientemente del agonista utilizado, de momento no se puede descartar la intervención del proceso de internalización, o alguno de sus componentes, en el desarrollo de tolerancia opioide.

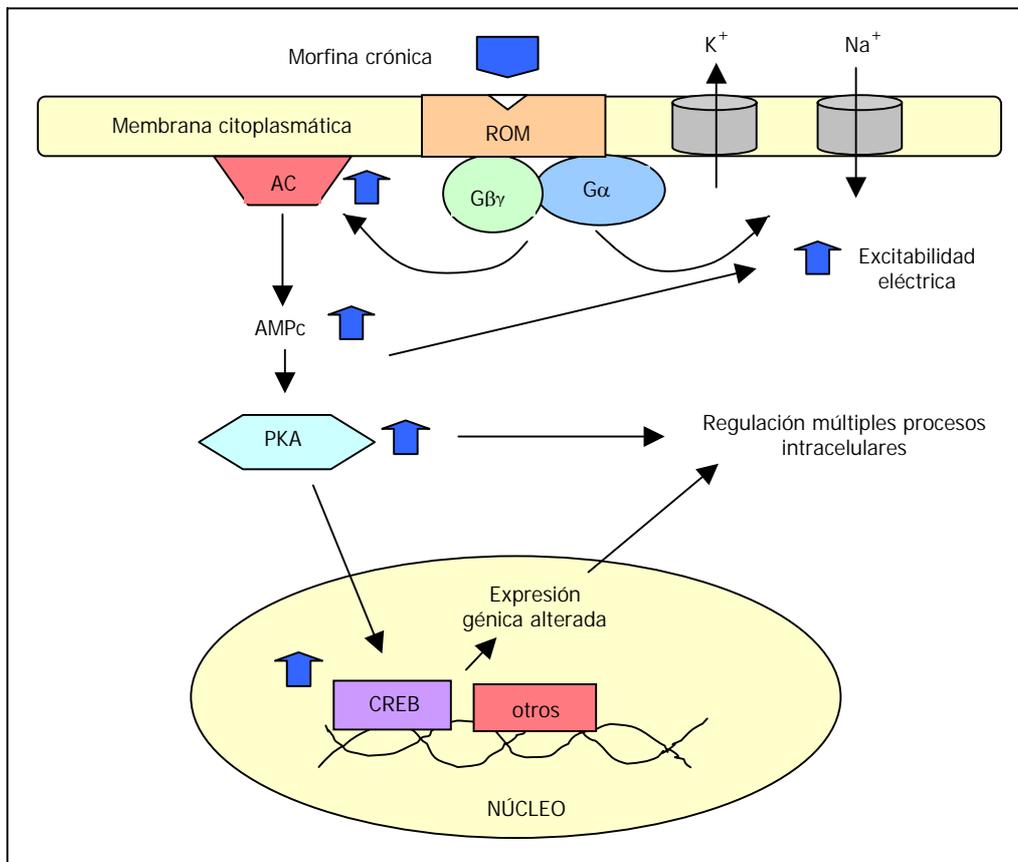
Otro mecanismo regulador de la tolerancia opioide a nivel de los receptores podría estar relacionado con las proteínas RGS (reguladoras de señalización de las proteínas G). Estas proteínas adaptan o sincronizan la activación de los RO por los agonistas y la regulación (positiva) de los sistemas efectores. Existe un subgrupo de RGS que tras la exposición crónica a opioides (tolerancia) permanecen asociadas a la subunidad $G\alpha$, impidiendo de esta forma la reasociación del trímero ($G\alpha\beta\gamma$) que constituye las proteínas G. En estas circunstancias, se retrasa la recuperación de la forma activa de la proteína G y como consecuencia la presencia de receptores funcionales (acoplados a las proteínas G) que puedan ser activados en presencia de un agonista (Garzón y col, 2001). Como la disociación del complejo de la proteína G inducida por un agonista es más rápida que su reasociación (por acción de las proteínas RGS), disminuye el "*pool*" de proteínas G disponibles para ser activadas (Sánchez-Blázquez y col, 2003). Durante la tolerancia opioide, aumenta también la expresión de la proteína fosducina, que se une a la subunidad $G\beta\gamma$, y también modifica la capacidad de reasociación del trímero (Schwartz y Holst, 2003). Estos desacoplamientos podrían explicar algunos de los mecanismos compensatorios que tienen lugar durante la tolerancia, ya que aunque los receptores (unidos o no a la β -arrestina) no pueden unirse a proteínas G, o en todo caso de forma limitada, la acción de la $G\alpha$ -GTP y del dímero $G\beta\gamma$ a nivel de los distintos efectores intracelulares se prolonga considerablemente (Garnier y col, 2003).

Los cambios observados tras la administración crónica de opioides en la superficie celular comportan modificaciones importantes en las **cascadas de señalización intracelular y en la regulación génica**. La activación continuada de los receptores opioides y sus sistemas efectores conduce a una respuesta celular compensatoria, que procura contrarrestar la

constante acción inhibitoria de los opioides. Este hecho permite explicar, por ejemplo, los fenómenos de dependencia opioide y de síndrome de abstinencia, que aparecen cuando se deja de administrar el fármaco. La aparición de hiperalgesia cuando se administra naloxona en animales tolerantes a la morfina es debida, en parte, a que desaparecen los efectos inhibidores de la morfina y se manifiesta la acción opuesta que balanceaba dichos efectos (Nestler y Aghajanian, 1997; Zeitz y col, 2001).

La adaptación molecular a la administración crónica de opioides mejor conocida es la "*up-regulation*" de la cascada de la AC/AMPC (figura 7). Como hemos descrito más arriba, la administración aguda de morfina inhibe la producción de AMPC, mientras que la exposición crónica conduce a una respuesta compensatoria, con un aumento de las concentraciones de AMPC, PKA y otros componentes de la cascada. La activación de la AC aumenta la excitabilidad neuronal; es posible que la persistencia de esta hiperexcitabilidad pueda resultar en una desensibilización o insensibilidad de las neuronas al efecto hiperpolarizante (anti-nociceptivo) de los opioides (Dunbar y Pulai, 1998). Los mecanismos a través de los cuales se produce el exceso de activación (sobre-activación) de la cascada del AMPC aún no se conocen con exactitud. La administración crónica de morfina activa selectivamente algunas isoformas de la enzima AC; se ha sugerido que este efecto es debido al aumento ("*up-regulation*") en la expresión del factor de transcripción CREB (por un mecanismo auto-regulador), como respuesta a la inhibición persistente de la vía del AMPC (Lane-Ladd y col, 1997). Algunos autores también indican que mientras que normalmente los RO están acoplados a la enzima AC a través de la subunidad α de las proteínas G, durante la tolerancia hay una señalización aumentada por acoplamiento a la subunidad $\beta\gamma$. Las isoformas activadoras de la enzima AC podrían interactuar preferentemente con la subunidad $\beta\gamma$ de las proteínas G (Chakrabarti y col, 1998 y 2001).

Figura 7. Efecto de la administración crónica de morfina sobre la cascada de señalización intracelular de la AC/AMPC.



Las flechas azules representan los principales efectos de la administración crónica de morfina sobre la vía de la AC/AMPC, desde la interacción con los ROM hasta los efectos en el núcleo celular. También se indican los efectos sobre la excitabilidad eléctrica alterando los canales catiónicos (modificado de Nestler y Aghajanian, 1997).

Otra cascada de señalización sobreactivada por la administración crónica de opioides es la vía de los fosfolípidos, mediada por la enzima fosfolipasa C (PLC) (Smith y col, 1999). La activación de la PLC, como se describió anteriormente, induce la formación de IP₃ y DAG, que actúan como factores de señalización intracelular (segundos mensajeros). Éstos, a su vez, estimulan la liberación de Ca²⁺ desde los depósitos intracelulares y disminuyen la conductancia del K⁺, activando la PKC que, como se ha descrito en el apartado de sistemas de transmisión nociceptiva, produce una sensibilización de las fibras nociceptivas y un incremento de la intensidad y duración del estímulo frente a descargas posteriores (Millan, 1999). La vía de la MAPK también puede ser activada por la PKA, y en aquellos casos en los que los receptores opioides se internalizan por el complejo endosomal. La actividad de la MAPK tiene como

consecuencia la fosforilación de múltiples dianas en el citosol y el núcleo celulares, por ejemplo factores de transcripción tales como CREB (Ulloa-Aguirre y Conn, 2003).

La actividad prolongada de los mediadores intracelulares conduce por tanto a cambios a nivel génico y al fenómeno de plasticidad neuronal, que tienen un papel fundamental en los cambios adaptativos a largo plazo que se producen debido a la exposición crónica a opioides (Williams y col, 2001; Fabian y col, 2002). Las vías de la PKA, PLC, MAPK, etc., que se encuentran activadas durante la tolerancia opioide, influyen en la transcripción génica. Por ejemplo a través del factor de transcripción CREB, que como ya se ha descrito regula la expresión de distintos genes en el núcleo (Lane-Ladd y col, 1997). El papel relevante del CREB en el desarrollo de tolerancia opioide ha sido descrito recientemente por diversos autores: por una parte ha sido demostrado un aumento en la expresión de CREB en los GRD de animales tratados crónicamente con morfina (Ma y col, 2001), y por otra, ratones deficientes para el gen que codifica este factor muestran una reducción del síndrome de abstinencia (Maldonado y col, 1996). El CREB, la vía de la MAPK o de la PKC promueven la transcripción de otros genes de inducción temprana tales como el c-fos o jun-B, capaces de activar determinados factores de transcripción, como el AP-1, regulador de la expresión génica de los RO, entre otros (Shoda y col, 2001; Börner y col, 2002). Durante la tolerancia opioide también se ha observado la acumulación de otras proteínas como las FRAs (antígenos relacionados con Fos), que aunque se desconocen sus dianas génicas, son candidatas para explicar los procesos de adaptación relacionados con el comportamiento adictivo (Li y Clark, 1999; Nestler, 2001). En resumen, podríamos afirmar que los efectos de la administración crónica de opioides sobre la expresión génica no están bien establecidos. Así por ejemplo y respecto a la expresión de RO, existen resultados contradictorios referentes a los efectos de la exposición crónica a opioides, puesto que existen trabajos que muestran una disminución de dichos RO (Chichewitz y col, 2001), un aumento (Fabian y col, 2003) o bien que la expresión de RO permanece inalterada (Castelli y col, 1997).

4.2. Efectos de la administración crónica de opioides sobre los sistemas de transmisión nociceptiva.

Los mecanismos celulares y moleculares implicados en la aparición de tolerancia a los opioides son complejos y no se conocen con exactitud. Hemos destacado anteriormente el hecho que la señalización sostenida por la acción continuada de los opioides es contrarrestada por mecanismos de compensación, como la sobre-expresión e hiperactividad de la AC, que aumenta la excitabilidad eléctrica y provoca una cierta insensibilidad de las neuronas al efecto anti-nociceptivo de la morfina. Nos centraremos en este apartado en revisar brevemente los mecanismos adaptativos que tienen lugar a nivel de la médula espinal, donde las fibras aferentes primarias hacen sinapsis con las neuronas de segundo orden, puesto que los cambios que suceden a nivel supra-espinal no están actualmente establecidos. Diversos trabajos demuestran que la manipulación farmacológica de algunos de los mecanismos implicados en la transmisión nociceptiva puede modificar la tolerancia opioide. Inhibidores de la síntesis de NO y prostaglandinas, antagonistas de los receptores NMDA, o la inhibición de la actividad de la enzima PKC, son capaces de atenuar la aparición de tolerancia opioide (Trujillo y Akil, 1991 y 1994; Powell y col, 1999; Zeitz y col, 2001; Smith y col, 2003).

El papel de los receptores NMDA en la tolerancia opioide ha sido ampliamente estudiado, y se cree que es un mecanismo necesario para su mantenimiento, ya que estos receptores participan en los fenómenos de plasticidad neuronal en las sinapsis de la médula espinal (Tiseo y Inturrisi, 1993; Trujillo y Akil, 1995). Desgraciadamente, de momento, no han podido ser establecidos los mecanismos mediante los cuales se inicia la activación de los receptores NMDA que en fases posteriores conducen a la neuroplasticidad. Una hipótesis reciente postula que existe un nivel homeostático de glutamato extracelular, estrictamente regulado por transportadores específicos (GT); la administración crónica de morfina induciría una disminución de estos GT, incrementando los niveles de glutamato extracelular, que actuaría activando los receptores NMDA espinales a nivel post-sináptico (Mao y col, 2002). Por otra parte, algunos autores han demostrado un aumento en la liberación de neurotransmisores excitadores (glutamato, etc.) a partir de las fibras aferentes primarias, que estaría relacionado

con los cambios inducidos por la administración crónica de opioides sobre la excitabilidad celular y la sensibilización de las fibras nociceptivas (Williams y col, 2001).

La activación de los receptores NMDA tiene como consecuencia un incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, que entre otras funciones *transloca* (del citosol a la membrana) y activa, la PKC. Por otra parte, la PKC se activa también por la administración crónica de opioides, a través de la cascada (sobreactivada) de la PLC descrita anteriormente. Los efectos de la PKC son, entre otros, activar precisamente los receptores NMDA mediante el desbloqueo de los canales de Ca^{2+} ocupados por Mg^{2+} ; por tanto, se favorece la eficacia sináptica glutamatérgica por un proceso de retroalimentación positiva (Mao y Mayer, 2001). Esta sobreactivación de la PKC puede tener consecuencias excito-tóxicas e incluso producir la muerte neuronal, a causa de un exceso de Ca^{2+} intracelular. Se ha demostrado que las células afectadas en el ADME son principalmente interneuronas inhibitorias, de tal forma que como resultado se origina un proceso de desinhibición de la nocicepción e hiperexcitabilidad neuronal (Mayer y col, 1999). Podemos afirmar, por tanto, que la PKC contribuye de manera inequívoca a la sensibilización latente de las neuronas / circuitos neuronales que se produce en relación con la administración crónica de morfina (Zeitz y col, 2001; Bohn y col, 2002; Smith y col, 2003).

En la médula espinal, el resultado de la activación de los receptores NMDA y de la PKC, por acción directa o indirecta de la administración crónica de opioides, es un aumento de la actividad de la enzima iNOS, que media la síntesis de NO, con distintas funciones pro-nociceptivas que se han revisado anteriormente. Una de ellas es la activación de la síntesis de prostaglandinas, que participan en el fenómeno de la hiperalgesia y reducen los umbrales nociceptivos de las neuronas. Se ha demostrado que inhibidores de la síntesis de NO atenúan e incluso revierten el desarrollo de tolerancia (Kolesnikov y col, 1993; Cha y col, 2003). De forma similar, la administración de inhibidores de la COX también inhibe y previene (parcialmente) la aparición de tolerancia opioide (Powell y col, 1999; Hernández-Delgadillo y col, 2003). Estos hechos muestran que la inhibición de ciertos mecanismos que modulan directa o indirectamente el procesamiento de la información nociceptiva, conlleva un aumento de los efectos anti-nociceptivos de los opioides, es decir, se revierte o disminuye la aparición de tolerancia opioide.

En conclusión, la activación de los sistemas facilitadores de la transmisión nociceptiva es uno de los componentes implicados en el desarrollo de tolerancia opioide, pudiendo considerarlo como un mecanismo de antagonismo fisiológico a la analgesia opioide (Hsu y Wong, 2000).

Cabe comentar que las interacciones entre los distintos sistemas no son sencillas. Algunos autores proponen que la activación prolongada de los sistemas pro-nociceptivos también se ve opuesta por contra-adaptaciones isodireccionales con los efectos iniciales (inhibitorios) de los opioides; se trata por tanto de un proceso dinámico, en el que se producen cambios a largo plazo a nivel génico que incluyen, entre otros, un incremento en la síntesis de POE (Larcher y col, 1998; Celérièr y col, 2001). Por otra parte, se ha descrito que en los procesos adaptativos que aparecen después de la administración crónica de opioides intervienen otros factores y sistemas, tales como la liberación de citoquinas pro-inflamatorias en la médula espinal, el aumento de la actividad de sistemas anti-opioide endógenos (CCK, dinorfina, nociceptina) y/o la activación de mecanismos supra-espinales descendentes que facilitan la transmisión nociceptiva y la aparición de tolerancia a los efectos anti-nociceptivos de los opioides (Kest y col, 2001; Vanderah y col, 2001; Wang y col, 2001; Raghavendra y col, 2002; DeLeo y col, 2004).

4.3. Tolerancia opioide en presencia de inflamación.

La revisión de los mecanismos implicados en el desarrollo de tolerancia opioide y la inflamación periférica, ha permitido postular que dichos fenómenos comparten vías de señalización intracelular y de transmisión de la información nociceptiva (tabla 2; Mao y col, 1995; 2001). De especial interés es que tanto la hiperalgesia inducida por el daño tisular (inflamación), como la observada después de la exposición crónica a los opioides, son debidas a una sensibilización neuronal relacionada con la excesiva y prolongada activación de los receptores de aminoácidos excitadores y la activación de las consecuentes cascadas intracelulares. Algunos autores proponen un modelo donde los receptores NMDA y los RO están situados en las mismas neuronas nociceptivo-específicas de la médula espinal, de manera que las mismas neuronas serían responsables de los fenómenos de hiperalgesia y tolerancia opioide. Esta hipótesis se mantiene sobre la base que ambos fenómenos pueden ser inhibidos o

parcialmente bloqueados mediante la administración de antagonistas de los receptores NMDA (Mao y Mayer, 2001). Igualmente, estos antagonistas también reducen la tolerancia a la morfina a nivel periférico (Kolesnikov y col, 1996 y 1999), hecho que tiene especial relevancia, puesto que ha sido demostrado que la hiperalgesia (inducida tanto por la inflamación como por la administración crónica de opioides) es un fenómeno en el que participan componentes periféricos y centrales (Aley y col 1997b; Dunbar y Pulai, 1998).

Cabe comentar, sin embargo, que existe otra línea de opinión que sugiere que la activación del SOE durante la inflamación podría atenuar, e incluso prevenir, el desarrollo de tolerancia opioide, especialmente en el ámbito periférico. Un argumento que se esgrime a favor es que los RO expresados a nivel periférico, durante la inflamación, no desarrollan tolerancia a los efectos de los POE liberados de forma intermitente (pulsátil) por las células inmunes que infiltran el tejido inflamado (Stein y col, 1996 y 2001). Sin embargo, aunque hay cierta controversia al respecto, la mayoría de estudios muestran que la administración crónica de morfina en presencia de inflamación induce la aparición de tolerancia, tanto en el ámbito central como periférico (Honoré y col, 1997).

Tabla 2. Principales mecanismos que aparecen durante la inflamación periférica y durante la tolerancia opioide.	
↑	excitabilidad neuronal.
↑	liberación de neurotransmisores, citoquinas pro-inflamatorias, péptidos anti-opioides endógenos (CCK, nociceptina, dinorfina).
↑	activación receptores NMDA, PKC, Ca ²⁺ intracelular.
↑	producción NO y prostaglandinas a nivel neuronal.
↑	cascadas de señalización intracelular (AC/AMPC, PLC, MAPK).
↑	factores de transcripción (CREB, etc.).
↑	expresión RO ??

A pesar de la estrecha relación que existe entre los eventos inducidos por la inflamación y la administración crónica de opioides, todavía no se han establecido de forma definitiva las características de la aparición de tolerancia opioide durante los procesos inflamatorios periféricos. Si bien la mayoría de estudios indican que se desarrolla tolerancia opioide en presencia de inflamación periférica, el problema reside en establecer si la inflamación tiene (o no) algún efecto sobre la tolerancia, acelerando / acentuando su aparición, o bien reduciéndola. Entre los trabajos publicados al respecto, algunos autores muestran que la presencia de inflamación no modifica el desarrollo de tolerancia a la morfina (Wei y col, 1997; Honoré y col, 1997), mientras que otros demuestran que la inflamación facilita e incluso aumenta el desarrollo de tolerancia a los efectos anti-nociceptivos de la morfina (Kayser y Guilbaud, 1986; Gutstein y col, 1995; Li y col, 1999). Por otra parte, hay autores que postulan que si aumenta el número de RO (producto de la inflamación periférica), aumenta también la tolerancia a la morfina, ya que existe una mayor sobreactivación de las cascadas intracelulares acopladas a los ROM (He y col, 2002). Los resultados de la mayoría de estudios, por tanto, indican que probablemente la tolerancia opioide presenta unas características distintas en presencia o ausencia de inflamación periférica.

En el presente trabajo, estudiamos las características del desarrollo de **tolerancia a la morfina**, inducida en **ratones** a los que previamente se les ha producido una **inflamación monoarticular** mediante la inyección subplantar de **CFA** (*complete Freund's Adjuvant*). Este modelo pretende reproducir la situación clínica en el hombre, en la que se administran opioides por vía sistémica durante el tratamiento de enfermedades osteoarticulares crónicas. En el modelo murino, hemos estudiado si la aparición de tolerancia opioide sigue procesos diferentes en presencia y ausencia de inflamación periférica, con el fin de investigar los posibles mecanismos implicados. El modelo animal utilizado es una modificación del descrito inicialmente por Pearson (1956), y que consiste en la inyección en una de las extremidades posteriores del animal de una suspensión de *Mycobacterium tuberculosis* (Larson y col, 1986). La tolerancia a la morfina se ha inducido mediante la implantación de un comprimido (*pellet*) subcutáneo de

morfina, que libera el fármaco de forma continua (Way y col, 1969) e induce tolerancia (Li y col, 2001; Bohn y col, 2002).

En este modelo se han estudiado tres aspectos básicos, para evaluar los efectos de la administración crónica de morfina en presencia de inflamación periférica. De esta forma, se han establecido los efectos de la administración crónica de morfina sobre: a) el comportamiento nociceptivo y la inflamación; b) los efectos anti-nociceptivos y anti-inflamatorios de la administración aguda de morfina (desarrollo de tolerancia); y c) los cambios inducidos en la expresión proteica de ROM.

El principal objetivo de este estudio fue caracterizar un modelo de tolerancia a la morfina en presencia de inflamación monoarticular en ratón. Nuestra hipótesis de trabajo postula que la aparición y desarrollo de tolerancia opioide en presencia de inflamación periférica presenta unas características específicas, distintas a cuando la administración crónica de morfina se realiza en ausencia de inflamación. Los objetivos concretos del trabajo se exponen a continuación:

- 1- Estudiar los efectos de la inyección subplantar de CFA, administrada para inducir monoartritis, sobre el comportamiento nociceptivo, la respuesta inflamatoria local y el estado general de los animales.
- 2- Determinar los efectos de la administración subcutánea de morfina sobre la nocicepción, en condiciones control y durante la inflamación por CFA.
- 3- Estudiar el nivel de implicación del componente periférico (en contraposición al central) en la respuesta anti-nociceptiva de la morfina durante la inflamación. Evaluar el papel del sistema opioide endógeno durante la inflamación periférica mediante la administración subcutánea de antagonistas opioides μ específicos.
- 4- Determinar los efectos de la administración subcutánea de morfina sobre la extravasación de plasma durante la inflamación inducida por CFA. Asimismo, estudiar los efectos de la administración subcutánea de antagonistas opioides μ específicos.
- 5- Establecer los efectos de la implantación de un comprimido de morfina subcutáneo, en ausencia y en presencia de inflamación, sobre la respuesta inflamatoria, la nocicepción, y el estado general de los ratones.
- 6- Determinar los efectos anti-nociceptivos y anti-inflamatorios de la administración aguda de morfina en animales tolerantes, en presencia y ausencia de inflamación periférica.

- 7- Determinar si la inflamación monoarticular y/o la tolerancia a la morfina alteran la expresión de ROM localizados tanto en el sistema nervioso central (médula espinal) como en tejidos periféricos (ganglios de la raíz dorsal y almohadilla plantar).

1. Animales y estabulación.

Se utilizaron ratones machos Swiss CD-1, de pesos comprendidos entre 25 y 30 gramos, mantenidos en el estabulario en condiciones constantes de temperatura (22° C), humedad (60 %) y ciclo de luz / oscuridad (12h / 12h). Los animales tuvieron libre acceso a comida y a agua, y fueron utilizados cinco días después de su aclimatación a las condiciones del estabulario. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de nuestra Institución, y de acuerdo con las normas de la Comunidad Europea sobre uso y cuidado de animales de experimentación.

2. Inducción y evaluación de la inflamación.

La inflamación monoarticular fue inducida mediante la administración subplantar, en la pata posterior derecha, de 30 µl de adyuvante de Freund (CFA: 0.1% *Mycobacterium tuberculosis* inactivo por calor, disuelto en un 85% de aceite de parafina y un 15% de monooleato de manida; Sigma Aldrich Co, St Louis, USA), según el método descrito por Larson y col (1986). La pata contralateral (no inyectada) se utilizó como control, después de comprobar que no presentaba diferencias significativas respecto a los animales no inyectados con CFA (ver resultados). Para evaluar la respuesta inflamatoria a lo largo del tiempo se estudiaron distintos grupos de animales, en los cuales se llevaron a cabo estudios conductuales a las 4 h, 4, 7 y 14 días después de la administración del CFA (ver figura 8). En cada momento de estudio se evaluaron parámetros relacionados con la inflamación (peso y diámetro de las patas, y extravasación de plasma), la nocicepción (plantar test y test de Randall y Selitto, para determinar la hiperalgesia térmica y mecánica, respectivamente; test de Von Frey, para evaluar la alodinia) y también el tránsito gastrointestinal. No se estudiaron los cambios inducidos por el CFA durante periodos más prolongados, puesto que la inflamación inducida por la dosis utilizada en nuestro protocolo empieza a desaparecer a partir de los 14 días. Las mismas valoraciones se realizaron en animales sin inflamación (no-inyectados).

Periódicamente (cada tres días, a la misma hora) se registraron: el peso del animal con una balanza electrónica, la temperatura corporal rectal utilizando un termómetro digital

(CheckTemp, Hanna Instruments, USA) y el diámetro de las dos patas (inflamada y contralateral) mediante un pie de rey (Fine Science Tools, Alemania). También se evaluaba el estado físico de los animales, registrando la apariencia del pelaje (liso y reluciente) y su comportamiento (postura, movilidad, agrupación).

3. Inducción y evaluación de tolerancia a la morfina en presencia de inflamación.

La inducción de tolerancia a la morfina se llevó a cabo según el método descrito por Way y col (1969), utilizando la implantación subcutánea de un comprimido (*pellet*) de 75 mg morfina base, que libera el fármaco de forma sostenida. Bajo anestesia con halotano, se esquilaba y posteriormente limpiaba la nuca de los ratones con una solución de povidona yodada (Betadine). Después de practicar una pequeña incisión, se implantaba el comprimido subcutáneamente y la piel se suturaba con hilo de seda. Como controles se utilizaron animales a los que se les implantaron comprimidos inertes (placebo: sin morfina), de aspecto idéntico a los de morfina. Para valorar el desarrollo de tolerancia a la morfina en presencia de inflamación, la implantación del comprimido de morfina se hizo cuatro días después de la inducción de la inflamación por CFA.

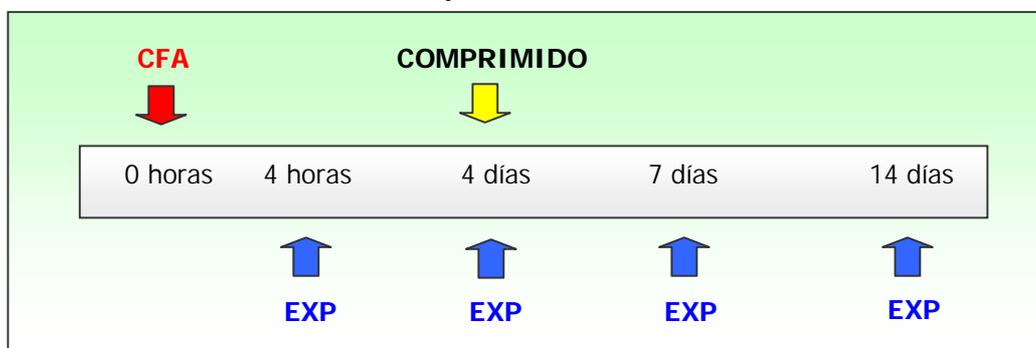
Con el fin de comprobar que la absorción de morfina a partir del comprimido inducía niveles plasmáticos elevados del opioide, en presencia y ausencia de inflamación, se determinó la concentración plasmática de morfina después de la implantación del comprimido, diariamente, durante un periodo de siete días. Para ello, en animales bajo anestesia con halotano se recogieron muestras de 80 μ l de sangre mediante una pipeta dispuesta sobre un corte en la cola, y los niveles de morfina en plasma fueron analizados por cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas (Solans y col, 1995). De forma resumida, las muestras de plasma se sometieron a una hidrólisis enzimática con β -glucuronidasa de *Helix Pomatia*, previa a su extracción en fase sólida. Como sistema de detección se utilizó un cromatógrafo de gases (HP5890, Hewlett Packard, USA) acoplado a un espectrómetro de masas (HP5973A, Hewlett Packard, USA). La separación cromatográfica se realizó en una columna de 5% de fenilmetilsilicona de 12 metros de longitud, 0.2 mm de diámetro interno y 0.33 μ m de

espesor de película, utilizando helio como gas transportador a 0.8 ml/min. La temperatura del horno varió desde 100° C a 290° C y el incremento de temperatura se llevó a cabo a razón de 20° C / minuto.

De forma cualitativa, la tolerancia a la morfina después de la implantación del comprimido fue evaluada mediante la administración de naloxona (10 mg/kg) subcutánea, estimando a continuación las distintas manifestaciones que aparecen durante el síndrome de abstinencia. En estos animales se valoró durante 30 minutos: la agitación, saltos compulsivos, pilo-erección, y la presencia de diarrea (Pol y Puig, 1997). Aunque posiblemente la dependencia y la tolerancia sean fenómenos dissociables y se produzcan por mecanismos distintos, la valoración de la dependencia es un buen indicador de tolerancia a la morfina (Bohn y col, 2000). Otro parámetro estudiado para obtener una medida cualitativa del desarrollo de tolerancia a la morfina fue la actividad locomotora. La hipermotilidad que aparece cuando se administran dosis elevadas de morfina se valoró usando una modificación del test de *holeboard*, que se describe más adelante. En animales implantados con el comprimido (de morfina o inerte) se llevaron a cabo experimentos similares, orientados a valorar la presencia de inflamación y el comportamiento nociceptivo.

Como resultado de estos experimentos, los efectos de la tolerancia opioide en presencia de inflamación monoarticular fueron realizados 3 días después de la implantación del comprimido, y a los 7 días de la inflamación por CFA (figura 8).

Figura 8. Diseño experimental del modelo de tolerancia a la morfina en presencia de inflamación monoarticular inducida por CFA en el ratón.



Se representan los tiempos de inyección del CFA y de implantación del comprimido de morfina o placebo, y los tiempos de evaluación según el modelo de estudio. CFA: administración subplantar de Complete Freund´s Adjuvant; COMPRIMIDO: implantación del comprimido de morfina o placebo; EXP: indica los tiempos de evaluación de los distintos parámetros de estudio (físicos y nociceptivos).

4. Parámetros conductuales.

4.1. Evaluación del tránsito gastrointestinal.

El tránsito gastrointestinal fue determinado de acuerdo con la metodología previamente descrita por nuestro grupo (Pol y Puig, 1997). Los ratones fueron mantenidos en ayunas con libre acceso al agua, durante las 18 horas previas al inicio del experimento. En este momento recibieron, por vía intragástrica, 0.25 ml de una solución de carbón vegetal (10% de carbón y 5% de resina de acacia en suero salino, Sigma Aldrich Co, St Louis, USA) mediante una cánula metálica. Los animales fueron sacrificados 20 minutos después por dislocación cervical, extrayendo a continuación el estómago y el intestino delgado. A continuación se midió la longitud total del intestino desde la válvula pilórica hasta la unión ileocecal, así como la distancia recorrida por el carbón. El porcentaje de tránsito gastrointestinal (% TGI) fue calculado como la distancia (cm) recorrida por el carbón dividida por la longitud total del intestino, multiplicada por 100:

$$\% \text{ TGI} = (\text{distancia carbón} / \text{longitud total}) \times 100$$

4.2. Determinación de la extravasación de plasma.

La extravasación de proteínas plasmáticas (debida a la inflamación inducida por el CFA) fue valorada utilizando una modificación de la técnica descrita por Udaka y col (1970), que se basa en la cuantificación del paso de azul de Evans (administrado por vía endovenosa) desde la sangre a la pata inflamada. Para realizar esta técnica, los ratones fueron anestesiados con halotano y a continuación inyectados en el plexo retroorbital con 50 mg/kg de azul de Evans (Sigma Aldrich Co, St Louis, USA), administrados en un volumen final de 0.1 ml. Para cada animal se utilizó una jeringa estéril de insulina acoplada a una aguja de 0.33 x 12.7 mm. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 15 minutos después de la inyección del azul de Evans. Inmediatamente, se procedió a amputar el pie y tobillo de ambas patas posteriores, efectuando el corte 0.5 cm por encima de la articulación tibiotarsal. Después de pesar las muestras fueron colocadas en tubos eppendorf de 1.5 ml, donde se incubaron en 1 ml

de formamida a 60° C durante 24 horas. A continuación, las muestras fueron filtradas y la concentración de azul de Evans extraído en el fluido se midió por espectrofotometría (Smart Spec 3000, Bio-Rad, USA) a una absorbancia de 620 nm. Los resultados se expresaron como unidades de absorbancia por gramo de tejido húmedo (UA/g), y corresponden a la cantidad de azul de Evans extraído en cada pata. Para determinar la extravasación, definida como el incremento neto de proteína plasmática que extravasa con relación al proceso inflamatorio, a la cantidad de azul extraído en la pata inflamada (CFA) se le restó el extraído en la contralateral (CTL):

$$\text{Extravasación (UA/g)} = \text{azul pata CFA} - \text{azul pata CTL}$$

Cuando se valoró el efecto inhibitorio de la morfina sobre la extravasación de plasma, el porcentaje de inhibición de la extravasación (ext) producida por el fármaco se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición extravasación} = [(\text{ext basal} - \text{ext fármaco}) / (\text{ext basal})] \times 100$$

4.3. Evaluación de la hiperalgesia térmica: plantar test.

El umbral nociceptivo a un estímulo térmico se determinó utilizando el *Plantar Test* (Plantar test 7371, Ugo Basile, Italia) según el método descrito por Sammons y col (2000) y basado en la técnica descrita por Hargreaves y col (1988). Para realizar este test, se colocaron los ratones sobre una base de vidrio separados por cubículos de metacrilato transparente y se aplicó debajo de una extremidad un foco de calor acoplado a un cronómetro electrónico. El cronómetro se activa cuando se inicia la emisión de calor y registra el tiempo que tarda el animal en retirar la pata (PWL= "Paw Withdrawal Latency"). Una vez colocados los animales en los cubículos, fue preciso esperar aproximadamente 2 horas, con el fin que se acostumbraran al entorno y de esta forma disminuir su actividad exploratoria (habitación). Para determinar el PWL de ambas patas traseras de un animal se calculó la media de 3 mediciones independientes para cada una, con un intervalo de al menos 5 minutos entre ellas. El tiempo máximo que se

permitió el contacto del foco de calor con la pata del animal (*cut-off*) fue de 15 segundos. En el caso de alcanzar tiempos superiores a 15 segundos se retiró el foco de la extremidad, para evitar posibles lesiones, asignando este valor a la pata en cuestión. La intensidad del estímulo (unos 40° C) se calibró para obtener una respuesta (PWL) en animales control de aproximadamente 7 segundos. En este test, el cálculo de la inhibición de la hiperalgesia térmica inducida por la morfina se calculó como porcentaje del efecto máximo posible (% MPE = % del Máximo Posible Efecto) que se obtuvo utilizando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ MPE} = [(PWL \text{ fármaco} - PWL \text{ basal}) / (\textit{cut-off} - PWL \text{ basal})] \times 100$$

4.4. Determinación de la hiperalgesia mecánica: test de Randall y Selitto.

La determinación de la hiperalgesia mecánica se realizó utilizando un analgesiómetro de presión (Letica 7306, Ugo Basile, Italia), según el método descrito por Dell'Antonio y col (2002), basado en la técnica descrita por Randall y Selitto (1957). Este test consiste en inmovilizar cuidadosamente a los ratones con la mano, a la vez que se aplica una presión gradual sobre la superficie dorsal de una pata mediante un pistón acoplado a un marcador electrónico. El marcador registra la presión a la cual se produce la respuesta nociceptiva del animal (PPT= *Paw Pressure Threshold*), que consiste en la extensión de los dígitos y/o un movimiento brusco de los mismos; ocasionalmente se produce también la vocalización del animal de forma simultánea. Para determinar el PPT de un animal se obtuvo el valor promedio de 3 mediciones que se realizaron con un intervalo de al menos 1 minuto entre ellas. En el caso de llegar a fuerzas superiores a 250 gramos (*cut-off*) se interrumpió la presión sobre la pata para evitar lesiones tisulares, asignando este valor a la pata en cuestión. El cálculo del efecto inhibitorio de la morfina sobre la hiperalgesia mecánica (% MPE = % del Máximo Posible Efecto) se realizó usando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ MPE} = [(PPT \text{ fármaco} - PPT \text{ basal}) / (\textit{cut-off} - PPT \text{ basal})] \times 100$$

4.5. Evaluación de la alodinia: test de Von Frey.

La evaluación de la alodinia se llevó a cabo utilizando los filamentos de Von Frey, según el método descrito por Chaplan y col (1994) (Semmes-Weinstein Touch test Sensory Evaluation, Stoelting North Coast, USA). En este test, los animales se colocaron dentro de un cubículo de plástico abierto dispuesto encima de una rejilla metálica, permitiendo el acceso de los filamentos a las extremidades. Tras 30 minutos de habituación al nuevo espacio, se aplicaron a las patas posteriores del animal (en orden ascendente de fuerza) los siguientes filamentos: 1.57 - 3.92 - 9.80 - 19.60 - 39.20 mN. Los filamentos se aplicaron alternativamente a cada pata posterior de forma perpendicular a la superficie plantar durante aproximadamente 1 segundo, a intervalos de unos 5-10 segundos entre cada aplicación; cada filamento se aplicó 10 veces. Se consideró una respuesta positiva cualquier indicio de retirada de la pata por parte del animal. Los filamentos fueron aplicados progresivamente hasta llegar al filamento que provocara una respuesta máxima (100%), o por defecto al de máxima estimulación (39.20 mN). El porcentaje de respuesta para cada filamento fue calculado para cada pata y estos % representados gráficamente respecto al log de la fuerza de los filamentos. La presencia de alodinia se calculó como el valor del área bajo la curva (AUC) de dicha representación. El cálculo del efecto anti-alodínico de la morfina (%) se efectuó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = [(AUC \text{ basal} - AUC \text{ fármaco}) / (AUC \text{ basal})] \times 100$$

4.6. Determinación de la actividad locomotora: test de *holeboard*.

La actividad locomotora de los animales se determinó utilizando una modificación del test de *holeboard*. Para llevar a cabo este test se utiliza una plataforma dividida en varias áreas, dentro de las cuales hay agujeros donde los animales pueden introducir la cabeza. La movilidad se registra midiendo el nº de áreas que atraviesa el animal durante 4 minutos, considerándose una área atravesada cuando el animal tiene las cuatro extremidades dentro de ella. La conducta de exploración se valora registrando el nº de veces que el animal introduce la cabeza dentro de los agujeros (Galeotti y col, 1998). En nuestro experimento, sólo se evaluó la movilidad del animal, puesto que el test fue utilizado para establecer la presencia de hipermotilidad.

5. Determinación de la expresión del receptor opioide μ .

En el presente estudio se utilizó la técnica de Western blot para determinar los niveles proteicos del receptor opioide μ (ROM) en diferentes tejidos (almohadilla plantar, ganglios de la raíz dorsal y médula espinal) y condiciones experimentales. Específicamente, los niveles de ROM fueron determinados en animales control y durante la inflamación, así como en presencia y ausencia de tolerancia a la morfina. En primer lugar, se realizó la extracción y purificación de proteínas totales de membrana, separándolas después en un gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y transfiriéndolas posteriormente a una membrana de nitrocelulosa, donde la determinación de ROM se efectuó por inmunodetección y quimioluminiscencia.

5.1. Aislamiento de las muestras de los tejidos.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los tejidos rápidamente extraídos. El tejido plantar se obtuvo recogiendo, con una hoja de bisturí, el tejido comprendido en la superficie plantar desde las articulaciones de los dedos hasta el tobillo. Para aislar la médula espinal primero se esquiló el pelo del dorso y a continuación se separó la piel y el tejido subcutáneo hasta localizar la región lumbar (vértebras L4-L6) donde llegan las fibras aferentes sensoriales primarias de las extremidades posteriores. El tejido medular fue extraído utilizando unas pinzas. Una vez extraída la médula se separaron mediante un bisturí los segmentos ipsi y contralateral a la inflamación. A continuación, con unas tijeras se abrió el canal medular, y con unas pinzas se extrajeron los ganglios de la raíz dorsal (GRD) de los agujeros intervertebrales, tanto de la parte derecha (ipsi) como izquierda (contralateral a la inflamación). Después de la extracción, todas las muestras fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta el momento de ser procesadas.

5.2. Extracción y preparación de proteínas totales de membrana.

Los tejidos fueron homogenizados en frío (Ultra-Turf T8.01, Ika Werke, Alemania), con un tampón a 4°C de la siguiente composición: Tris-HCl 50 mM en sucrosa 0.32 M a pH 7.5. Para separar las fracciones subcelulares del homogenizado se siguió el siguiente protocolo:

1) se centrifugó en frío (4° C) a 1000 x g, durante 10 minutos en un volumen de 5µl de tampón por cada mg de muestra; 2) se decantó el sobrenadante resultante y se centrifugó (4° C) a 20000 x g, durante 20 minutos; 3) el pellet se resuspendió en el tampón de Tris-sucrosa (mismo volumen) y se centrifugó de nuevo (4° C) a 20000 x g, durante 20 minutos; 4) el pellet final se diluyó también en el tampón de Tris-Sucrosa. Finalizada la separación se añadieron a cada muestra (aproximadamente las muestras pesaron unos 40 mg) 2 µl/mg de tampón de Laemmli (50 µl del agente reductor β-mercaptoetanol + 950 µl de una solución de Tris-HCl, SDS y glicerol). Se dejaron incubar las muestras a temperatura ambiente durante 3 horas, y finalmente fueron sometidas a un choque térmico de 100° C durante 5 minutos. Con el fin de separar los restos de membrana, se centrifugó la muestra a 20000 x g durante 10 minutos, y a partir del sobrenadante se prepararon las alícuotas para la separación por electroforesis.

Se utilizó una alícuota de 5 µl de cada muestra para calcular el contenido en proteínas de cada muestra, y determinar la cantidad (µg) de proteína a cargar en el gel de electroforesis. La concentración proteica se determinó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). La reacción se llevó a cabo utilizando 5 µl de muestra a la que se añadieron 795 µl de tampón fosfato (PBS) y 200 µl de *Dye Reagent* (Bio-Rad, USA), incubando la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se determinó la concentración proteica mediante espectrofotometría (absorbancia - 595 nm). Previamente se llevó a cabo un patrón, utilizando albúmina bovina (BSA), obteniendo una recta patrón a partir de la cual se calculó (por interpolación) la concentración proteica de la muestra.

5.3. Western blot.

La separación de las muestras se realizó por electroforesis en un gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) (10 % acrilamida en el gel separador), que permite separar las proteínas según su peso molecular (Laemmli, 1970). Se utilizaron aproximadamente 10µg por muestra de proteínas totales obtenidas del tejido plantar, y 40 µg de la médula espinal y de los GRD. Estas muestras fueron sometidas a electroforesis durante 4 horas, aplicando 100 V y 20-25 mA, (Hoeffer miniVe, Amershampharmacia Biosciences, Alemania). Como marcador de peso molecular se utilizó el *High Range Prestained SDS-PAGE Standards* (Bio-Rad, USA).

En una fase inicial, después de la electroforesis se llevó a cabo la tinción de proteínas con azul de Coomasie, para visualizar las bandas y comprobar que las condiciones eran las adecuadas para ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Una vez establecidas las condiciones óptimas del sistema de electroforesis, las proteínas fueron transferidas (Hoeffer miniVe, Amershampharmacia Biosciences, Alemania) desde el gel a la membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amershampharmacia Biosciences, Alemania) mediante la aplicación de 100 V (200-300mA) durante 2 horas. En este caso, el gel teñido con azul de Coomasie debía quedar completamente transparente, indicando la ausencia de proteínas y verificando la total transferencia de éstas desde el gel a la membrana.

Una vez realizada la transferencia, las membranas fueron primero bloqueadas, incubándolas con una solución de leche desnatada en polvo (2.5% en PBS) durante 24 horas a 4° C. Después fueron incubadas durante 3 horas (en agitación a temperatura ambiente) con un anticuerpo específico anti-ROM (anticuerpo frente al tercer *loop* extracelular del ROM; conejo anti-ROM de ratón, AB1562, Chemicon Intl, USA) diluido 1:4000 (para el tejido plantar), y 1:2000 (para la médula espinal y los GRD) en 1% PBS-BSA. A continuación las muestras fueron incubadas a 4° C durante 24h. Las membranas fueron lavadas cinco veces, durante 5 minutos con PBS, para eliminar el primer anticuerpo, y después incubadas con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa, en una dilución 1:2000 (cabra anti-IgG de conejo - *Horseradish Peroxidase Conjugated*, AP132P, Chemicon Intl, USA) durante 1h30', en agitación y a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron de nuevo las muestras 4 veces con PBS, durante 15 minutos cada lavado, para eliminar el segundo anticuerpo, y se llevó a cabo la determinación del ROM por quimioluminiscencia. Para ello se dispuso la membrana en una cubeta de vidrio y se añadió una solución que contiene luminol, que al reaccionar con la peroxidasa emite luz quimioluminiscente, que se detecta por autoradiografía. Las membranas fueron incubadas durante 5 minutos con la solución de detección (*ChemiLucent Western Blot Detection System 2600*, Chemicon Intl, USA) y colocadas en un *hypercassette* (Amershampharmacia Biosciences, Alemania), donde un *hyperfilm* ECL (Amershampharmacia Biosciences, Alemania) se expuso a la emisión quimioluminiscente durante 15-30 segundos. Para cada tejido, se llevaron a cabo controles negativos del Western blot, en los cuales se

pusieron todos los componentes excepto uno de los anticuerpos (primario o secundario), o bien se realizó el proceso sin la solución de detección.

Para determinar el peso molecular (PM) de las bandas obtenidas, las imágenes obtenidas en los *hyperfilms* fueron digitalizadas mediante el programa Adobe Photoshop 5.5. Se midieron las distancias recorridas por los marcadores de PM y se representaron gráficamente en función del log PM. Utilizando esta recta patrón y tras medir la distancia recorrida por la banda de ROM se pudo interpolar su peso molecular. La expresión de ROM fue cuantificada midiendo la intensidad de bandas, utilizando el programa Diversity Data Base 2.1.1. Con el fin de corregir las posibles diferencias debidas al proceso experimental, en cada membrana se procesaron muestras de referencia para cada tejido, de forma que se aplicó un factor de corrección a cada muestra, normalizando los resultados.

6. Grupos de experimentos.

6.1. Inducción y evaluación de la inflamación inducida por CFA.

Grupo 1: El efecto de la inflamación sobre los parámetros conductuales se valoró en grupos de 6-8 animales, a los que se inyectó CFA en la pata posterior derecha. Se registró el peso y la temperatura corporal de cada animal, así como el diámetro del tobillo. Seguidamente se llevaron a cabo las pruebas de comportamiento nociceptivo: en un subgrupo I de animales, se llevaron a cabo los tests de Von Frey y de Randall y Selitto, mientras que en el otro (subgrupo II) se valoró el plantar test. Los animales del subgrupo I se utilizaron también para determinar la extravasación de plasma en ambas patas, y los del subgrupo II, para evaluar el tránsito gastrointestinal (TGI). Debido a que tanto para la determinación de la extravasación como del TGI es necesario el sacrificio del animal, los efectos de la inflamación a las 4 h, y a los 4, 7 ó 14 días (figura 8), se estudiaron en grupos independientes de animales.

Grupo 2: Los valores basales de los parámetros conductuales estudiados fueron determinados en grupos de 6-8 animales control, es decir, sin la administración subplantar de CFA. También se estudió el efecto de la inyección de suero salino (SS), en grupos de 6-8

animales. Se utilizó el mismo protocolo conductual descrito anteriormente y los animales fueron evaluados a las 4 h, 4, 7 y 14 días de la inyección.

6.2. Efectos de la administración sistémica de morfina durante la inflamación.

Grupo 3: Los efectos de la administración sistémica de morfina durante la inflamación monoarticular sobre la extravasación de plasma, la nocicepción térmica (plantar test), mecánica (test de Randall y Selitto) y la alodinia (test de Von Frey), se valoraron en grupos de 6-8 animales tratados con CFA, en los diferentes tiempos de estudio (4 h, 4, 7 y 14 días desde la inyección del agente inflamatorio). Las dosis de morfina utilizadas fueron: 1, 3, 5, 7, 10, 30, 50, 100 mg/kg. Los mismos experimentos fueron realizados en animales que no recibieron CFA subplantar.

6.3. Efectos de la administración sistémica de antagonistas opioides μ específicos, durante la inflamación por CFA.

Grupo 4: Los efectos de la administración sistémica de antagonistas opioides μ específicos: naloxona (0.1 mg/kg) y naloxona metiodada (0.3 mg/kg), se valoraron en grupos de 6-8 animales con inflamación por CFA. Los antagonistas opioides fueron administrados 7 días después del CFA, evaluándose los siguientes parámetros: Von Frey, plantar test, Randall y Selitto, y extravasación de plasma.

Grupo 5: La reversión de los efectos anti-nociceptivos y anti-extravasación de la morfina se efectuaron en grupos de 6-8 animales siete días después del CFA (inflamación); en estos experimentos se administró conjuntamente una dosis de morfina y una de naloxona (NX), o bien de morfina y naloxona metiodada (NXME). Ambos tipos de experimentos (antagonismo por NX y NXME) se llevaron a cabo en la pata inflamada y en la contralateral, utilizando en cada caso la DE_{50} de morfina obtenida en los experimentos del Grupo 3, para cada test (y condición experimental) evaluado. Las dosis de naloxona y naloxona metiodada fueron siempre de 0.1 mg/kg y 0.3 mg/kg respectivamente, y los tests evaluados los mismos que en el Grupo 4.

6.4. Inducción y evaluación de tolerancia a la morfina.

Grupo 6: La caracterización de tolerancia a la morfina en animales con inflamación periférica se realizó en grupos de 6-8 ratones, a los que inicialmente se les inyectó CFA (día 0) y al cuarto día se les implantó subcutáneamente un comprimido de morfina o un comprimido inerte (placebo). Los diferentes parámetros físicos y conductuales (peso y temperatura corporal, peso de las patas, diámetro del tobillo, extravasación de plasma, hiperalgesia y alodinia) fueron evaluados 3 días después de la implantación del comprimido de morfina, es decir, después de 7 días de la inyección subplantar de CFA (figura 8). Estudios paralelos fueron realizados en animales sin inflamación y con la implantación de un comprimido de morfina o placebo.

6.5. Determinación de los niveles plasmáticos de morfina y dependencia a la morfina.

Grupo 7: Para determinar la cantidad de morfina liberada en plasma por el comprimido, durante 7 días, en animales sin y con inflamación (6 de cada), se recogieron muestras de plasma diarias para la posterior determinación de los niveles plasmáticos de morfina.

Grupo 8: En un nuevo grupo de animales, placebo y tolerantes (6 de cada), se comprobó la posible presencia de tolerancia al fármaco mediante la administración subcutánea de naloxona (10 mg/kg), observando la aparición de diarrea y de saltos compulsivos durante 30 minutos.

6.6. Efectos de la administración aguda de morfina subcutánea en animales tolerantes.

Grupo 9: Para estudiar los efectos de la morfina durante la inflamación y la tolerancia opioide, se utilizaron grupos de 6-8 animales con inflamación e implantados con un comprimido de morfina (tolerantes) o inerte (placebo). Siete días después de la inyección de CFA, se llevaron a cabo curvas dosis-respuesta a la morfina (rango de dosis 1-100 mg/kg), evaluando los mismos parámetros que en el resto de los experimentos.

Grupo 10: La valoración de los efectos de la administración sistémica de morfina sobre la actividad locomotora se efectuó en animales inyectados con CFA (inflamación) implantados

con un comprimido placebo o de morfina. Los experimentos (test de *holeboard*) se llevaron a cabo 7 días después de la inyección de CFA, utilizando 6-8 animales por dosis.

6.7. Efectos de la administración subplantar de morfina en animales placebo y tolerantes.

Grupo 11: Para estudiar los efectos de la administración local de morfina durante la inflamación y la tolerancia opioide se utilizaron grupos de 6-8 animales (con y sin inflamación), e implantados con un comprimido con (tolerantes) o sin morfina (placebo). En estos animales se valoraron los efectos producidos por la administración subplantar de 100 µg de morfina en el test de Randall y Selitto, tras 7 días de inflamación.

6.8. Determinación de la expresión de receptores opioides µ.

Grupo 12: Los efectos de la inflamación sobre los niveles proteicos de ROM se evaluaron en un grupo de 12 animales con inflamación monoarticular. El sacrificio y aislamiento de los tejidos fue realizado 7 días después del inicio de la inflamación. Para cada tejido se llevaron a cabo seis electrotransferencias, aplicando las diferentes muestras en cada una de ellas por duplicado. La expresión de ROM en condiciones basales (en ausencia de inflamación) fue establecida en un grupo de 12 animales control que no recibieron CFA.

Grupo 13: Los efectos de la tolerancia a la morfina en presencia de inflamación sobre la expresión de ROM se evaluaron en un grupo de 12 animales, que recibieron CFA subplantar y un comprimido de morfina subcutánea. El sacrificio y aislamiento de los tejidos se realizó 3 días después de la implantación del comprimido de morfina y tras 7 días de inflamación. Para cada tejido se realizaron 6 electrotransferencias, aplicando las distintas muestras por duplicado.

Grupo 14: Para estudiar los efectos de la inflamación sobre el desarrollo de tolerancia, los niveles proteicos de ROM fueron determinados en dos grupos de 12 animales a los cuales se implantó un comprimido de morfina o placebo, pero en ausencia de inflamación (sin la inyección de CFA).

7. Fármacos utilizados y vía / modo de administración.

Los fármacos que se utilizaron en este estudio fueron: morfina clorhidrato (Alcaiber S.A., España), (-)-naloxona clorhidrato (Sigma Chemical Co, St Louis, USA) y naloxona metiodada (Research Biomedical Inc, USA). El comprimido de morfina fue elaborado a partir de morfina base (Alcaiber S.A., España). El volumen de inyección subcutáneo fue de 10 ml/kg. Los fármacos se disolvieron en suero salino (cloruro sódico en agua al 0.9%). Se prepararon soluciones "stock" para dosis equivalentes a 10 y 100 mg/kg de morfina, 1 mg/kg de naloxona y 3 mg/kg de naloxona metiodada, a partir de las cuales se realizaron las diluciones en suero salino hasta obtener las dosis adecuadas. Las soluciones "stock" fueron congeladas a -40° C, siendo sólo descongeladas en el momento de realizar las diluciones correspondientes para los distintos experimentos; todas las diluciones procedieron de la misma solución "stock". Los fármacos administrados por vía subcutánea fueron inyectados en la base de la nuca del animal, con jeringas estériles (de 1 ml acopladas a agujas de 0.5 x 16 mm), 30 minutos antes del experimento. En los experimentos de administración local de morfina, ésta fue administrada por vía subplantar, 5 minutos antes del experimento.

8. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa estadístico SPSS (versión 11.5). El cálculo de la $DE_{50} \pm$ error estándar (EEM) se determinó por análisis de regresión lineal y/o curvilínea de las relaciones dosis-respuesta basadas en 6-8 animales por dosis. En este estudio, la DE_{50} se define como la dosis que produce un 50% del efecto máximo observado. La comparación individual entre dos grupos se efectuó mediante el test de la *t* de Student, mientras que la comparación entre múltiples grupos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor. En el caso de que el ANOVA mostrara diferencias estadísticamente significativas, se procedió a la comparación individual de los grupos mediante el test de comparaciones a posteriori de Student-Newman-Keuls. En todos los casos, valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. En cada grupo de experimentos se describe el tipo de análisis estadístico utilizado.

Los resultados obtenidos en este estudio se presentan en siete apartados que corresponden a las diferentes etapas secuenciales en las que se desarrolló el proyecto. Inicialmente (apartado 1) se **caracterizó la inflamación** monoarticular inducida por CFA, evaluando los efectos de la inyección del agente inflamatorio sobre la extremidad (edema, extravasación de plasma y respuesta nociceptiva), y también la posible aparición de cambios a nivel sistémico (cambios en el peso corporal, en la temperatura y en el tránsito gastrointestinal). Seguidamente (apartado 2) se valoró el efecto **anti-nociceptivo** de la administración sistémica de morfina durante la inflamación periférica y su reversión utilizando antagonistas opioides μ de acción central (naloxona) y preferentemente periférica (naloxona metiodada). En la tercera etapa (3) se estudió el efecto de la administración sistémica de morfina sobre la **extravasación de plasma** durante la inflamación periférica y su reversión por la administración de naloxona y naloxona metiodada. Definido el modelo inflamatorio, en la siguiente etapa (4) se caracterizó la aparición y desarrollo de **tolerancia a la morfina** durante la inflamación periférica, evaluando los mismos parámetros que en el apartado 1. A continuación (apartado 5), se valoraron los efectos de la **administración aguda de morfina** sobre la nocicepción y la extravasación de plasma en animales tolerantes a la morfina. En la etapa siguiente (6), se determinó el efecto de la **administración local de morfina** sobre la hiperalgesia, para evaluar si en el incremento de la potencia de la morfina (administrada por vía sistémica) observado en presencia de inflamación participan ROM periféricos, y a la vez valorar la funcionalidad de estos receptores en animales tolerantes. Por último (apartado 7), se determinó la **expresión de ROM** a nivel espinal y periférico (ganglios de la raíz dorsal y almohadilla plantar) con el fin de intentar establecer una correlación entre los resultados conductuales y la expresión de dichos receptores.

1. Inflamación monoarticular inducida por CFA.

La administración subplantar de CFA indujo una respuesta inflamatoria local, demostrada por la presencia de edema, extravasación de plasma, hiperalgesia y alodinia en la pata inyectada, al compararla con la pata contralateral. No se observaron cambios en el peso ni en la temperatura corporal de los animales.

1.1. Evolución del peso y la temperatura corporal de animales sin y con inflamación.

La evolución del peso corporal de los animales se valoró como medida indirecta de una posible afectación sistémica causada por la presencia de inflamación en la pata. La administración de CFA no alteró la evolución del peso corporal de los animales durante los 14 días posteriores a la inyección de CFA, de forma que el aumento de peso no difirió significativamente del registrado en animales sin inflamación (no inyectados, tabla 3); tampoco se observaron cambios significativos en los incrementos de peso en los distintos periodos de tiempo evaluados.

Tabla 3. Evolución del peso corporal en animales control e inyectados con CFA.				
Tiempo	0 días	4 días	7 días	14 días
No inyectados	28.2 ± 0.9	28.9 ± 0.8	30.1 ± 0.8	31.9 ± 0.8
Inyección CFA	27.7 ± 0.5	28.3 ± 0.6	29.4 ± 0.6	31.1 ± 0.5

Se muestra el peso corporal en gramos (media ± EEM) de los dos grupos de animales obtenidos en condiciones basales (0 días) y a los 4, 7 y 14 días desde el inicio del experimento. La comparación entre los dos grupos se realizó para cada tiempo de estudio. No se observaron diferencias significativas entre animales control (no inyectados) y aquellos que recibieron CFA ($P > 0.05$; test t de Student).

La evolución de la temperatura corporal tampoco presentó cambios significativos durante los 14 días posteriores a la inducción de la inflamación, siendo esta evolución similar entre animales sin y con la inyección de CFA (tabla 4).

Tabla 4. Evolución de la temperatura en animales control e inyectados con CFA.				
Tiempo	0 días	4 días	7 días	14 días
No inyectados	37.2 ± 0.1	37.2 ± 0.2	37.4 ± 0.2	37.3 ± 0.1
Inyección CFA	37.2 ± 0.2	37.4 ± 0.1	37.3 ± 0.1	37.2 ± 0.1

Se muestra la temperatura corporal en °C (media ± EEM) de los dos grupos de animales a los 0, 4, 7 y 14 días desde el inicio del experimento. La comparación entre los dos grupos se realizó para cada tiempo de estudio. No se observaron diferencias significativas entre los animales control (no inyectados) y los tratados con CFA ($P > 0.05$; test *t* de Student).

1.2. Efectos de la administración subplantar de CFA sobre el diámetro y el peso de las patas, la extravasación de plasma, y la respuesta nociceptiva (hiperalgesia y alodinia).

1.2.1. Efectos en la pata inyectada con CFA.

La inyección subplantar de CFA provocó una reacción inflamatoria local que aumentó la respuesta nociceptiva, desde las 4 horas hasta el final del periodo experimental (14 días). Los efectos del CFA en los distintos tiempos de evaluación fueron analizados mediante un ANOVA de una vía para medidas repetidas cuando se evaluó el diámetro de la pata, y para medidas independientes para el resto de parámetros. Los resultados muestran que la administración de CFA aumentó significativamente el diámetro y el peso de la pata inyectada, así como la extravasación de azul de Evans, a las 4 h, 4, 7 y 14 días desde el inicio del tratamiento ($P < 0.05$; test Student-Newman-Keuls). A los 14 días, el aumento en los distintos parámetros tendió a disminuir, aunque sólo de forma significativa cuando se evaluó el peso de las patas inflamadas (tabla 5). Al evaluar el componente nociceptivo se observó en todos los tiempos: hiperalgesia térmica (tiempos de latencia más bajos en el plantar test), hiperalgesia mecánica (los animales soportaron menor peso en el test de Randall y Selitto) y alodinia (aumentó el nº de respuestas, implicando valores más altos de AUC, en el test de Von Frey). El aumento observado en todos los parámetros tendió a disminuir a los 14 días, aunque sólo la alodinia lo hizo de forma significativa (tabla 6).

Tabla 5. Evolución del edema y extravasación de plasma en la pata inflamada (CFA).

Tiempo	Diámetro pata (mm)	Peso pata (mg)	Azul de Evans (UA/g)
0 horas	3.23 ± 0.02 ^a	185 ± 3.0 ^a	1.15 ± 0.14 ^a
4 horas	4.16 ± 0.02 ^b	278 ± 5.2 ^{b,c}	2.83 ± 0.31 ^b
4 días	4.23 ± 0.05 ^b	289 ± 4.3 ^{b,c}	2.07 ± 0.24 ^c
7 días	4.22 ± 0.04 ^b	300 ± 9.1 ^c	1.94 ± 0.13 ^c
14 días	4.19 ± 0.03 ^b	257 ± 4.7 ^b	1.66 ± 0.12 ^c

Se muestran los valores de los diferentes parámetros (media ± EEM) en los distintos tiempos de evaluación. Para cada parámetro, las letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre los distintos tiempos de estudio ($P < 0.05$; test Student-Newman-Keuls).

Tabla 6. Evolución de la hiperalgesia y alodinia en la pata inyectada (CFA).

Tiempo	Plantar test (s)	Randall y Selitto (g)	Von Frey (AUC)
0 horas	7.32 ± 0.22 ^a	152.8 ± 4.2 ^a	3399 ± 58 ^a
4 horas	3.75 ± 0.16 ^b	70.5 ± 4.8 ^b	3527 ± 51 ^{b,c}
4 días	3.68 ± 0.25 ^b	67.5 ± 5.7 ^b	3582 ± 23 ^{b,c}
7 días	3.52 ± 0.12 ^b	65.7 ± 4.2 ^b	3612 ± 17 ^c
14 días	3.95 ± 0.16 ^b	76.2 ± 4.9 ^b	3481 ± 30 ^{a,b}

Se muestran los valores de los diferentes parámetros (media ± EEM) en los distintos tiempos de evaluación. Para cada parámetro, las letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre los distintos tiempos de medición ($P < 0.05$; test Student-Newman-Keuls).

A partir de los resultados obtenidos pudimos concluir que la inyección subplantar de CFA indujo una respuesta inflamatoria local acompañada de hiperalgesia y alodinia que permanecía constante entre los 4 y los 7 días post-inyección. Por tanto, los experimentos de tolerancia a la morfina, que se presentan más adelante, fueron realizados en este periodo del proceso inflamatorio.

1.2.2. Evaluación de la inflamación y la conducta nociceptiva en la pata contralateral a la inyectada con CFA.

Se valoró también si la inyección de CFA en una pata inducía cambios significativos en la pata contralateral (CTL). Como se muestra en las tablas (7 y 8) la administración de CFA en una pata no alteró de forma significativa ninguno de los parámetros evaluados en la pata CTL de un mismo animal a lo largo del estudio ($P > 0.05$; test Student-Newman-Keuls). Estos resultados, además de validar la utilidad del modelo de inflamación unilateral, permitieron utilizar la pata contralateral como control de la inflamada, y de esta forma reducir el número de animales de estudio utilizados en experimentos posteriores.

Tabla 7. Evolución del diámetro, peso y extravasación de plasma en la pata contralateral no inyectada (CTL).			
Tiempo	Diámetro pata (mm)	Peso pata (mg)	Azul de Evans (UA/g)
0 horas	3.24 ± 0.02	184 ± 3.5	1.13 ± 0.11
4 horas	3.23 ± 0.01	190 ± 4.3	1.18 ± 0.12
4 días	3.24 ± 0.03	188 ± 3.9	1.06 ± 0.16
7 días	3.24 ± 0.02	184 ± 3.4	1.09 ± 0.08
14 días	3.25 ± 0.03	181 ± 3.4	1.04 ± 0.10

Se muestran los valores de los diferentes parámetros (media ± EEM) en los distintos tiempos de evaluación. La comparación a lo largo del tiempo, para cada parámetro, no reveló diferencias significativas ($P > 0.05$; test Student-Newman-Keuls).

Tabla 8. Evolución de los parámetros nociceptivos en la pata contralateral (CTL).			
Tiempo	Plantar test (s)	Randall y Selitto (g)	Von Frey (AUC)
0 horas	7.32 ± 0.22	152.8 ± 4.2	3399 ± 58
4 horas	7.20 ± 0.19	154.8 ± 6.7	3318 ± 55
4 días	7.14 ± 0.19	155.1 ± 8.5	3441 ± 44
7 días	7.26 ± 0.15	153.2 ± 5.9	3452 ± 29
14 días	7.32 ± 0.18	151.4 ± 6.6	3318 ± 52

Se muestran los valores de los diferentes parámetros (media ± EEM) en los distintos tiempos de evaluación. Para cada parámetro, no se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo ($P > 0.05$; test Student-Newman-Keuls).

1.2.3. Efecto de la inyección subplantar de suero salino sobre los distintos parámetros experimentales.

Con el fin de establecer los controles adecuados para el estudio experimental se evaluó el efecto de la inyección subplantar de suero salino (SS). Estos animales recibieron una solución de SS en una de las patas, comparándose sus respuestas nociceptivas e inflamatorias con las de otros animales sometidos a distintas condiciones experimentales. Los resultados obtenidos en este grupo de animales, inyectados con SS, no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a animales que no recibieron ningún tratamiento subplantar (SIN TRAT) o con la pata CTL de los animales que recibieron CFA. En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos 7 días después de la inyección de CFA o SS. Resultados similares fueron obtenidos a las 4 h, 4 y 14 días; a partir de estos datos se tomó la decisión de utilizar las patas CTL de los animales tratados con CFA como controles.

Tabla 9. Comparación de las respuestas nociceptivas e inflamatorias de las patas de animales sin tratamiento (SIN TRAT), inyectados con salino (SS) y las patas contralaterales (CTL) de animales inyectados con CFA.

Parámetros	SIN TRAT	SS	CTL
Plantar test (s)	7.30 ± 0.25	7.29 ± 0.18	7.26 ± 0.15
Randall y Selitto (g)	156.5 ± 6.2	152.7 ± 8.3	153.2 ± 5.9
Von Frey (AUC)	3426 ± 46	3404 ± 38	3452 ± 29
Díámetro pata (mm)	3.22 ± 0.01	3.25 ± 0.02	3.24 ± 0.02
Peso pata (mg)	181 ± 5.2	189 ± 4.7	184 ± 3.4
Azul de Evans (UA/g)	1.16 ± 0.14	1.08 ± 0.19	1.09 ± 0.08

Se muestran los valores de los distintos parámetros (media ± EEM) de entre 6-8 animales para cada grupo. No se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos grupos para ninguno de los parámetros analizados ($P > 0.05$; test Student-Newman-Keuls).

1.3. Efecto de la administración subplantar de CFA sobre el tránsito gastrointestinal.

En este grupo de experimentos se evaluó el posible efecto de la inyección de CFA sobre el tránsito gastrointestinal, como una medida indirecta de posibles efectos secundarios de la inflamación monoarticular. En ninguno de los tiempos de estudio se obtuvieron diferencias significativas entre los porcentajes de tránsito gastrointestinal en animales sin tratamiento y los que recibieron una inyección subplantar de CFA (tabla 10). Debido a que la afectación localizada en la pata no alteró este parámetro, los experimentos siguientes se centraron específicamente en valorar los efectos de los opioides sobre la monoartritis en la pata, sin evaluar sus efectos sobre la motilidad gastrointestinal.

Tabla 10. Evaluación del tránsito gastrointestinal de animales tratados con CFA, en los distintos tiempos de estudio.

Tiempo	0 horas	4 horas	4 días	7 días	14 días
TGI (%)	50.5 ± 3.4	47.8 ± 3.1	51.4 ± 5.7	53.7 ± 6.7	54.6 ± 6.0

Se muestran los valores (media ± EEM) de entre 6-8 animales para cada tiempo de evaluación. La comparación entre los distintos tiempos no reveló diferencias significativas ($P > 0.05$; test Student-Newman-Keuls). TGI: tránsito gastrointestinal.

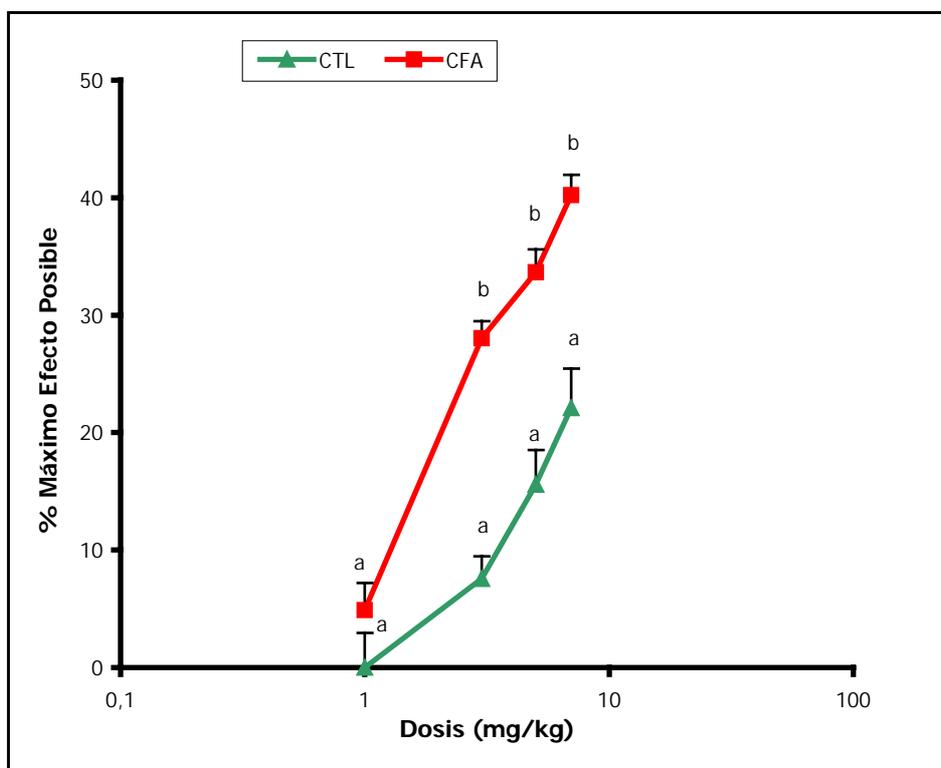
2. Efectos anti-nociceptivos de los opioides durante la inflamación inducida por CFA.

En animales con inflamación monoarticular se estudiaron los efectos de la administración sistémica de un agonista opioide μ sobre la hiperalgesia (térmica y mecánica) y la alodinia, que aparecen como consecuencia de la inyección subplantar de CFA. Nuestros resultados muestran que la presencia de inflamación incrementó los efectos anti-hiperalgésicos de la morfina y que este aumento estaba mediado por interacción con ROM periféricos.

2.1. Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la hiperalgesia térmica.

El primer parámetro nociceptivo evaluado fue la hiperalgesia térmica, mediante el plantar test. La administración de morfina, en un rango de dosis comprendido entre 1 y 7 mg/kg, tuvo un efecto anti-nociceptivo dosis-dependiente sobre las dos patas (CFA y CTL) que fue observado en todos los tiempos de estudio. La potencia anti-hiperalgésica de la morfina en la pata inflamada fue superior al efecto obtenido en la pata contralateral en todos los tiempos de evaluación. En la figura 9 se representan las curvas dosis–respuesta (D-R) para el efecto anti-hiperalgésico de la morfina en la pata CTL y CFA, obtenidas 7 días después del inicio de la inflamación. Resultados similares fueron obtenidos a las 4 h y a los 4 y 14 días después de la inyección de CFA.

Figura 9. Efecto anti-hiperalgésico de la morfina subcutánea en el plantar test, siete días después del inicio de la inflamación.



Cada punto representa la media \pm EEM de entre 6-8 ratones. Las letras (a, b) indican diferencias significativas entre los puntos de las dos curvas ($P < 0.05$; test t de Student para cada dosis).

Las curvas D-R obtenidas en los distintos tiempos de estudio fueron analizadas por regresión lineal, obteniéndose las dosis que produjeron un 50% del efecto máximo observado (DE_{50}) como medida de la potencia inhibitoria de la morfina. En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos en los distintos tiempos de evaluación y las características de las curvas D-R en las dos patas, CFA y CTL. Para cada curva D-R se indican los valores de las DE_{50} , la pendiente de la recta y el efecto máximo observado (E_{max}).

La comparación de las DE_{50} entre las patas CFA y CTL reveló un aumento en la potencia anti-nociceptiva de la morfina (aproximadamente dos veces) en la pata inflamada ($P < 0.05$; test Student-Newman-Keuls). Aunque este aumento pudo ser observado en todos los tiempos de estudio, éste fue ligeramente más acentuado a los 4 y 7 días, y fue declinando a los 14 días después del inicio de la inflamación. No se observaron diferencias significativas en las pendientes de las rectas entre las dos patas para ninguno de los tiempos de estudio evaluados.

Al comparar los valores de Emax para la morfina, entre las patas CFA y CTL, se observó que los valores máximos fueron mayores en presencia de inflamación, a lo largo del tiempo. Cabe destacar que al realizar las curvas D-R a la morfina no pudimos valorar los efectos producidos por dosis a partir de 10 mg/kg. Esto es debido a que a dosis elevadas la morfina subcutánea aumenta la actividad locomotora de los animales, lo que impide la medición experimental de su efecto anti-nociceptivo en este test (la misma limitación se produjo en el test de Von Frey). La hipermotilidad inducida por dosis altas de morfina (>10 mg/kg) se valoró en otra serie de experimentos, que se describen más adelante en el apartado de tolerancia a la morfina (5.5).

Tabla 11. Curvas D-R a la morfina en el plantar test en los distintos tiempos.				
Tiempo	Pata	DE ₅₀	Pendiente	Emax
4 horas	CTL	4.9 ± 0.1 ^a	38.8 ± 4.5 ^a	26.2 ± 3.7 ^a
	CFA	2.8 ± 0.1 ^b	39.4 ± 3.1 ^a	39.6 ± 1.9 ^b
4 días	CTL	4.7 ± 0.1 ^a	44.4 ± 2.8 ^a	28.5 ± 2.7 ^a
	CFA	2.5 ± 0.1 ^b	40.3 ± 1.9 ^a	42.4 ± 2.9 ^b
7 días	CTL	4.9 ± 0.2 ^a	42.1 ± 4.2 ^a	30.0 ± 3.8 ^a
	CFA	2.7 ± 0.1 ^b	39.4 ± 3.3 ^a	44.0 ± 1.6 ^b
14 días	CTL	4.7 ± 0.1 ^a	42.9 ± 2.6 ^a	30.2 ± 4.1 ^a
	CFA	2.9 ± 0.1 ^b	39.3 ± 3.4 ^a	43.7 ± 2.9 ^b

Para cada pata (CTL y CFA) se muestran los valores (media ± EEM) de las DE₅₀ (mg/kg), las pendientes y los Emax de las curvas D-R en los distintos tiempos de evaluación. Para cada parámetro, las letras (a, b) indican diferencias significativas entre valores de las patas en los diferentes tiempos de estudio ($P < 0.05$; test Student-Newman-Keuls).

El efecto anti-nociceptivo de la morfina en animales no inflamados (SIN TRAT) fue similar al obtenido en las patas CTL de animales con inflamación monoarticular, en todos los tiempos de estudio. En la tabla 12 se muestran los resultados comparativos siete días después

del tratamiento con CFA; resultados similares fueron obtenidos a las 4 h, 4 y 14 días. Estos datos fueron reproducidos en los otros dos tests nociceptivos (Randall y Selitto, Von Frey), de manera que el resto de experimentos se realizaron utilizando como controles las patas CTL de animales inyectados con CFA. Estos resultados confirman los hallazgos anteriores referentes a la afectación unilateral de la inflamación.

Tabla 12. Curvas D-R a la morfina en el plantar test realizado en las patas de animales no tratados (SIN TRAT) y en las patas CTL de animales tratados con CFA, 7 días después del inicio del tratamiento.

Tiempo	Pata	DE ₅₀	Pendiente	E _{max}
7 días	CTL	4.9 ± 0.2	42.1 ± 4.2	30.0 ± 3.8
	SIN TRAT	4.8 ± 0.1	40.8 ± 3.2	29.6 ± 5.2

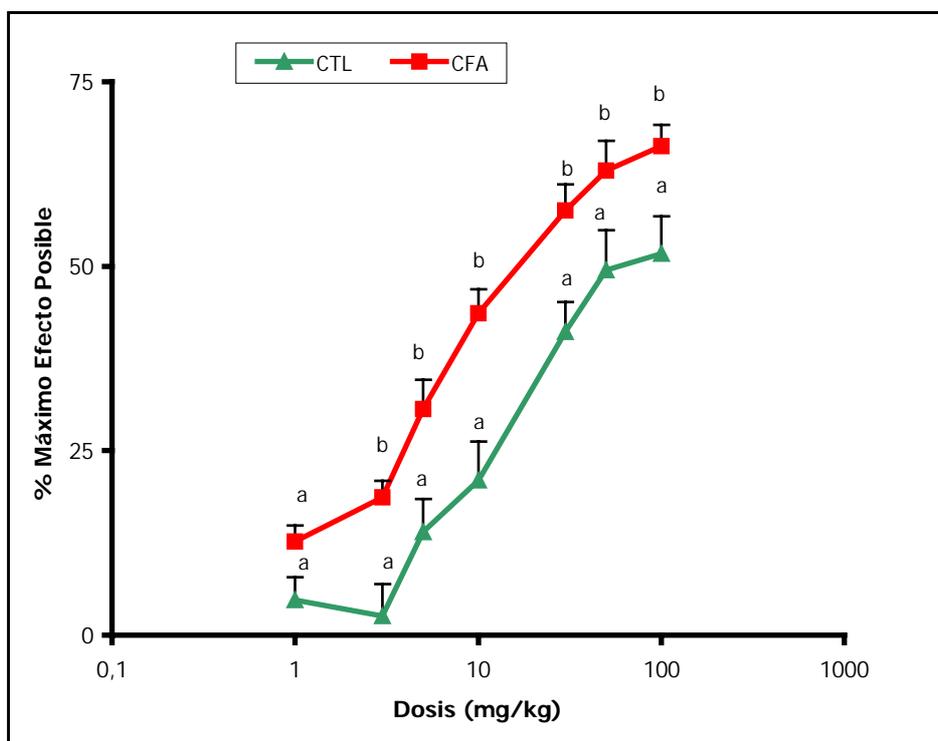
Para cada pata se muestran los valores (media ± EEM) de las DE₅₀ (mg/kg), pendientes y E_{max}. Para los distintos parámetros, la comparación entre los resultados obtenidos en los dos grupos de animales no reveló diferencias significativas ($P > 0.05$; test *t* de Student). SIN TRAT: animales sin inflamación; CTL: pata contralateral de animales inyectados unilateralmente con CFA.

2.2. Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la hiperalgesia mecánica.

El efecto anti-hiperalgésico de la morfina administrada por vía subcutánea fue también valorado en el test de Randall y Selitto (hiperalgesia mecánica). La administración de morfina, en un rango de dosis comprendido entre 1 y 100 mg/kg, tuvo un efecto inhibitorio de la nocicepción de forma dosis-dependiente en los diferentes tiempos de estudio. Igual que en el plantar test, la potencia de la morfina en la pata inyectada con CFA fue superior a la de la pata CTL, en todos los tiempos de estudio.

En la figura 10 se representan gráficamente las curvas D-R de los efectos anti-nociceptivos de la morfina frente a un estímulo mecánico, en las patas CTL y CFA, 7 días después del inicio de la inflamación.

Figura 10. Efecto anti-nociceptivo de la administración subcutánea de morfina sobre la hiperalgesia mecánica, 7 días después de la inyección de CFA.



Cada punto representa la media \pm EEM de entre 6-8 ratones. Las letras (a, b) indican diferencias significativas entre los dos grupos, para cada dosis ($P < 0.05$; test *t* de Student).

Las curvas D-R en los distintos tiempos de estudio fueron analizadas por regresión lineal. En la tabla 13 se caracterizan las curvas D-R de las patas CTL y CFA en los distintos tiempos, mostrándose los valores medios de las DE_{50} , pendiente de la recta y E_{max} . Los resultados indican que la potencia anti-hiperalgésica de la morfina fue aproximadamente dos veces superior en la pata inflamada que en la CTL ($P < 0.05$; test Student-Newman-Keuls). Este aumento se produjo en todos los tiempos de estudio, aunque la potencia de la morfina a las 4 horas después de iniciarse la inflamación fue ligeramente inferior que a los 4 días. En presencia de inflamación se observaron también valores mayores de E_{max} en todos los tiempos de estudio, aunque el aumento observado a las 4 horas fue levemente menor que en el resto de tiempos evaluados ($P < 0.05$; test Student-Newman-Keuls). No se observaron cambios significativos en las pendientes de las rectas.

Tabla 13. Efecto anti-nociceptivo de la morfina en el test de Randall y Selitto en los distintos tiempos de estudio.				
Tiempo	Pata	DE ₅₀	Pendiente	E _{max}
4 horas	CTL	13.3 ± 0.3 ^a	28.4 ± 2.3 ^a	51.0 ± 5.5 ^a
	CFA	6.8 ± 0.1 ^b	26.3 ± 3.7 ^a	59.4 ± 2.6 ^b
4 días	CTL	12.9 ± 0.3 ^a	26.9 ± 2.3 ^a	51.4 ± 3.2 ^a
	CFA	6.1 ± 0.2 ^b	30.5 ± 3.4 ^a	71.2 ± 2.6 ^c
7 días	CTL	12.8 ± 0.2 ^a	28.1 ± 2.8 ^a	51.7 ± 5.3 ^a
	CFA	6.3 ± 0.2 ^b	29.2 ± 4.1 ^a	66.3 ± 2.9 ^c
14 días	CTL	13.3 ± 0.2 ^a	28.0 ± 3.0 ^a	50.9 ± 3.8 ^a
	CFA	6.4 ± 0.2 ^b	30.4 ± 4.3 ^a	64.8 ± 2.2 ^c

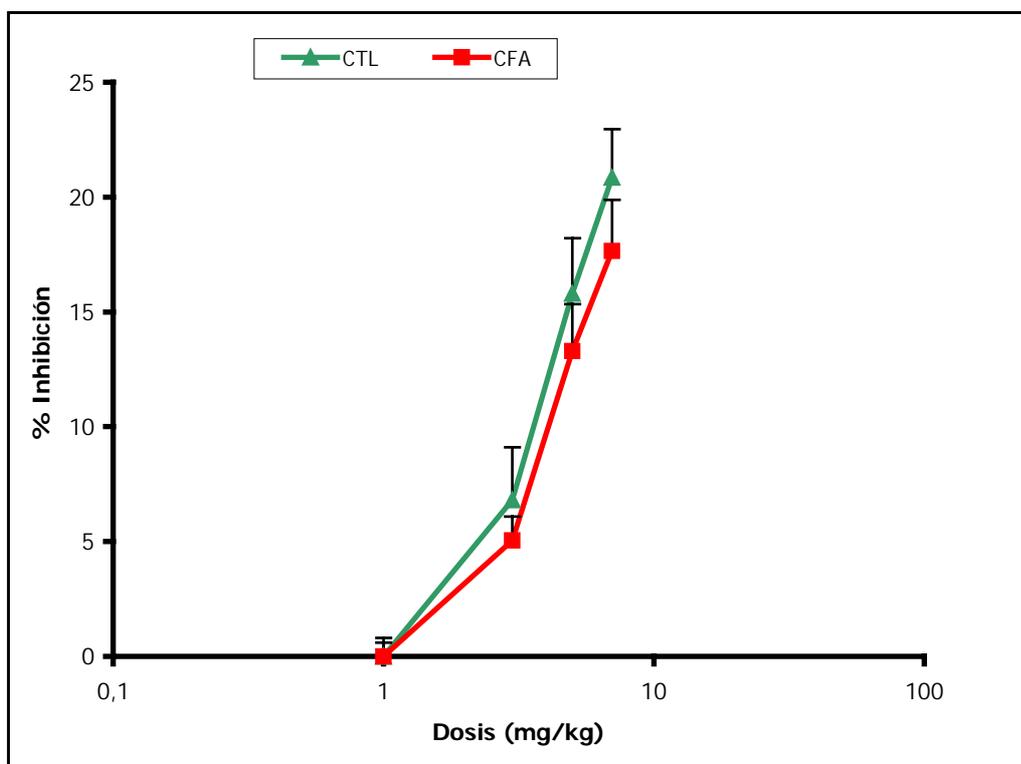
Para cada pata se muestran los valores (media ± EEM) de las DE₅₀ (mg/kg), pendientes y E_{max}, en los distintos tiempos de evaluación. Para cada parámetro, las letras (a, b, c) indican diferencias significativas al comparar los valores de ambas patas entre los diferentes tiempos de estudio (P<0.05; test Student-Newman-Keuls).

2.3. Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la alodinia.

El último parámetro nociceptivo evaluado fue la alodinia, utilizando el test de Von Frey. La administración de morfina, en un rango de dosis comprendido entre 1 y 7 mg/kg, provocó un efecto inhibitor de la alodinia mecánica de forma dosis-dependiente. El efecto fue similar en ambas patas y pudo ser demostrado en todos los tiempos de evaluación (4 h, 4, 7 y 14 días). En este test no se observaron cambios en la potencia de la morfina en la pata CFA con respecto a la CTL, en ninguno de los tiempos de estudio.

En la figura 11 se representan las curvas D-R a la morfina sobre la inhibición de la alodinia, en las patas CTL y CFA, 7 días después de la administración de CFA.

Figura 11. Efecto anti-alodínico de la morfina subcutánea siete días después de la inyección de CFA.



Cada punto representa la media \pm EEM de entre 6-8 ratones. No se obtuvieron diferencias significativas al comparar los valores de los dos grupos en ninguna de las dosis estudiadas ($P > 0.05$; test *t* de Student).

Todas las curvas D-R obtenidas en los distintos tiempos de estudio fueron analizadas por regresión lineal. En la tabla 14 se muestran las características de las curvas D-R de las patas CTL y CFA, a las 4 h y a los 4, 7 y 14 días después de la inflamación. En el test de Von Frey, a diferencia de los tests de hiperalgesia (plantar test y test de Randall y Selitto), no se observó un efecto aumentado de la morfina en la pata inflamada respecto a la contralateral; los valores de las DE_{50} y los de E_{max} no difirieron significativamente al comparar ambas patas (CTL y CFA). Estos resultados muestran que el efecto anti-alodínico de la morfina no se alteró en presencia de inflamación.

Tabla 14. Curvas D-R a la morfina en el test de Von Frey en los distintos tiempos de estudio.				
Tiempo	Pata	DE ₅₀	Pendiente	E _{max}
4 horas	CTL	5.2 ± 0.1	30.2 ± 1.8	24.5 ± 4.2
	CFA	5.1 ± 0.1	32.5 ± 2.6	22.1 ± 4.5
4 días	CTL	4.9 ± 0.1	34.4 ± 3.3	25.5 ± 1.2
	CFA	5.0 ± 0.1	33.7 ± 1.9	23.6 ± 1.6
7 días	CTL	4.9 ± 0.1	36.3 ± 2.4	25.8 ± 2.7
	CFA	5.1 ± 0.2	35.3 ± 1.9	23.9 ± 1.6
14 días	CTL	5.3 ± 0.1	33.5 ± 3.1	26.3 ± 4.7
	CFA	5.2 ± 0.1	34.2 ± 2.2	22.9 ± 2.0

Se muestran, para cada pata, los valores (media ± EEM) de las DE₅₀ (mg/kg), pendientes y E_{max}, en los distintos tiempos de evaluación. No se obtuvieron diferencias significativas, en ninguno de los parámetros, al comparar los valores de las patas en los distintos tiempos de estudio ($P > 0.05$; test Student-Newman-Keuls).

2.4. Efectos de la administración sistémica de antagonistas opioides μ sobre la hiperalgia térmica.

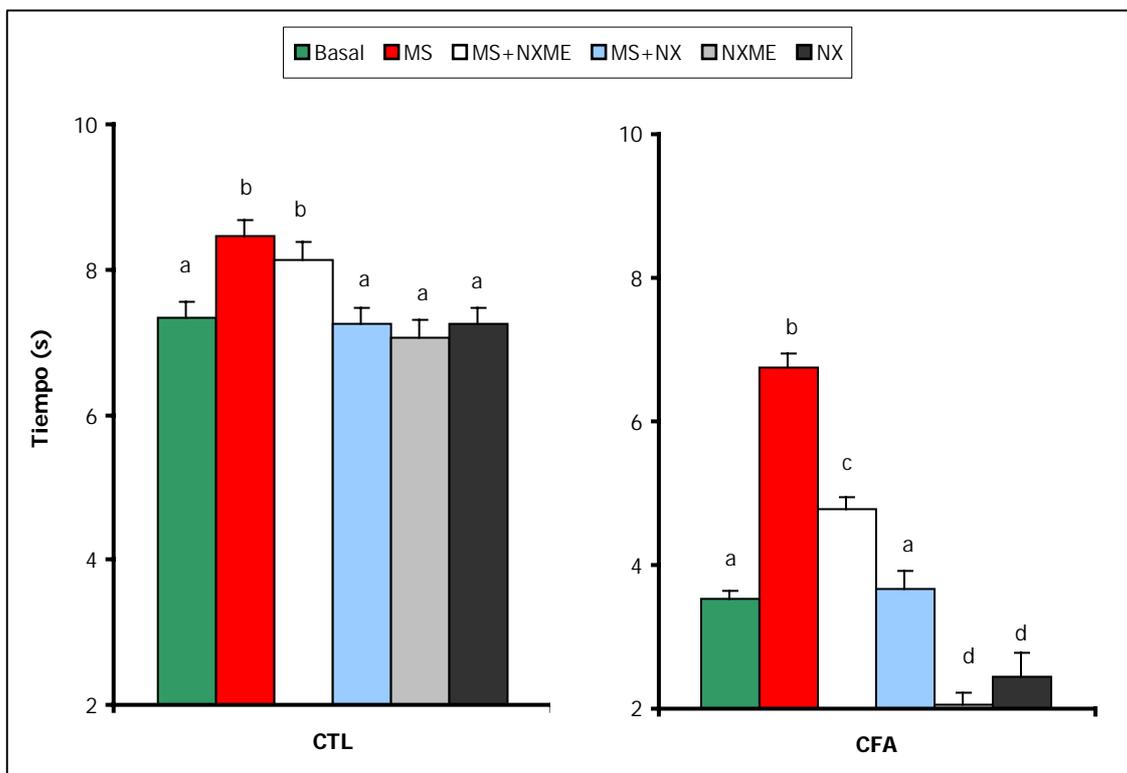
Con el fin de establecer la naturaleza opioide de los efectos anti-nociceptivos de la morfina durante la inflamación, se estudió la reversibilidad de los mismos tras la administración de antagonistas específicos. Estos experimentos fueron realizados siete días después de la inyección de CFA, para estudiar también si los efectos anti-hiperalgésicos de la morfina se producían por interacción con ROM periféricos o bien existía un componente central. Utilizamos naloxona (NX) un antagonista de acción mixta (central y periférica), y un antagonista de acción preferentemente periférica (naloxona metiodada; NXME). Los resultados muestran que el

aumento del efecto anti-hiperalgésico de la morfina observado en la pata inflamada se debió principalmente a la activación de ROM periféricos.

El primer parámetro nociceptivo estudiado fue la hiperalgesia térmica, utilizando el plantar test. En estos experimentos evaluamos la reversibilidad de los efectos anti-nociceptivos producidos por una DE_{50} de morfina obtenida en la pata CTL (4.9 mg/kg) y en la inflamada (2.7 mg/kg) de dos grupos de animales distintos con inflamación monoarticular mediante la administración de NX (0.1 mg/kg) o NXME (0.3 mg/kg). En la figura 12 mostramos que la administración de NX por vía subcutánea bloqueó el efecto de la morfina en las dos patas (CTL y CFA), mientras que la administración de NXME sólo fue capaz de bloquear parcialmente el efecto de la morfina en la pata inflamada. Este hecho indica que el efecto inhibitorio de la morfina sistémica en la pata inflamada estaba mediado por interacción con ROM centrales y periféricos.

En estos experimentos también se evaluaron los efectos de los antagonistas específicos administrados individualmente. La administración de NX (0.1 mg/kg) o NXME (0.3 mg/kg) no alteró significativamente los valores basales de nocicepción en la pata CTL mientras que provocó una ligera hiperalgesia en la pata inflamada. Estos hechos sugieren que durante el proceso inflamatorio se activa el sistema opioide endógeno, liberando localmente péptidos opioides; cuyo efecto fue revertido por la administración de antagonistas periféricos (NXME).

Figura 12. Reversión del efecto anti-hiperalgésico de la morfina en el plantar test, mediante la administración de antagonistas opioides μ , siete días después del inicio de la inflamación.



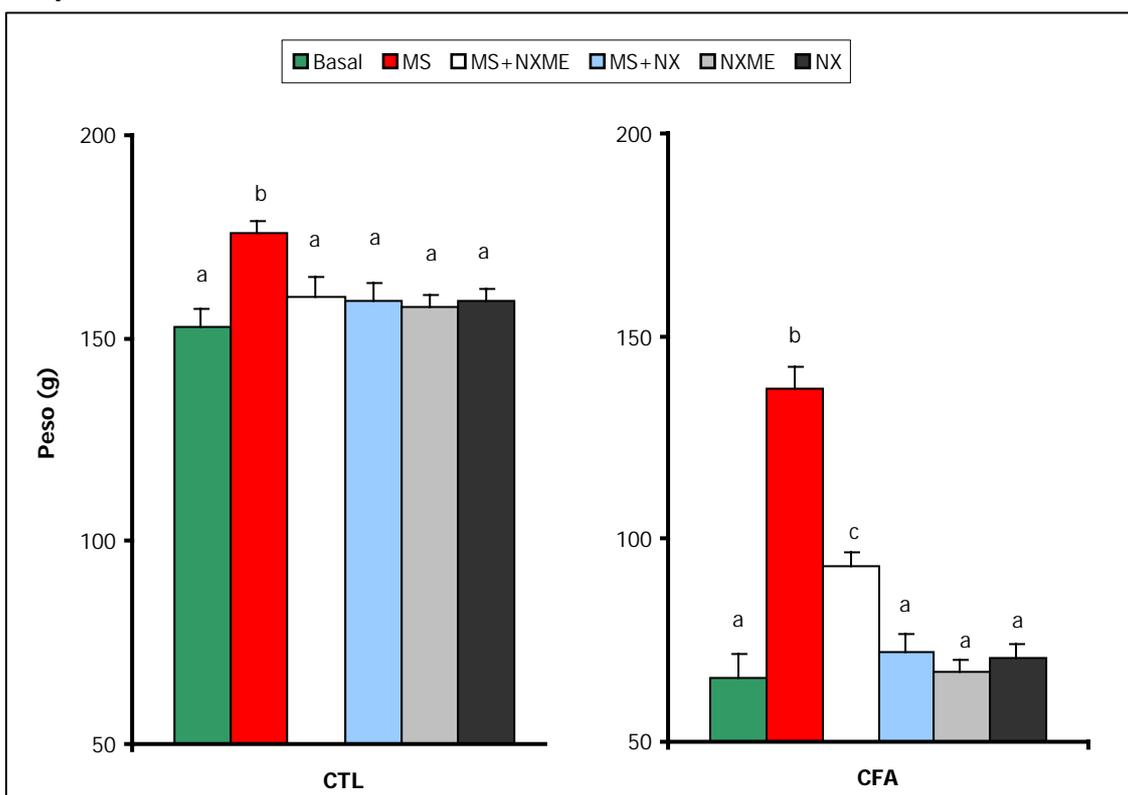
Se representan los tiempos en segundos (medias \pm EEM) que tardaron los animales en retirar las patas del foco de calor ($n= 6-8$ animales/grupo experimental). Para cada pata (CTL y CFA) las distintas letras (a, b, c, d) indican diferencias significativas entre grupos de tratamiento ($P<0.05$; test Student-Newman-Keuls). Basal (sin inyección de fármaco), MS (morfina, 4.9 mg/kg en la pata CTL y 2.7 mg/kg en la pata CFA), NX (naloxona, 0.1 mg/kg), NXME (naloxona metiodada, 0.3 mg/kg).

2.5. Reversión de los efectos de la morfina mediante antagonistas opioides μ , sobre la hiperalgesia mecánica.

En estos experimentos se valoró la reversibilidad de los efectos producidos por la morfina durante la hiperalgesia mecánica (test de Randall y Selitto), siete días después de la inyección de CFA. Como en el plantar test, en dos grupos de animales distintos se evaluaron los efectos producidos por la administración de las DE_{50} de morfina obtenidas en las patas contralateral (12.8 mg/kg) e inflamada (6.3 mg/kg), en presencia de NX (0.1 mg/kg) o NXME (0.3 mg/kg). También se evaluaron los efectos de la NX (0.1 mg/kg) y NXME (0.3 mg/kg) administradas individualmente (figura 13). La administración de ambos antagonistas bloqueó completamente el efecto anti-nociceptivo de la morfina en la pata CTL. En la pata inflamada, la

NX antagonizó íntegramente el efecto de la morfina, mientras que la NXME sólo fue capaz de bloquearlo parcialmente ($P < 0.05$; test Student-Newman-Keuls). Los antagonistas administrados individualmente no alteraron significativamente los valores basales en la pata CTL ni en la inyectada con CFA.

Figura 13. Reversión del efecto anti-hiperalgésico de la morfina en el test de Randall y Selitto, mediante la administración de antagonistas opioides μ , siete días después del inicio de la inflamación.



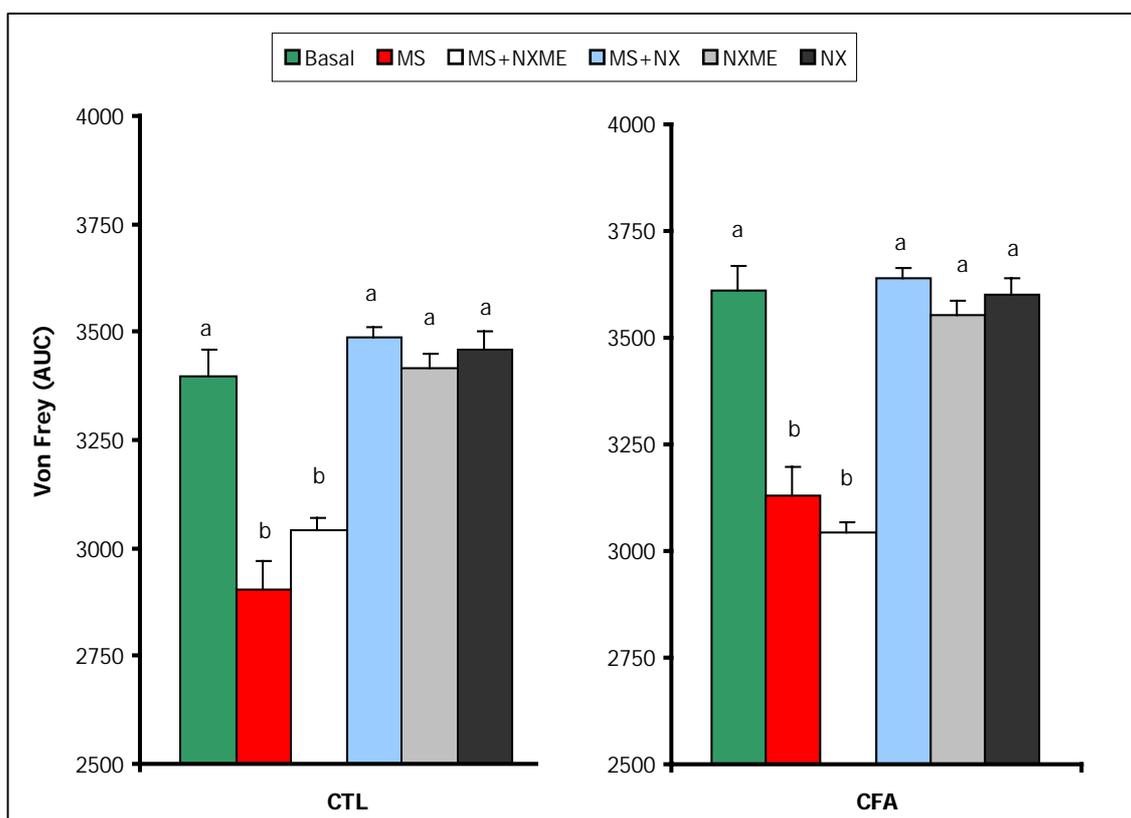
Se representan los pesos en gramos (medias \pm SEM) que los animales soportaron a la presión del pistón ($n = 6-8$ animales/grupo experimental). Para cada pata, las letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre grupos de tratamiento ($P < 0.05$; test Student-Newman-Keuls). Basal (sin inyección de fármaco), MS (morfina, 12.8 mg/kg en la pata CTL y 6.3 mg/kg en la pata CFA), NX (naloxona, 0.1 mg/kg), NXME (naloxona metiodada, 0.3 mg/kg).

2.6. Reversión del efecto anti-alodínico de la morfina mediante la administración de antagonistas opioides μ específicos.

El último parámetro nociceptivo estudiado fue la alodinia (test de Von Frey), valorando los efectos producidos por la administración de las DE_{50} de morfina (4.9 mg/kg en la pata CTL y 5.1 mg/kg en la pata CFA) en presencia de NX (0.1 mg/kg) o NXME (0.3 mg/kg).

Los resultados muestran que la administración de NX revirtió completamente los efectos de la morfina en las dos patas (CTL y CFA), mientras que la administración del antagonista periférico NXME no modificó el efecto de la morfina en ninguna de las patas estudiadas. Estos resultados indican que el efecto anti-alodínico de la morfina se produjo actuando sobre ROM localizados preferentemente en el sistema nervioso central, probablemente en la médula espinal (ver discusión). En el test de Von Frey, la administración de NX o de NXME, solas, no alteraron significativamente los valores basales obtenidos en la pata contralateral ni en la inflamada (figura 14).

Figura 14. Reversión del efecto anti-alodínico de la morfina mediante la administración sistémica de antagonistas opioides, siete días después de la inyección de CFA.



Se representan los valores de AUC (medias \pm EEM) obtenidos en el test de Von Frey ($n = 6-8$ animales/grupo experimental). Para cada pata, las letras (a, b) indican diferencias significativas entre grupos de tratamiento ($P < 0.05$; test Student-Newman-Keuls). Basal (sin inyección de fármaco), MS (morfina, 4.9 mg/kg en la pata CTL y 5.1 mg/kg en la pata CFA), NX (naloxona, 0.1 mg/kg), NXME (naloxona metiodada, 0.3 mg/kg).

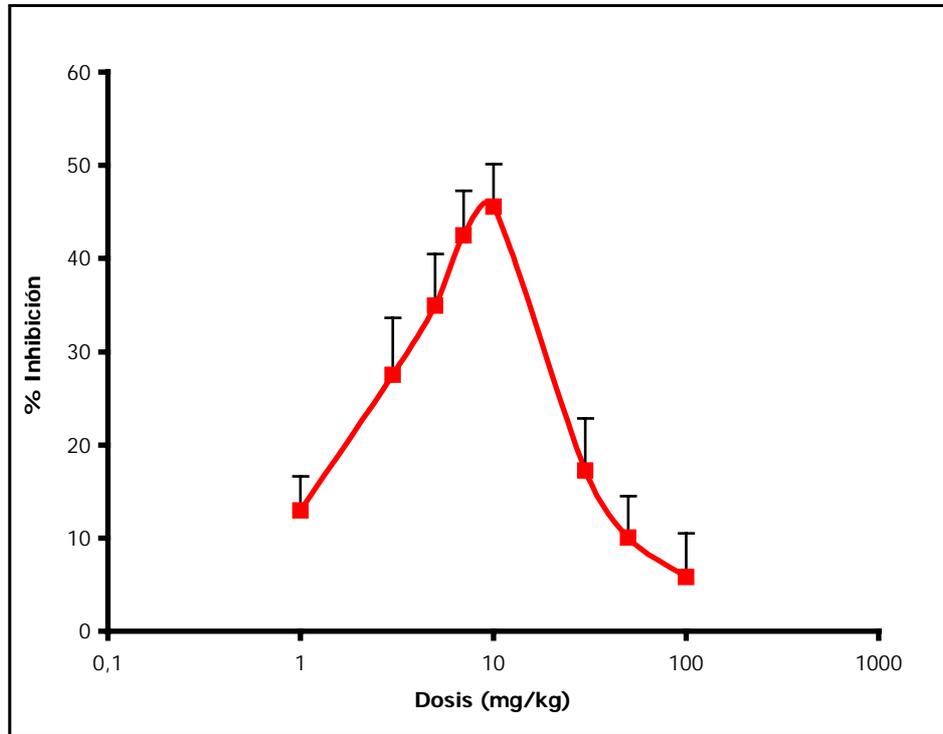
3. Efectos de los opioides sobre la extravasación de plasma durante la inflamación inducida por CFA.

En animales con inflamación unilateral se determinaron los efectos de la administración sistémica de morfina sobre la extravasación de plasma, utilizando azul de Evans. Durante la inflamación periférica, la morfina inhibió la extravasación de plasma de una forma dosis-dependiente y este efecto estuvo mediado por ROM localizados preferentemente en el ámbito periférico.

3.1. Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la extravasación de plasma.

La administración de morfina (1-100 mg/kg) inhibió la extravasación de plasma en la pata inflamada de forma dosis-dependiente, en los diferentes tiempos de estudio. En la figura 15 se representa la curva D-R a la morfina sobre la inhibición de la extravasación de plasma, 7 días después del inicio de la inflamación. La morfina inhibió la extravasación de manera bifásica, con un E_{max} de aproximadamente un 50% de inhibición, producido por una dosis de 10 mg/kg. A partir de esta dosis, la administración de dosis crecientes de morfina provocó efectos inhibitorios progresivamente menores. Esta respuesta bifásica también se observó a las 4 h, 4 y 14 días después del inicio de la inflamación. Las DE_{50} de la morfina en los diferentes tiempos de estudio fueron obtenidas por regresión curvilínea mediante el ajuste cuadrático de los datos (tabla 15). La curva bifásica tuvo, por tanto, dos pendientes (derivadas de la ecuación de segundo grado); mostramos únicamente los resultados de la recta ascendente obtenida con las dosis más bajas de morfina. Los resultados muestran que la potencia inhibitoria de la morfina sobre la extravasación (comparación de las DE_{50} obtenidas en la parte ascendente de las curvas) fue ligeramente superior a los 4 y 7 días respecto a las 4 horas desde el inicio de la inflamación ($p < 0.05$, test de Student-Newman-Keuls).

Figura 15. Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la extravasación de plasma, 7 días después del inicio de la inflamación.



Curva D-R a la morfina sobre la inhibición de la extravasación de plasma, siete días después del inicio de la inflamación. Cada punto representa la media \pm EEM de entre 6-8 animales.

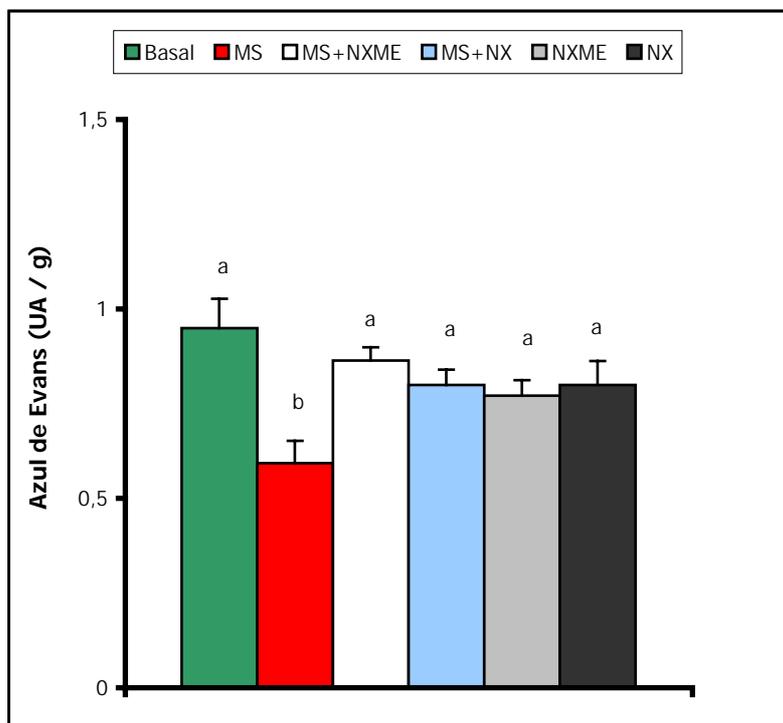
Tabla 15. DE₅₀ y Emax de la morfina sobre la extravasación de plasma en los distintos tiempos de estudio.		
Tiempo	DE ₅₀	Emax
4 horas	2.8 \pm 0.1 ^a	46.7 \pm 2.0 ^a
4 días	2.5 \pm 0.1 ^b	47.9 \pm 2.0 ^a
7 días	2.5 \pm 0.1 ^b	45.6 \pm 2.0 ^a
14 días	2.7 \pm 0.1 ^{a,b}	45.5 \pm 2.0 ^a

Se muestran los valores (media \pm EEM) de las DE₅₀ (mg/kg) y Emax, en los diferentes tiempos de evaluación. Para cada parámetro, las letras (a, b) indican diferencias significativas entre los diferentes tiempos de estudio ($P < 0.05$; test Student-Newman-Keuls).

3.2. Reversibilidad de los efectos inhibitorios de la morfina sobre la extravasación de plasma tras la administración de antagonistas opioides μ .

La naturaleza opioide de los efectos de la morfina sobre la extravasación de plasma fue establecida evaluando la reversibilidad de sus efectos mediante la administración de dos antagonistas opioides μ : NX de acción periférica y central, y NXME de acción preferentemente periférica. La figura 16 muestra los efectos producidos por la administración de una DE_{50} de morfina (2.5 mg/kg), sola o combinada con 0.1 mg/kg de NX ó 0.3 mg/kg de NXME, así como los efectos de los antagonistas administrados individualmente. Los resultados muestran que el efecto anti-extravasación de la morfina fue bloqueado por ambos antagonistas. La completa reversión obtenida tras la administración de NXME sugiere que el efecto anti-extravasación de la morfina se produjo preferentemente por interacción con ROM periféricos. La administración de antagonistas individualmente no alteró los valores basales de extravasación.

Figura 16. Reversibilidad de los efectos de la morfina sobre la extravasación de plasma mediante antagonistas opioides μ , 7 días después de la inyección de CFA.



Se muestran los valores (media \pm EEM) de azul de Evans extravasado (UA/g) en las distintas condiciones experimentales: basal, morfina sola o combinada con los antagonistas y administración de los antagonistas solos. Las letras (a, b) indican diferencias significativas entre grupos de tratamiento ($P < 0.05$; test Student-Newman-Keuls). MS: morfina, NX: naloxona; NXME: naloxona metiodada.

4. Inducción de tolerancia a la morfina durante la inflamación periférica.

El modelo de inflamación monoarticular en el ratón, caracterizado en los experimentos iniciales, fue utilizado para estudiar la aparición y desarrollo de tolerancia a la morfina durante la inflamación periférica. La implantación subcutánea de un comprimido de morfina (75 mg) en animales con monoartritis provocó la aparición de tolerancia a la morfina, caracterizada por una desviación a la derecha de las curvas D-R a la morfina para sus efectos anti-nociceptivo e inhibidor de la extravasación.

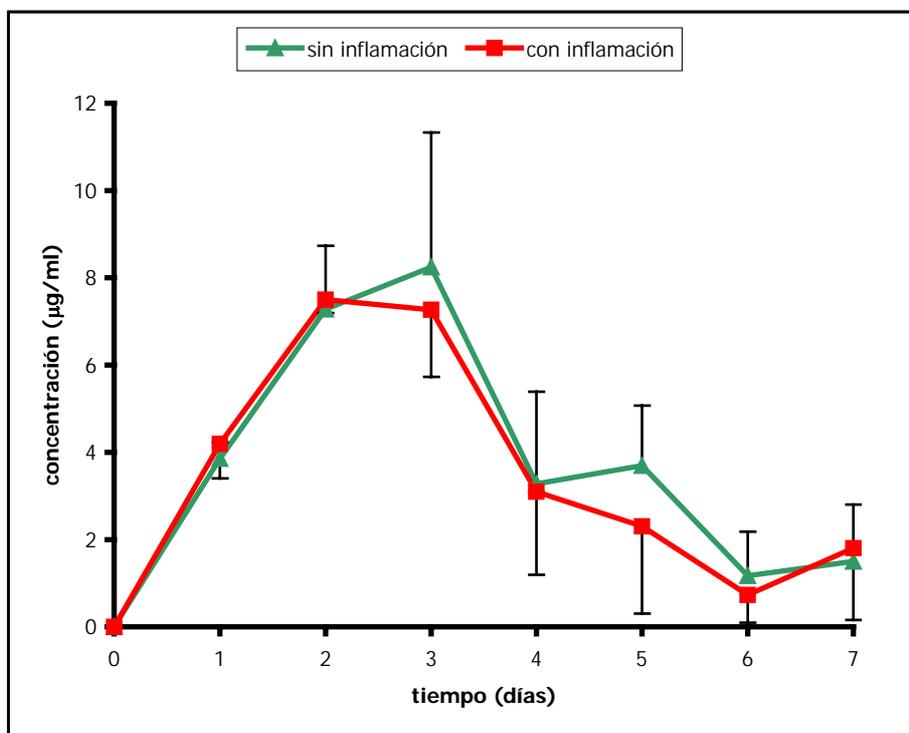
4.1. Niveles plasmáticos de morfina después de la implantación de un comprimido de 75 mg de morfina en el ratón.

La tolerancia opioide se provocó mediante la implantación subcutánea de un comprimido de 75 mg de morfina. Los animales a los cuales se implantó el comprimido de morfina (tolerantes) tuvieron un comportamiento alterado respecto a los animales implantados con el comprimido placebo. En el texto utilizaremos los términos placebo y tolerante para designar a los animales implantados con un comprimido placebo y de morfina, respectivamente; aún antes de demostrar la presencia (o ausencia) de tolerancia. Los animales tolerantes, al cabo de 1 hora de la implantación del comprimido, presentaron el fenómeno de Straub en la cola y una movilidad exagerada. Este fenómeno desapareció a los 2-3 días, y a partir de este momento los animales presentaron un comportamiento alterado, ya que en vez de permanecer agrupados en la jaula permanecían separados y en una postura expectante. Estas alteraciones del comportamiento no se observaron en los animales placebo.

Para comprobar que la absorción de morfina a partir del comprimido inducía niveles plasmáticos elevados del fármaco en plasma, en animales sin y con inflamación, se determinó la concentración plasmática de morfina liberada por el comprimido durante siete días después de su implantación (figura 17). Los resultados muestran que la concentración de morfina en plasma tuvo un pico máximo a los 2-3 días de la implantación del comprimido, que fue de aproximadamente 8 $\mu\text{g/ml}$, y a continuación se produjo un descenso progresivo.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre animales sin y con inflamación ($P > 0.05$; test t de Student).

Figura 17. Niveles de morfina en plasma ($\mu\text{g}/\text{ml}$) durante siete días, en animales sin y con inflamación monoarticular.



Cada punto representa la media \pm EEM de las determinaciones realizadas en 6 ratones. La comparación entre los animales sin y con inflamación no mostró diferencias significativas, para cada uno de los tiempos estudiados ($P > 0.05$; test t de Student).

La presencia de tolerancia a la morfina se comprobó inicialmente valorando el síndrome de abstinencia producido por la administración subcutánea de 10 mg/kg de naloxona, 3 días después de la implantación del comprimido. Todos los animales tolerantes evaluados presentaron diarrea y alteraciones en su actividad (agitación, saltos compulsivos, movimientos rotatorios, etc.), mientras que ninguno de los animales placebo mostró estos síntomas.

Sobre la base de estos resultados, los efectos de la tolerancia opioide en presencia de inflamación monoarticular crónica (inducida por CFA) se estudiaron en las siguientes condiciones (ver figura 8): el cuarto día después de la inyección subplantar de CFA (cuando los animales ya tenían inflamación crónica), se implantó el comprimido de morfina o placebo, y las respuestas conductuales fueron valoradas 3 días después (7 días desde la inyección de CFA).

4.2. Evolución del peso y la temperatura corporal de animales placebo y tolerantes a la morfina.

El peso y la temperatura corporal de estos animales fueron los primeros parámetros que se cuantificaron, como medida indirecta de posibles alteraciones sistémicas inducidas por la exposición crónica a la morfina. En la tabla 16 se compara la evolución del peso corporal entre animales placebo y tolerantes. Los animales tolerantes perdieron peso durante el tiempo que estuvieron expuestos a niveles plasmáticos altos de morfina (entre los 4 y los 7 días desde el inicio de la inflamación), mientras que los animales placebo ganaron peso durante este periodo. En la tabla también se muestra la evolución de la temperatura corporal, la cual disminuyó significativamente en los animales tolerantes a la morfina.

Tabla 16. Evolución del peso y la temperatura corporal de animales placebo y tolerantes.				
Parámetro	Condición experimental	0 días	4 días	7 días
		CFA	PELLET	EXP
Peso (g)	Placebo	27.6 ± 0.4 ^a	29.1 ± 0.4 ^a	30.3 ± 0.5 ^a
	Tolerante	27.7 ± 0.4 ^a	29.4 ± 0.3 ^a	26.7 ± 0.5 ^b
Temperatura (°C)	Placebo	37.2 ± 0.2 ^a	37.4 ± 0.1 ^a	37.3 ± 0.1 ^a
	Tolerante	37.3 ± 0.1 ^a	37.3 ± 0.2 ^a	36.6 ± 0.2 ^b

Se muestran los valores medios ± EEM para el peso (gramos) y la temperatura corporal (°C) en las distintas condiciones experimentales, a los 0, 4 y 7 días del inicio de la inflamación. Para cada parámetro las letras (a, b) indican diferencias significativas entre animales placebo y tolerante, para cada tiempo (P<0.05; test t de Student). CFA: Inducción de la inflamación; PELLET: Implantación del comprimido placebo o de morfina; EXP: Evaluación del comportamiento nociceptivo y la extravasación.

En otro grupo de animales se evaluó si la presencia de inflamación modificaba la aparición de tolerancia (el peso y la temperatura), no encontrándose diferencias en la evolución de estos parámetros entre animales tolerantes con y sin inflamación (no se muestran los datos).

4.3. Efectos de la implantación del comprimido de morfina en presencia de inflamación, sobre el diámetro y el peso de la pata, la extravasación de plasma, la hiperalgesia y la alodinia.

Los mismos parámetros que se evaluaron en el modelo de inflamación por CFA fueron evaluados en animales placebo y tolerantes, siete días después del inicio de la inflamación. Estos experimentos fueron realizados con el fin de establecer si la presencia de inflamación modifica el desarrollo de la tolerancia a la morfina. Inicialmente se compararon los resultados de los distintos parámetros entre animales a los que no se les implantó ningún comprimido y animales implantados con un comprimido placebo, para comprobar el efecto de la implantación. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos. La implantación (por sí sola) no produjo ningún efecto, de forma que utilizamos el término "placebo" para designar indistintamente a los animales sin implantación y a los que se implantaron comprimidos placebo. Como se ha mencionado anteriormente, utilizamos el término "tolerante" para aludir a los animales implantados con un comprimido de morfina. Se comprobó también la validez de utilizar la pata contralateral del mismo animal como control de la inflamada, valorando los distintos parámetros en animales sin inflamación pero implantados con un comprimido de morfina. No se obtuvieron diferencias significativas al comparar los resultados obtenidos en las patas de estos animales con los obtenidos en las patas CTL de los animales inflamados, y por tanto, estas últimas fueron usadas como controles.

En la tabla 17 se muestran los valores de los diferentes parámetros físicos de estudio (diámetro, peso de las patas y azul de Evans) a los siete días del inicio de la inflamación, en animales placebo y tolerantes. Los tres parámetros aumentaron de forma significativa en la pata CFA respecto a la CTL en los dos grupos (placebo y tolerante). Sin embargo, el incremento del diámetro y el peso de la pata (pero no de la extravasación) fue menor en animales tolerantes. Los valores de los parámetros nociceptivos se muestran en la tabla 18. En cuanto a las patas CTL, los animales placebo y tolerantes se comportaron de forma similar, excepto en el plantar test, donde los tolerantes mostraron un ligero incremento en el tiempo que permanecieron sobre el dispositivo caliente, indicando la presencia de un cierto grado de analgesia. En la pata inflamada (CFA), los animales tolerantes presentaron analgesia respecto a los placebo en todos los tests: valores superiores en los tests de hiperalgesia (térmica y

mecánica), e inferiores en el test de Von Frey. Estos resultados insinúan que la morfina circulante en el plasma produjo un efecto anti-nociceptivo en estas condiciones experimentales. Los resultados también muestran que, excepto en el test de Randall y Selitto, el comportamiento nociceptivo de los animales tolerantes, cuando se evaluó la pata CFA, fue similar al de la pata CTL de los animales placebo.

Parámetros	CTL		CFA	
	Placebo	Tolerantes	Placebo	Tolerantes
Diámetro pata (mm)	3.24 ± 0.02 ^a	3.18 ± 0.02 ^a	4.19 ± 0.02 ^b	4.04 ± 0.04 ^c
Peso pata (mg)	190 ± 3.6 ^a	179 ± 3.8 ^a	287 ± 6.6 ^b	266 ± 4.1 ^c
Azul de Evans (UA/g)	1.09 ± 0.07 ^a	1.21 ± 0.06 ^a	2.00 ± 0.12 ^b	1.87 ± 0.11 ^b

Se muestran los valores de los diferentes parámetros (media ± EEM), siete días después del inicio de la inflamación y tres días después de la implantación del comprimido, en las patas contralateral (CTL) e inflamada (CFA) de animales placebo y tolerantes. Las letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre los grupos analizados, para cada parámetro ($P < 0.05$; test Student-Newman-Keuls).

Parámetros	CTL		CFA	
	Placebo	Tolerantes	Placebo	Tolerantes
Plantar test (s)	7.28 ± 0.14 ^a	8.55 ± 0.19 ^b	3.76 ± 0.14 ^c	7.70 ± 0.21 ^a
Randall Selitto (g)	157.5 ± 5.7 ^a	162.5 ± 4.9 ^a	68.4 ± 5.1 ^b	128.2 ± 6.1 ^c
Von Frey (AUC)	3449 ± 25 ^a	3325 ± 70 ^a	3630 ± 14 ^b	3463 ± 54 ^a

Se muestran los valores de los diferentes parámetros nociceptivos (media ± EEM), siete días después del inicio de la inflamación y tres días después de la implantación del comprimido, en las patas contralateral (CTL) e inflamada (CFA) de animales placebo y tolerantes. Para cada parámetro, las letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre los grupos analizados ($P < 0.05$; test Student-Newman-Keuls).

5. Efectos de la administración aguda de morfina subcutánea, sobre la nocicepción y la extravasación de plasma, en animales placebo y tolerantes.

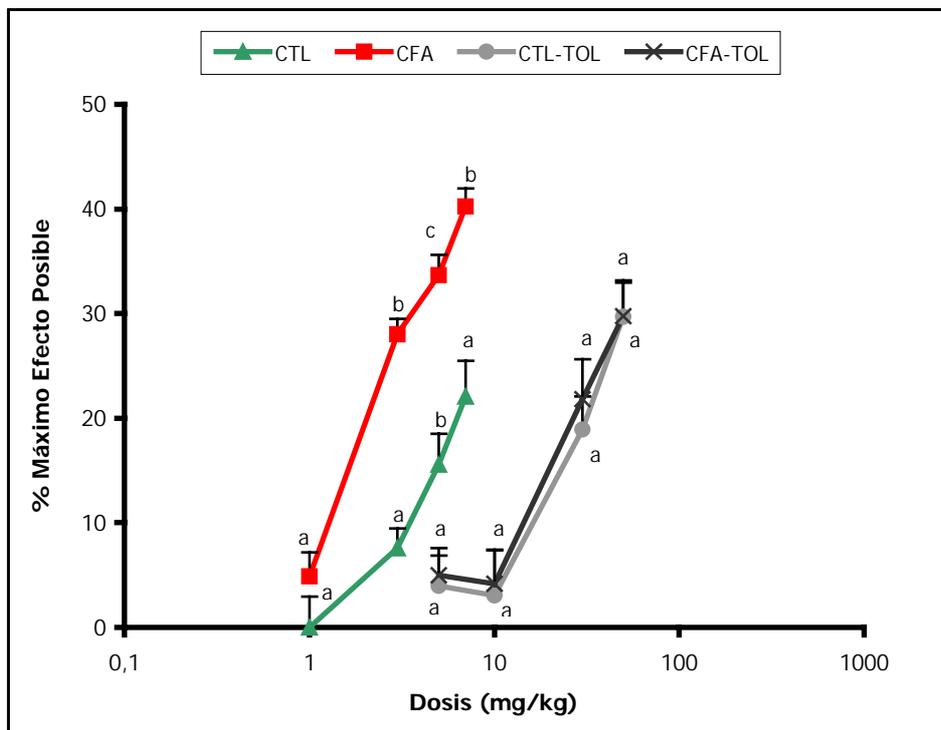
En animales placebo y tolerantes se determinaron los efectos de la administración aguda de morfina subcutánea sobre los tests nociceptivos (plantar test, Randall y Selitto, Von Frey) y sobre la extravasación de plasma. Estos experimentos demostraron cuantitativamente la presencia de tolerancia a la morfina, pues las dosis de morfina necesarias para producir un determinado nivel de efecto (por ejemplo el 50%, DE_{50}) en animales tolerantes fueron superiores que en animales placebo.

5.1. Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la hiperalgesia térmica.

En la figura 18 se muestran las relaciones D-R para la morfina en el plantar test, en las patas de animales placebo (CTL y CFA) y de animales tolerantes (CTL-TOL y CFA-TOL), siete días después del inicio de la inflamación. Los resultados indican que en todos los grupos de estudio la morfina inhibió la nocicepción de forma dosis-dependiente. En los animales placebo, el efecto de la morfina fue superior en la pata CFA que en la CTL, mientras que en los tolerantes no hubo diferencias significativas entre ambas patas. Por otra parte, en los animales tolerantes las curvas D-R a la morfina se desplazaron significativamente hacia la derecha.

Las curvas D-R obtenidas en los distintos grupos de estudio fueron analizadas por regresión lineal, obteniendo las rectas siguientes: CTL ($y = 40.0x - 11.8$), CFA ($y = 38.9x + 6.9$), CTL-TOL ($y = 37.4x - 34.7$) y CFA-TOL ($y = 36.7x - 32.5$). En la tabla 19 se muestran las DE_{50} obtenidas a partir de dichas rectas, y las relaciones entre ellas, en los diferentes grupos de estudio. Los resultados muestran que la inflamación aumentó dos veces la potencia de la morfina en animales placebo, pero este incremento no se observó en animales tolerantes. Por otra parte, la implantación de un pellet de morfina disminuyó la potencia de la morfina aproximadamente 4.5 veces en ausencia de inflamación y 7.5 veces en la pata inflamada.

Figura 18. Efecto anti-nociceptivo de la administración aguda de morfina en animales placebo y tolerantes en el plantar test.



Cada punto representa la media \pm EEM de entre 6-8 ratones. Las letras (a, b, c) indican diferencias entre grupos para cada dosis ($P < 0.05$; test t de Student cuando se comparan 2 grupos; test Student-Newman-Keuls cuando se comparan más de dos grupos). CTL y CFA: patas contralateral e inyectada con CFA en animales placebo. CTL-TOL y CFA-TOL: patas contralateral e inyectada con CFA en animales tolerantes.

Tabla 19. DE_{50} de la morfina en el plantar test de los diferentes grupos de estudio.

DE_{50}	CTL	CFA	Relación CTL / CFA
PLB	4.9 ± 0.1^a	2.6 ± 0.2^b	1.9
TOL	21.5 ± 0.4^c	19.8 ± 0.6^c	1.1
Relación TOL / PLB	4.4	7.6	

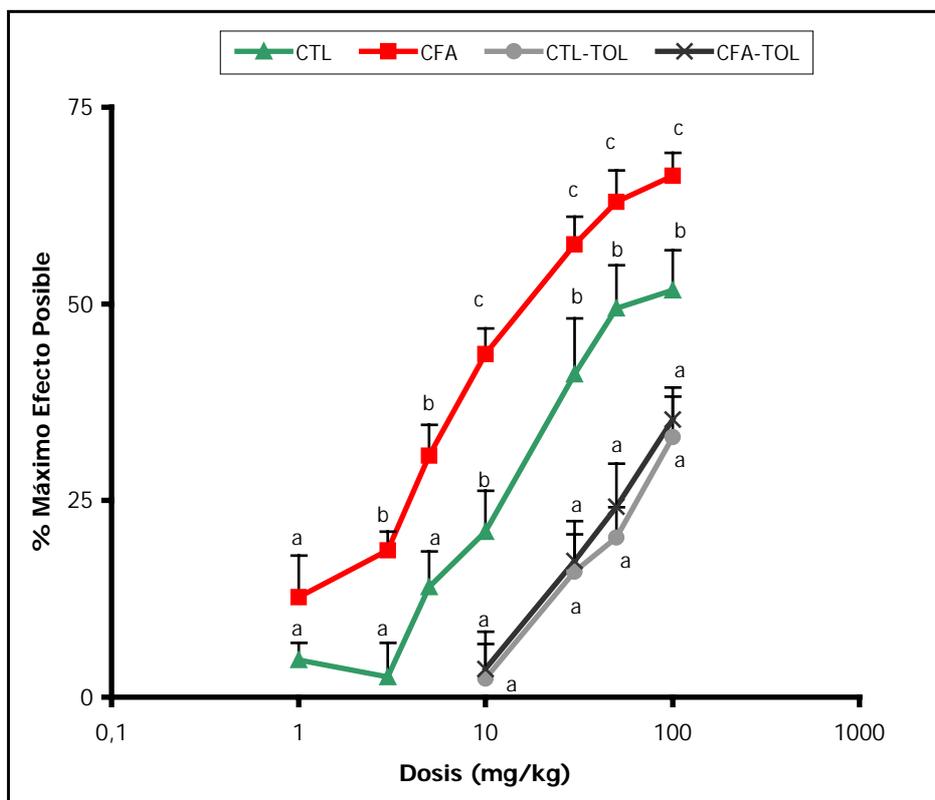
Se muestran las DE_{50} (mg/kg) \pm EEM, y sus relaciones para cada pata y condición experimental. Las letras (a, b, c) muestran los resultados del análisis ANOVA de las DE_{50} de los 4 grupos ($P < 0.001$; test Student-Newman-Keuls). CTL y CFA, patas contralateral e inyectada con CFA, respectivamente. PLB = placebo y TOL = tolerantes.

5.2. Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la hiperalgesia mecánica.

En este grupo de experimentos, se determinó el efecto anti-nociceptivo de la administración aguda de morfina subcutánea utilizando el test de Randall y Selitto. Se valoró la respuesta en las patas de animales placebo (CTL y CFA) y de animales tolerantes (CTL-TOL y CFA-TOL), a los siete días del inicio de la inflamación. Los resultados fueron similares a los obtenidos en el plantar test, y mostraron una relación dosis-dependiente de los efectos inhibitorios de la morfina en todas las condiciones experimentales. En los ratones placebo la anti-nocicepción producida por la morfina fue mayor en la pata CFA que en la CTL, mientras que en los tolerantes no hubo diferencias significativas entre la pata contralateral y la inflamada. En los animales tolerantes también se observó un desplazamiento hacia la derecha de las curvas D-R de la morfina respecto a las curvas obtenidas en animales placebo. Al comparar los 4 grupos experimentales entre sí para una misma dosis, se observaron diferencias significativas entre los animales placebo y los tolerantes ($P < 0.05$, test Student-Newman-Keuls; figura 19).

Del análisis por regresión lineal de las curvas D-R obtenidas en los distintos grupos se obtuvieron las rectas siguientes: CTL ($y = 29.1x - 4.7$), CFA ($y = 28.5x + 11.0$), CTL-TOL ($y = 29.8x - 28.0$) y CFA-TOL ($y = 31.5x - 28.5$). Del mismo modo que en el plantar test, la potencia de la morfina fue mayor en la pata CFA que en la CTL en los animales placebo, pero no en los animales tolerantes. La relación tolerante (TOL) / placebo (PLB) demostró la presencia de tolerancia tanto en la pata contralateral como en la pata inflamada, disminuyendo la potencia de la morfina, respecto a los animales placebo, aproximadamente 2.7 veces en la pata CTL y 5.1 veces en presencia de inflamación (tabla 20).

Figura 19. Efecto anti-nociceptivo de la administración aguda de morfina subcutánea en el test de Randall y Selitto.



Cada punto representa la media \pm EEM de entre 6-8 ratones. Las letras (a, b, c) indican diferencias entre grupos para cada dosis ($P < 0.05$; test *t* de Student cuando se comparan 2 grupos; test Student-Newman-Keuls cuando se comparan más de dos grupos). CTL y CFA: patas contralateral e inyectada con CFA en animales placebo. CTL-TOL y CFA-TOL: patas contralateral e inyectada con CFA en animales tolerantes.

Tabla 20. DE_{50} de la morfina tras su administración aguda, en el test de Randall y Selitto, en los diferentes grupos de estudio.

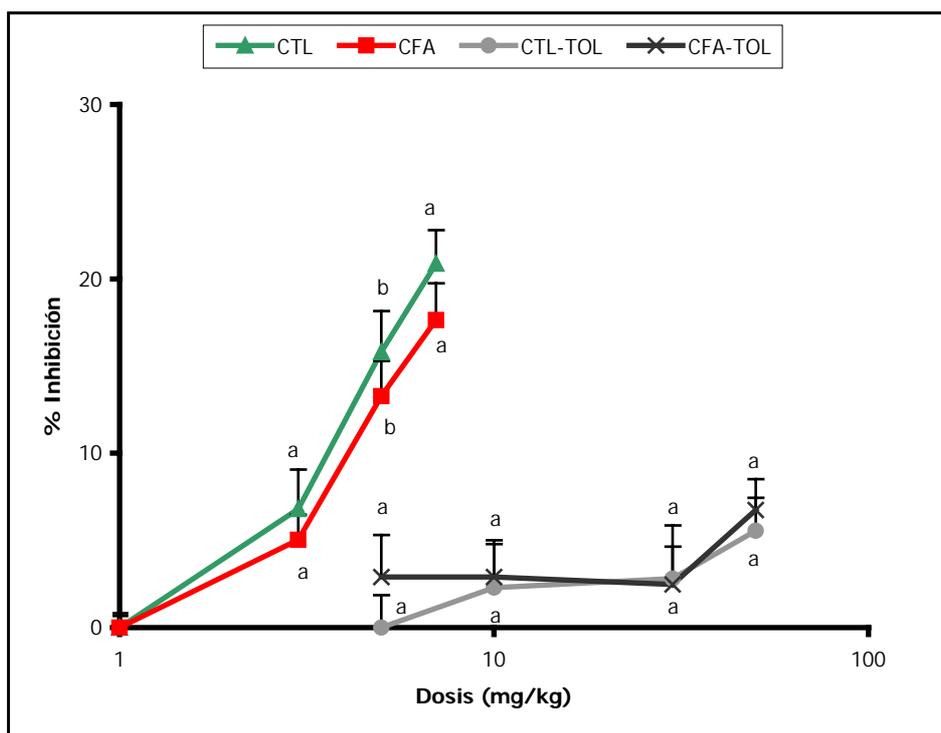
DE_{50} (mg/kg)	CTL	CFA	Relación CTL / CFA
Placebo	12.7 ± 0.3^a	6.5 ± 0.3^b	2.0
Tolerante	34.5 ± 0.6^c	33.1 ± 0.8^c	1.0
Relación TOL / PLB	2.7	5.1	

Se muestran las DE_{50} (mg/kg) \pm EEM y sus relaciones, para cada pata y condición experimental. Las letras (a, b, c) muestran los resultados del análisis ANOVA de las DE_{50} de los cuatro grupos ($P < 0.001$; test Student-Newman-Keuls). CTL y CFA: patas contralateral e inyectada con CFA, respectivamente. PLB = placebo y TOL = tolerantes.

5.3. Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la alodinia.

Estos experimentos evaluaron el efecto de la administración aguda de morfina subcutánea en el test de Von Frey, en animales placebo (patas CTL y CFA) y animales tolerantes (CTL-TOL y CFA-TOL), siete días después del inicio de la inflamación (figura 20). Los resultados muestran que la morfina inhibió la alodinia de forma D-R en las patas de los animales placebo, pero no en las de los animales tolerantes. El efecto anti-alodínico de la morfina fue similar en las dos patas, tanto en los animales placebo como en los tolerantes. En animales tolerantes (CTL-TOL y CFA-TOL) las curvas D-R se desplazaron hacia la derecha, pero debido al escaso efecto de la morfina en estas condiciones experimentales, no se pudieron obtener las DE_{50} .

Figura 20. Efecto de la administración aguda de morfina subcutánea en animales placebo y tolerantes, en el test de Von Frey.

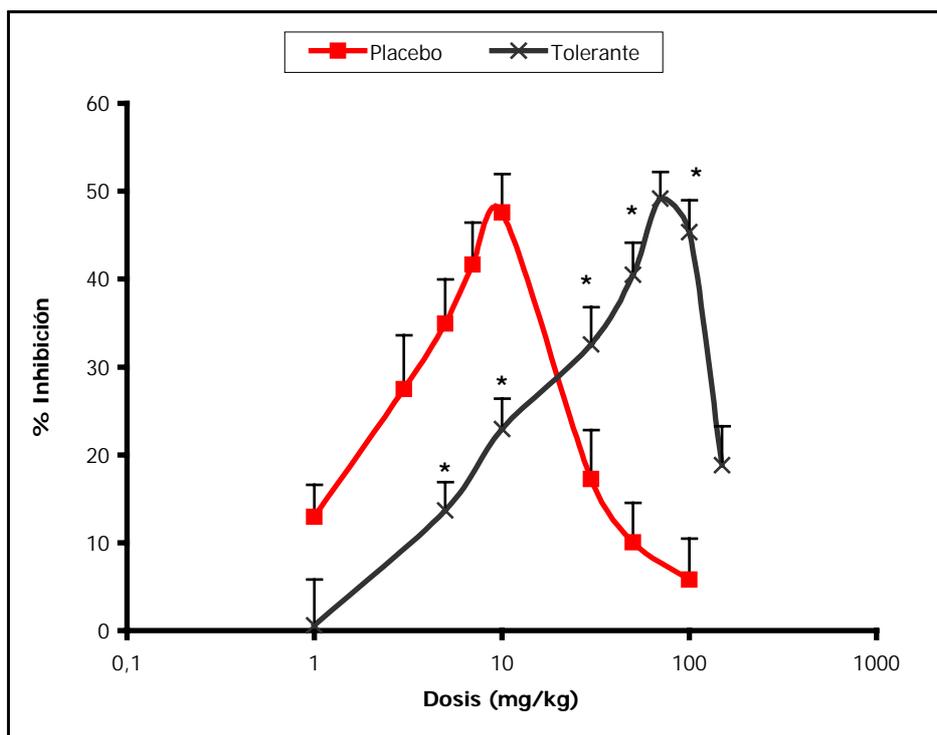


Cada punto representa la media \pm EEM de entre 6-8 ratones. No hubo diferencias al comparar las curvas D-R de las patas de animales placebo, ni tampoco entre las patas de los tolerantes ($P > 0.05$; test *t* de Student). Las letras (a, b) indican diferencias significativas entre los 4 grupos de estudio al comparar dosis iguales en las curvas ($P < 0.05$; test Student-Newman-Keuls). CTL y CFA: patas contralateral e inyectada con CFA en animales placebo. CTL-TOL y CFA-TOL: patas contralateral e inyectada con CFA en animales tolerantes.

5.4. Efecto de la administración sistémica de morfina sobre la extravasación de plasma.

En la figura 21 se representan las relaciones D-R obtenidas tras la administración aguda de morfina subcutánea sobre la extravasación de plasma en animales placebo y tolerantes, siete días después de la administración de CFA. En los animales tolerantes, la curva D-R a la morfina se desplazó hacia la derecha respecto a la obtenida en animales placebo.

Figura 21. Efecto de la administración aguda de morfina sobre la extravasación de plasma durante la inflamación inducida por CFA, en animales placebo y tolerantes.



Cada punto representa la media \pm EEM de entre 6-8 ratones. Se comparan los valores de los dos grupos de estudio para cada dosis. El * indica diferencias significativas al comparar dosis iguales en las dos curvas ($P < 0.05$; test t de Student).

En las dos condiciones experimentales la morfina tuvo un E_{max} similar, de aproximadamente el 50%, pero los animales tolerantes necesitaron dosis más altas de morfina para tener el mismo nivel de efecto. Los valores experimentales de las curvas fueron evaluados utilizando una regresión curvilínea con ajuste cuadrático. Las ecuaciones obtenidas fueron las siguientes: placebo ($y = -31.1x^2 + 52.9x + 13.6$), tolerante ($y = -9.6x^2 + 39.1x - 2.9$). De las dos soluciones de la ecuación de segundo grado resultante de la relación D-R, mostramos

(tabla 21) las DE_{50} de la morfina obtenidas a partir de los valores que forman la porción ascendente de las curvas, obtenidas con dosis bajas de morfina. Los resultados muestran que la tolerancia disminuyó aproximadamente cuatro veces la potencia inhibidora de la morfina sobre la extravasación de plasma (relación TOL / PLB).

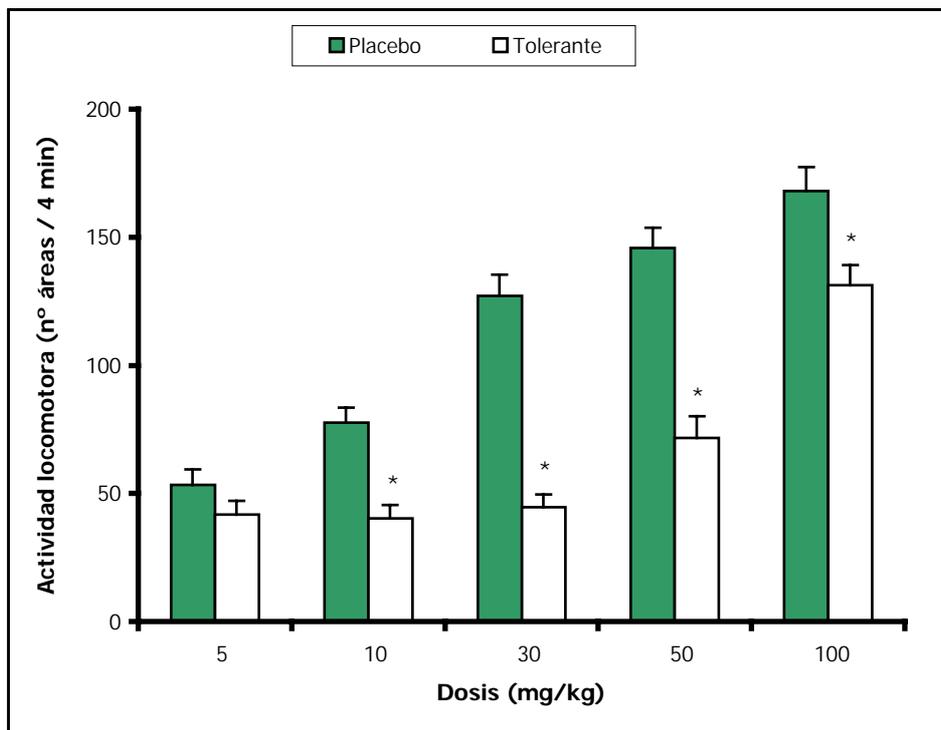
Tabla 21. DE_{50} de la morfina sobre la extravasación de plasma en animales placebo y tolerantes, durante la inflamación inducida por CFA.			
Grupo	Placebo	Tolerante	Relación TOL / PLB
DE_{50}	2.6 ± 0.2	$10.6 \pm 0.3^*$	4.1

*Se muestran las DE_{50} (media \pm EEM) y las relaciones obtenidas entre el grupo tolerante (TOL) y placebo (PLB). El * indica diferencias significativas entre los dos grupos ($P < 0.05$; t de Student).*

5.5. Efecto de la morfina sobre la actividad locomotora.

En el grupo de experimentos que describimos en este apartado se registraron los efectos de dosis crecientes de morfina sobre la actividad locomotora. Estos experimentos sirvieron como medida indirecta de la tolerancia, ya que en estos animales (tolerantes) fueron necesarias dosis más elevadas de morfina para inducir hiperactividad locomotora que en animales placebo. Los efectos de la morfina sobre la actividad locomotora en animales placebo y tolerantes se muestran en la figura 22. Para una misma dosis de morfina aguda, la actividad locomotora en animales tolerantes fue significativamente inferior a la de los animales placebo ($P < 0.05$; test t de Student), demostrándose la presencia de tolerancia a la morfina. Cabe mencionar que en los tests de Von Frey y plantar, las dosis de morfina a partir de las cuales fue imposible su realización fueron mayores de 50 mg/kg en animales tolerantes, mientras que en animales placebo fue a partir de 10 mg/kg. A dosis más altas, el nº de áreas recorridas por el animal fue muy elevado, impidiendo su habituación a ningún espacio.

Figura 22. Efecto de la morfina sobre la actividad locomotora en animales placebo y tolerantes, siete días después del inicio de la inflamación.



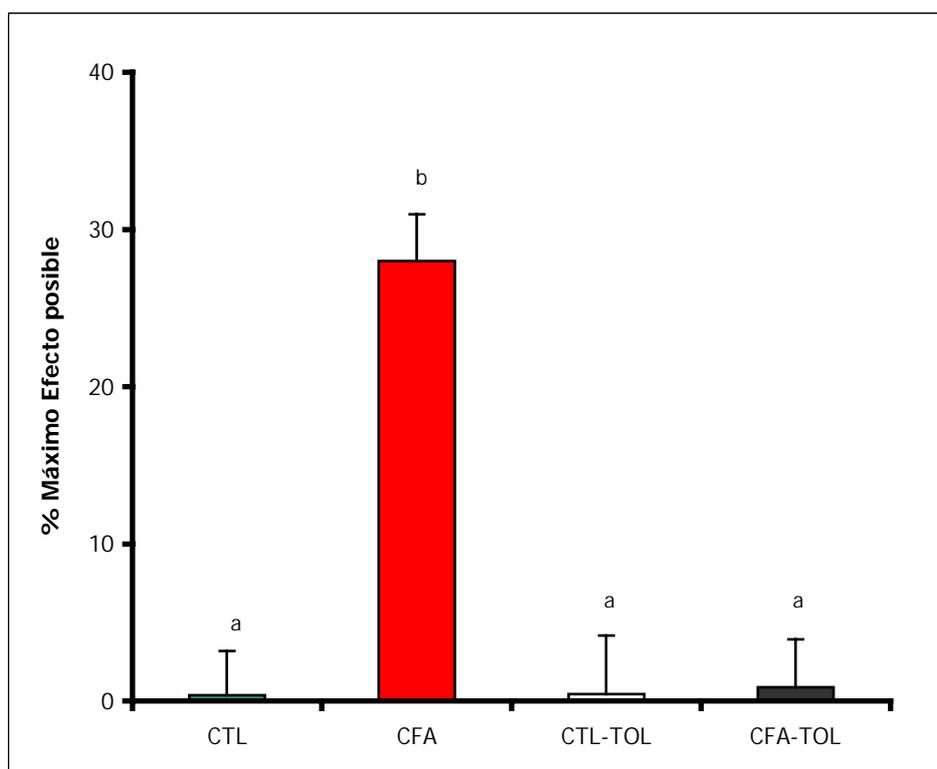
Se representan las medias \pm EEM del n° de áreas atravesadas en 4 minutos, de entre 6-8 ratones por dosis de morfina (mg/kg) evaluadas en animales placebo y tolerantes. Para cada dosis de morfina el * indica diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$; test t de Student).

6. Efecto de la administración aguda subplantar de morfina, en animales placebo y tolerantes.

El efecto de la administración subplantar de morfina sobre la hiperalgesia, se estudió para comprobar si los efectos aumentados de la morfina sistémica (vía subcutánea) durante la inflamación se producían por interacción con ROM periféricos, y valorar si estos receptores eran *funcionales* en animales tolerantes. Debido a que el pico de máximo efecto de la morfina administrada por vía subplantar es a los 5 minutos y la mayor parte de su efecto desaparece 30 minutos después (Stein y col, 1988c) estos experimentos fueron realizados utilizando el test de Randall y Selitto. En este test valoramos el efecto anti-nociceptivo producido por la administración subplantar de una dosis única de morfina (100 μ g) en animales placebo y tolerantes a la morfina, en presencia y ausencia de inflamación. La dosis de morfina fue

seleccionada a partir de estudios realizados por otros investigadores (Baamode y col, 2000; Perrot y col, 2001) y corresponde a una dosis de 4 mg/kg, que no supera las DE_{50} obtenidas en los experimentos de administración subcutánea de la morfina. En la figura 23 mostramos los efectos anti-nociceptivos de la administración local de 100 μ g de morfina en las patas de animales placebo (CTL y CFA) y de animales tolerantes (CTL-TOL y CFA-TOL), 7 días después del inicio de la inflamación. Los resultados muestran que en los animales placebo la morfina produjo un efecto anti-nociceptivo local sólo en la pata inflamada pero no en la pata CTL. En los animales tolerantes, la misma dosis de morfina no provocó efecto anti-nociceptivo alguno. Los mismos experimentos fueron realizados en animales sin inflamación, con y sin la implantación del comprimido de morfina, y no hubo diferencias significativas entre las patas de estos animales y las patas contralaterales de los animales inflamados (no se muestran los datos).

Figura 23. Efecto anti-nociceptivo de la administración local de morfina en el test de Randall y Selitto, en animales placebo y tolerantes, siete días después del inicio de la inflamación.



Se representan las medias \pm EEM de entre 6-8 ratones por grupo. Las letras (a, b) indican diferencias significativas entre los distintos grupos ($P < 0.05$, test de Student-Newman-Keuls).

7. Determinación de la expresión de receptores opioides μ durante la inflamación periférica y la tolerancia a la morfina.

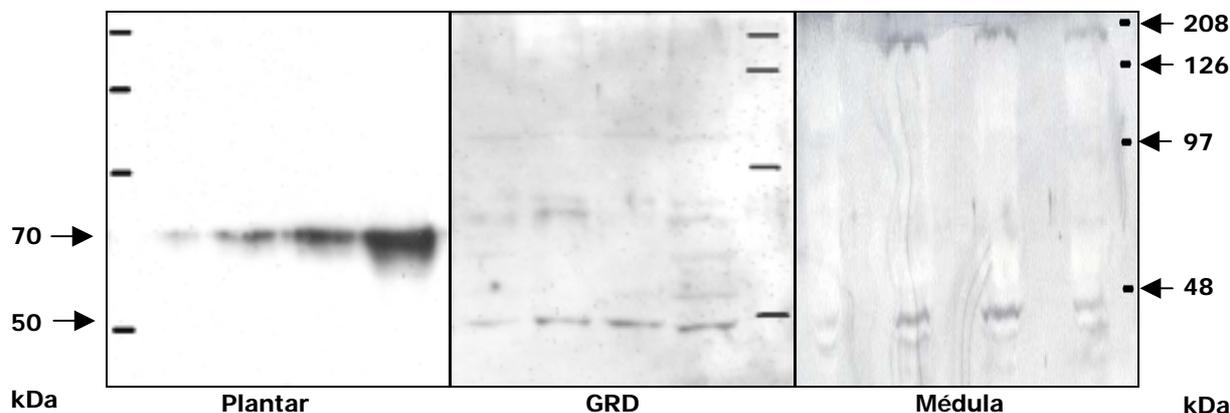
El objetivo de estos experimentos fue evaluar si el aumento en la expresión de ROM que ha sido demostrado durante la inflamación periférica (Shaqura y col, 2004) persistía durante la tolerancia opioide. Pretendíamos por otra parte buscar una correlación entre los resultados conductuales y los posibles cambios en la expresión de ROM en el ámbito central y periférico. Para ello se valoraron los niveles proteicos (Western blot) de ROM en las almohadillas plantares, en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) y en la médula espinal, de animales placebo y de animales tolerantes a la morfina, en ausencia y presencia de inflamación periférica. La inyección subplantar de CFA y la presencia de tolerancia opioide, cada uno individualmente, incrementó de forma significativa la expresión de ROM en todos los tejidos estudiados. El máximo aumento en la expresión de proteínas (ROM) se observó en el tejido plantar de animales con inflamación y tolerancia a la morfina.

7.1. Determinación de la expresión de receptores opioides μ en los distintos tejidos.

Para cada tejido se obtuvo un patrón de bandas diferenciado (figura 24); correspondientes de forma específica a los ROM, puesto que al realizar los controles negativos (sin alguno de los anticuerpos o la solución de detección) no se obtuvo ninguna señal. En la médula y en los GRD se observó una banda de 50 KDa que correspondería a la forma nativa del receptor (también se visualizó en algunas muestras de pata). En todos los tejidos se observó además una banda de aproximadamente 70 KDa, que correspondería a una forma glicosilada de la proteína receptora. En los GRD, además, se visualizaron a veces bandas intermedias, seguramente debidas a los procesos post-traduccionales en el cuerpo celular; y en la médula se observó también una banda de aproximadamente 170 KDa, que podría corresponder a una forma polimérica de la proteína además de otras posibles modificaciones post-traduccionales. Esta expresión diferenciada se produjo en todas las condiciones experimentales, pero no todas las bandas aparecieron regularmente. Debido a que tanto en la médula como en los GRD la banda expresada con mayor intensidad fue la de 50 KDa, y en el tejido plantar la de 70 KDa, la

determinación cuantitativa de la expresión de los ROM se realizó valorando la densidad óptica de estas dos bandas (50 KDa en la médula y los GRD, y 70 KDa en el tejido subplantar).

Figura 24. Comparación de los patrones de expresión de ROM en los distintos tejidos: almohadilla plantar, ganglios de la raíz dorsal (GRD) y médula espinal en las distintas condiciones experimentales.



Se muestra una membrana representativa del patrón de bandas obtenido en cada tejido (para 10 μ g de proteína total en la almohadilla plantar y 40 μ g en los GRD y la médula). Para cada membrana, las muestras corresponden de izquierda a derecha a las secciones CTL y CFA de animales placebo y tolerantes: CTL (1), CFA (2), CTL-TOL (3), CFA-TOL (4). Los estándares de peso molecular utilizados están indicados en la parte derecha de la figura y corresponden a: ovalbúmina (46 kDa), suero de albúmina bovino (97 kDa), β -galactosidasa (126 kDa) y miosina (208 kDa). Y a la izquierda (con flechas) se indican los pesos de 50 y 70 kDa que corresponden a las principales bandas detectadas.

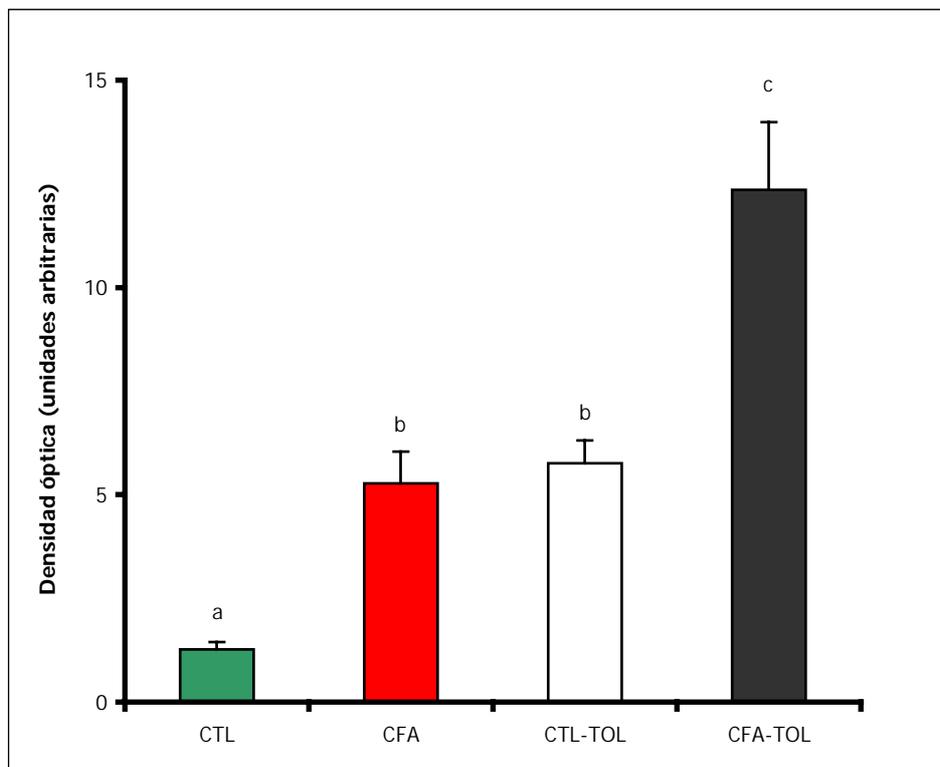
7.1.1. Expresión de receptores opioides μ en la almohadilla plantar.

La expresión de ROM fue evaluada en la almohadilla plantar de animales placebo y tolerantes, en presencia y en ausencia de inflamación. En la figura 25 se muestra una membrana representativa de los resultados obtenidos y una representación gráfica de las medias de las 6 determinaciones realizadas en las patas contralateral e inflamada de animales placebo (CTL y CFA) y tolerantes (CTL-TOL y CFA-TOL). La inflamación (CFA) y la tolerancia (CTL-TOL) individualmente aumentaron aproximadamente 4 veces los niveles proteicos de ROM, mientras que en animales con inflamación y tolerantes (CFA-TOL) este incremento fue de casi 10 veces ($P < 0.05$, test de Student-Newman-Keuls). Estos resultados sugieren que el aumento de ROM periféricos fue el responsable del incrementado efecto anti-nociceptivo producido por la morfina durante la inflamación. Sin embargo en animales tolerantes, no

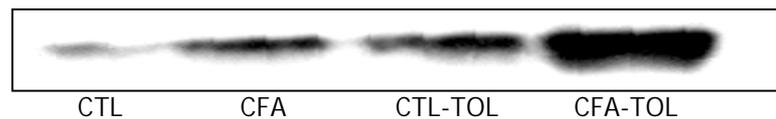
existió una correlación entre el aumento de ROM en periferia y el efecto de la morfina en los tests conductuales, lo que sugiere que estos receptores no eran funcionales (ver discusión). La comparación de la expresión de ROM también se realizó en las patas de animales sin inflamación (que no recibieron CFA) y las patas contralaterales de animales inflamados, así como entre las patas de animales tolerantes y las contralaterales de animales tolerantes e inflamados. Estos experimentos demostraron que la inflamación inducida por CFA (pata inflamada) no alteró la expresión de ROM en la pata contralateral.

Figura 25. Determinación de la expresión de ROM en las patas contralateral e inflamada de animales placebo (CTL, CFA) y tolerantes (CTL-TOL, CFA-TOL).

A.



B.



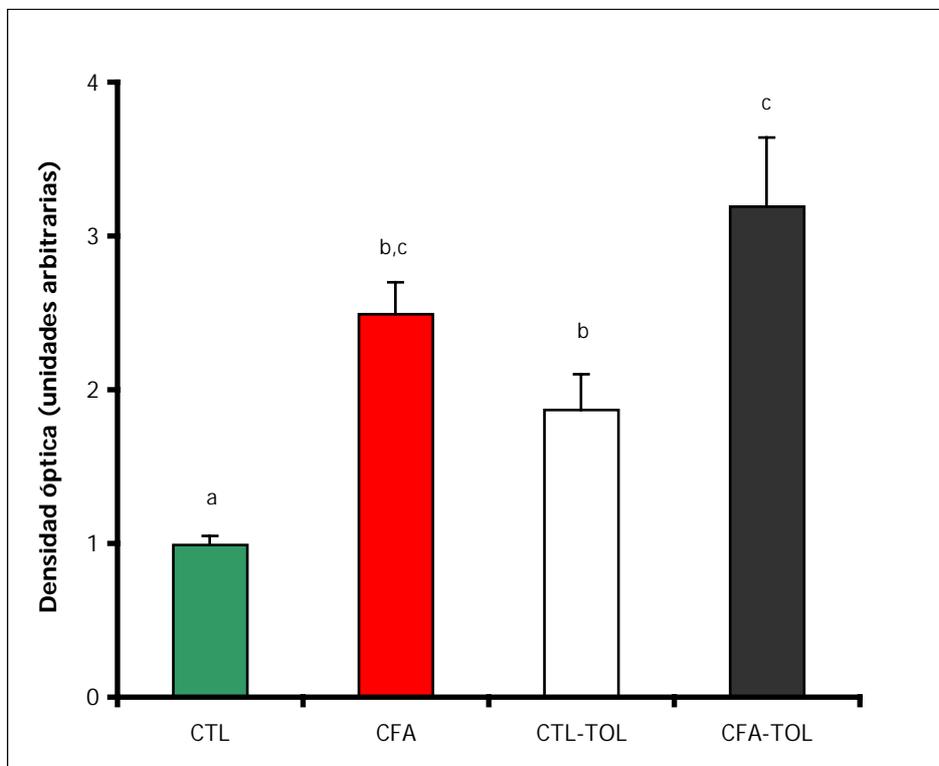
A. Se representan las medias \pm EEM de 6 inmuno-determinaciones. Las letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre los distintos grupos ($P < 0.05$, test de Student-Newman-Keuls). **B.** Membrana representativa de la determinación proteica de ROM en las patas de animales placebo y tolerantes, en presencia y ausencia de inflamación.

7.1.2. Niveles proteicos del receptores opioides μ en los ganglios de la raíz dorsal.

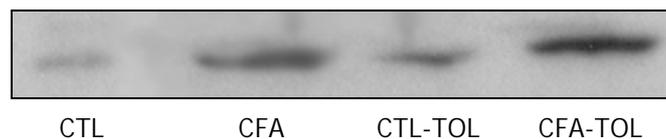
La expresión de ROM en animales placebo y tolerantes, en presencia y ausencia de inflamación, también se estudió en los GRD (figura 26). En este tejido, la inflamación (CFA) y la tolerancia (CTL-TOL), cada una individualmente, aumentaron la expresión de ROM entre 2.5 y 2.0 veces respectivamente. En animales con inflamación y tolerantes (CFA-TOL) este incremento fue significativamente superior (3.2 veces; $P < 0.05$, test de Student-Newman-Keuls).

Figura 26. Determinación de la expresión de ROM en los GRD contra e ipsilaterales de animales placebo (CTL y CFA) y tolerantes (CTL-TOL y CFA-TOL).

A.



B.



A. Se representan las medias \pm EEM de 6 inmuno-determinaciones. Las distintas letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$, test de Student-Newman-Keuls). **B.** Membrana representativa de ROM en los GRD de las secciones contralateral (CTL y CTL-TOL) e ipsilateral (CFA y CFA-TOL) a la inflamación, en animales placebo y tolerantes.

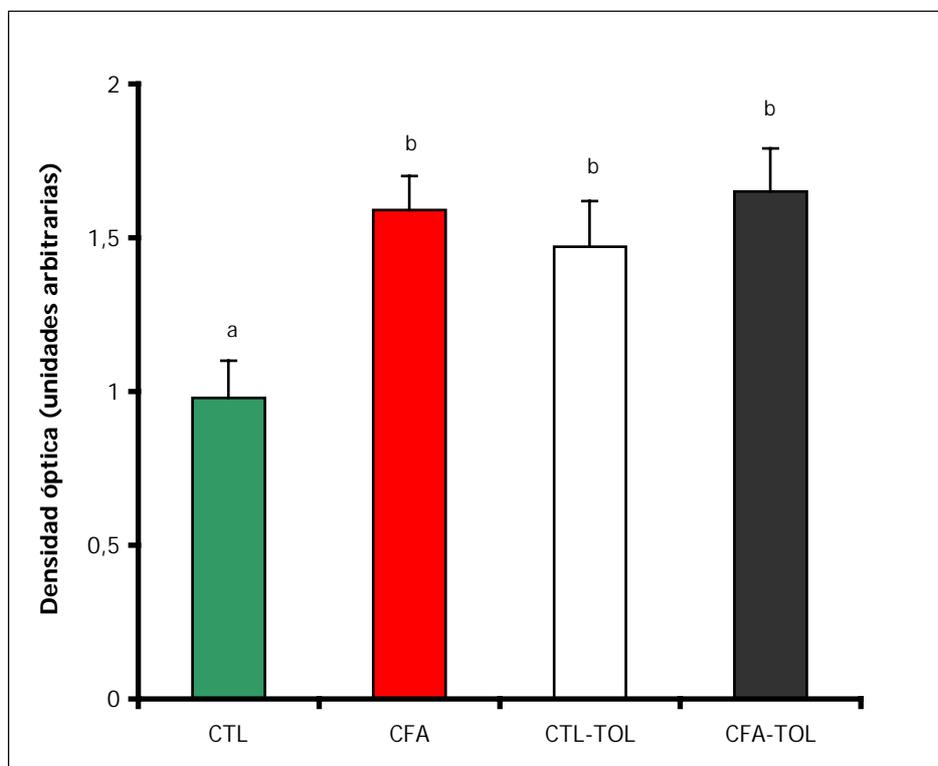
También se valoraron los niveles proteicos de ROM en los GRD de animales placebo y tolerantes sin inflamación, para compararlos con los contralaterales de animales placebo (CTL) y tolerantes (CTL-TOL) con inflamación articular. No se observaron diferencias significativas cuando se compararon los GRD de animales sin inflamación y los contralaterales de animales inflamados, de manera que la inflamación monoarticular, de la misma forma que en el tejido plantar, no alteró los niveles proteicos de ROM en los GRD contralaterales, ni de animales placebo ni tampoco de animales tolerantes a la morfina.

7.1.3. Determinación de los niveles proteicos de receptores opioides μ en la médula espinal.

Con el fin de valorar si la inflamación periférica y/o la tolerancia opioide modificaban los niveles proteicos de ROM en el ámbito espinal, se comparó la expresión de dichos receptores en la médula de animales placebo y tolerantes, en presencia y ausencia de inflamación. La figura 27 muestra una membrana representativa de los resultados obtenidos y una representación gráfica de las medias de las 6 determinaciones realizadas, en las secciones contra e ipsilateral a la inflamación de las médulas de animales placebo (CTL y CFA) y tolerantes (CTL-TOL y CFA-TOL). En los resultados se observa que tanto la inflamación monoarticular como la tolerancia opioide (individual y conjuntamente) aumentaron aproximadamente 1.5 veces la expresión de ROM en la médula espinal. Estos resultados indican que aunque el mayor incremento en la expresión de ROM se observó en el tejido inflamado (pata), también se observaron incrementos (menores) en las vías aferentes a la médula (GRD) y en la propia médula. No se obtuvieron cambios en la expresión de ROM al comparar los segmentos medulares contralaterales de animales placebo (sin y con inflamación), ni tampoco en animales tolerantes (sin y con inflamación), demostrando de nuevo que en nuestro modelo experimental la inflamación por CFA indujo únicamente cambios unilaterales.

Figura 27. Determinación de la expresión de ROM en los segmentos medulares, contra e ipsilateral a la inflamación, de animales placebo (CTL y CFA) y tolerantes (CTL-TOL y CFA-TOL).

A.



B.



A. Se representan las medias \pm EEM de 6 inmuno-determinaciones. Las letras (a, b) indican diferencias significativas entre los distintos grupos ($P < 0.05$, test de Student-Newman-Keuls). **B.** Se muestra una membrana representativa de la expresión de ROM en las secciones contralateral (CTL y CTL-TOL) e ipsilateral (CFA y CFA-TOL) a la inflamación de la médula de animales placebo y tolerantes.

A continuación discutiremos, o comentaremos, los resultados obtenidos en el estudio en el orden en que han sido presentados. Es decir, iniciaremos la discusión comentando el modelo utilizado con el fin de obtener una inflamación monoarticular en el ratón, seguida de la descripción de las características de la tolerancia a la morfina, hasta la expresión de ROM en animales con inflamación y tolerancia a la morfina.

En nuestro estudio hemos demostrado la presencia de **inflamación monoarticular** en el ratón por la presencia de: edema, que fue evaluado mediante el registro del diámetro del tobillo (utilizando un pie de rey) y el aumento del peso de la pata, y extravasación de plasma, que fue valorada por medio de la inyección intravenosa de azul de Evans. Puesto que la reacción inflamatoria va acompañada de una respuesta nociceptiva importante (dolor) se valoró también la presencia de hiperalgesia térmica (utilizando el plantar test) y mecánica (Randall y Selitto), así como de alodinia (Von Frey). Estos parámetros fueron estudiados debido a que, trabajos previos realizados por otros investigadores, han demostrado que los procesos inflamatorios agudos y crónicos pueden inducir una sensibilización central y periférica al dolor (Scholz y Wolf, 2002; Schaible y col, 2002). Dicha sensibilización va acompañada de hiperalgesia (que consiste en una respuesta aumentada frente a estímulos nociceptivos) y alodinia, que se manifiesta como una respuesta nociceptiva frente a estímulos inocuos (no-dolorosos). En nuestro modelo, no se evaluaron dos aspectos que también forman parte de la reacción inflamatoria local inducida por el CFA: la temperatura de la extremidad inflamada y los cambios tróficos producidos por el CFA sobre la articulación, cambios que han sido descritos con anterioridad por otros autores tanto en rata como en ratón (Larson y col, 1986; Bileviciute y col, 1995).

En nuestro trabajo, comparamos para cada *test* (nociceptivo o relacionado con la presencia de inflamación) los valores obtenidos en la pata inyectada con CFA (inflamada) con la pata contralateral (CTL) no inflamada. Utilizamos como control esta pata puesto que, después de la inyección de CFA, no pudimos demostrar ninguna alteración en la pata CTL, que mostró en todo momento unas características similares a las patas de animales que no recibieron ningún tipo de tratamiento; estos hallazgos coinciden con los de otros investigadores (Iadarola

y col, 1988; Donaldson y col, 1992; Hay y col, 1997). Aunque es un aspecto sobre el que existe cierta controversia, puesto que algunos autores no encuentran cambios en los parámetros físicos pero sí ligeras alteraciones en la respuesta nociceptiva en las patas CTL de animales con inflamación (Stein y col, 1988a; Hurley y Hammond, 2000; Nagakura y col, 2003). Cabe destacar que tanto la dosis del agente inflamatorio (CFA) como la duración total del estudio son determinantes para obtener los distintos resultados. De esta forma, hay autores que muestran que si la estimulación neuronal inducida (directa o indirectamente) por el agente inflamatorio supera ciertos límites, se excitan o activan también los nervios contralaterales (Donaldson y col, 1993). En el modelo, tampoco se puede excluir la activación de sistemas supra-espinales descendentes, que afectarían a toda la población de neuronas espinales y por tanto podrían modificar las respuestas en ambas patas del animal (Hurley y Hammond, 2001). En nuestro estudio, no observamos alteraciones en los umbrales nociceptivos de las patas CTL ni de las inyectadas con suero salino (SS), ya que ambas se comportaron como las controles. Sin embargo, estudios realizados en rata por nuestro grupo sí demuestran un aumento tanto del edema como de la hiperalgesia mecánica, tres horas después de la administración subplantar de SS (Planas y col, 1995). Este hecho podría estar en relación con el distinto tipo de animal utilizado y/o la duración de la inflamación. En nuestros experimentos, en ninguna de las condiciones estudiadas observamos diferencias en el comportamiento inflamatorio y nociceptivo entre las patas controles (no inyectadas), las inyectadas con SS, y las CTL a las tratadas con CFA, lo que nos permitió utilizar las patas CTL como controles, y por tanto reducir el número de animales utilizados.

Nos planteamos a continuación si la inflamación monoarticular podía tener consecuencias sobre el estado físico y el comportamiento de los animales, ya que en otros estudios se ha observado que la administración de dosis elevadas de CFA induce cambios en el resto del organismo. Dicho efecto sería debido a la liberación de distintos factores humorales a la circulación, tales como interleuquinas, las cuales están en relación con el aumento de la temperatura corporal y la sensación de malestar / astenia. Los ratones utilizados en el presente estudio presentaron un comportamiento nociceptivo espontáneo característico, puesto que resguardaron la pata inflamada evitando su contacto con el suelo; sin embargo, el resto de

parámetros evaluados no difirieron de los de animales control, con una evolución del peso y la temperatura corporal muy similares. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por otros autores en la mayoría de modelos de inflamación monoarticular por CFA, habiendo sido demostrado que la inflamación periférica no afecta al peso y la temperatura del animal (Larson y col, 1986; Butler y col, 1992; Donaldson y col, 1993; Andersen y Tufik, 2000). Sin embargo nuestros resultados difieren de los obtenidos por otros autores; así por ejemplo, Stein y col (1988a) observaron que ratas con inflamación monoarticular ganaron menos peso que animales control (sin inflamación), hecho que los autores atribuyeron a la anorexia inducida por la activación del factor de liberación de corticotropina (CRF) y del sistema opioide endógeno (consecuencia del estrés asociado al proceso inflamatorio), que se producen durante la respuesta inflamatoria periférica. En cuanto a los cambios en la temperatura corporal también existen resultados discordantes, puesto que algunos autores observan un aumento de la temperatura durante algunos periodos (especialmente en los primeros días) del proceso inflamatorio articular (Stein y col, 1988a; Philippe y col, 1997).

Como medida de una posible afectación sistémica inducida por la inyección subplantar de CFA, evaluamos también posibles alteraciones en el tránsito gastrointestinal de animales con y sin inflamación. Para ello utilizamos la administración intragástrica de carbón vegetal, valorando el recorrido del marcador en el intestino delgado, un método que ha sido ampliamente utilizado en nuestro laboratorio. Tampoco en este caso pudimos observar diferencias significativas entre los animales control y aquellos con inflamación monoarticular.

Sobre la base de estos resultados podemos concluir que la inyección subplantar de 30 μ l de CFA en el ratón induce una inflamación monoarticular que se localiza en la pata inyectada, sin que exista evidencia de la presencia de reacción sistémica alguna. En el modelo demostramos, por tanto, que la inyección de CFA comporta la aparición de una inflamación localizada, caracterizada por un aumento del diámetro, del volumen y de la extravasación de plasma de la pata inflamada, ésta última producida predominantemente por los efectos de los mediadores de la inflamación sobre la microvasculatura local. Por otra parte, la inflamación va acompañada de hiperalgesia térmica y mecánica, así como de alodinia mecánica, caracterizadas mediante los tests nociceptivos.

Respecto a la duración de la reacción inflamatoria local, ésta pudo ser demostrada (mediante los parámetros físicos y nociceptivos) a partir de las 4 horas (inflamación aguda) después de la inyección del agente inflamatorio y se mantuvo a lo largo de 14 días. Sin embargo, a los 14 días los valores de los distintos parámetros tendieron a disminuir, aunque sólo el peso de las patas y la alodinia lo hicieron de forma significativa. Estos hechos muestran que la lesión inflamatoria inducida por el CFA en nuestras condiciones experimentales tiende a revertir, desapareciendo primero la alodinia y después la hiperalgesia. Estos resultados corroboran los obtenidos por otros autores en diversos modelos experimentales de inflamación periférica inducida por CFA (Larson y col, 1986; Iadarola y col, 1988; Stein y col, 1988a).

Una vez caracterizado el modelo experimental de inflamación periférica, estudiamos **el efecto de la administración sistémica de morfina sobre la respuesta nociceptiva**, valorando también la hiperalgesia (térmica y mecánica) y la alodinia. Nuestros resultados muestran que en todos los tiempos de evaluación (4 h, 4, 7 y 14 días), el efecto anti-hiperalgésico de la morfina administrada por vía subcutánea fue significativamente mayor en la pata inflamada que en la contralateral.

Respecto al efecto anti-hiperalgésico, diversos trabajos han descrito que la inflamación aumenta la potencia de los agonistas opioides μ administrados por distintas vías (Stein y col, 1988b; Schäfer y col, 1995; Planas y col, 2000). Nuestros resultados muestran que la administración sistémica de morfina (agonista μ) indujo analgesia en las dos patas, la inflamada y la contralateral, pero que ésta fue mayor en la pata CFA. De esta forma, en los dos tests de hiperalgesia utilizados (plantar test y Randall y Selitto), la potencia de la morfina fue dos veces superior en la pata inflamada, incremento que pudo ser demostrado en todos los tiempos de estudio, desde las 4 horas hasta los 14 días después de iniciarse la inflamación. Existen muy pocos trabajos en la literatura que demuestren que la inflamación local aumenta la potencia de los opioides administrados de forma sistémica (Kayser y col, 1991; Planas y col, 2000). La mayoría de estudios demuestran un aumento en la potencia anti-nociceptiva de los opioides administrados localmente en la pata inflamada (Stein y col, 1988c; Perrot y col, 2001).

Respecto a los posibles mecanismos implicados en el incremento de la potencia de la morfina durante la inflamación periférica, pensamos que podrían ser distintos durante la inflamación aguda (4 horas después de la inyección del CFA) y crónica (7 días). En el primer caso (inflamación aguda), el incremento del efecto anti-nociceptivo de la morfina podría estar en relación con la *sensibilización* de ROM pre-existentes en las terminaciones nerviosas periféricas (aférentes sensoriales primarias). A favor de esta hipótesis tenemos que la inflamación, en sus primeros estadios, provoca alteraciones de la membrana perineural, que podrían facilitar el acceso de los agonistas opioides a los receptores (Antonijevic y col, 1995). Además, el proceso inflamatorio induce una disminución del pH local (acidosis), que incrementa la eficacia de los agonistas opioides, debido a un acoplamiento más efectivo de los RO con las proteínas G (Zhou y col, 1998). Por otra parte, los mediadores inflamatorios liberados localmente durante la inflamación aguda, activan la cascada de señalización intracelular del AMPc y aumentan la capacidad de los opioides para disminuir la excitabilidad de las neuronas previamente activadas (Stein, 1995). En resumen, podríamos decir que la inflamación aguda *sensibiliza* los ROM intracelulares periféricos localizados en las terminaciones sensoriales primarias, así como sus mecanismos efectores intracelulares.

En el presente trabajo, el incremento de la potencia anti-hiperalgésica de la morfina durante la inflamación crónica fue demostrado a los 4, 7 y 14 días. Pensamos que este incremento podría explicarse sobre la base del aumento en la expresión proteica de ROM demostrado en la almohadilla plantar de las patas inflamadas utilizando Western blot (figura 25). Aunque estos experimentos (Western blot) fueron realizados 7 días después de la inyección de CFA, es probable que incrementos similares en la densidad de ROM periféricos pudieran ser observados a los 4 y 14 días después de inducir la inflamación, ya que diversos estudios han demostrado un incremento en el número de ROM en la pata inflamada a partir de 3 días desde la inyección con CFA (Hassan y col, 1993; Mousa y col, 2001; Truong y col, 2003).

El aumento de la potencia anti-hiperalgésica de la morfina administrada por vía sistémica podría estar también en relación con un aumento en la expresión de ROM en la médula espinal. Es por ello que en nuestro estudio determinamos también los niveles de ROM en la médula, así como en los GRD, es decir, en los cuerpos celulares de las fibras aférentes

sensoriales primarias. A este nivel pudimos demostrar un aumento significativo en la densidad de ROM. Estos ROM (bien pre-existentes o de nueva formación) son transportados por vía axonal hacia la médula espinal y hacia el tejido inflamado (Ji y col, 1995; Zhang y col, 1998; Zöllner y col, 2003; Ballet y col, 2003), expresándose en las terminaciones nerviosas centrales y periféricas. Es interesante mencionar que, hasta el momento, no se ha demostrado un aumento del RNAm de los ROM en los GRD durante procesos inflamatorios periféricos (Schäfer y col, 1995), y por tanto se desconoce si la sobre-expresión de los ROM periféricos está en relación (o no) con la síntesis "*de novo*" de ROM. Sin embargo, estudios recientes indican que podrían existir ciertos cambios en los GRD de animales con inflamación inducida por CFA (Shaquira y col, 2004). Por otra parte, estudios realizados en cultivos celulares demuestran que ciertos mediadores inflamatorios, tales como algunas interleuquinas, incrementan los niveles de RNAm que codifica a los ROM y por tanto su síntesis (Kraus y col, 2001; 2003). Como hipótesis alternativa se ha postulado que en los GRD podría existir un "*pool*" o depósito de ROM pre-formados, y como respuesta a la lesión inflamatoria, los ROM viajarían mediante transporte axonal tanto al SNC (médula espinal) como a la periferia, donde serían expresados después de modificaciones post-transcripcionales (Hassan y col, 1993; Ji y col, 1995). En la médula espinal, nuestros resultados muestran un ligero aumento de la expresión de ROM en la sección ipsilateral a la inflamación. Estos resultados coinciden con los de otros autores (Besse y col, 1992; Przewlocki y Przewlocka, 2001; Ballet y col, 2003), pero discrepan de los obtenidos por Shaquira y col (2004), que no encuentran un efecto de la inflamación periférica sobre la expresión de ROM a este nivel. De todas formas, ha podido ser demostrado que durante la inflamación articular se produce un aumento tanto de la proteína del ROM como del RNAm de dichos receptores en la médula espinal (Maekawa y col, 1996) y se cree que las diferencias entre los resultados obtenidos por los distintos autores podrían estar en relación con la distinta sensibilidad de las técnicas utilizadas (Mousa y col, 2002). Por otra parte, hay autores que sugieren que de la misma forma que la inflamación aumenta el transporte axonal anterógrado de los ROM (desde los GRD hacia el tejido inflamado), podría disminuir el transporte retrógrado en la porción central de las fibras aferentes primarias, de manera que el aumento de ROM en la médula es menor del esperado (Ballet y col, 2003).

En resumen, nuestros resultados sugieren que el aumentado efecto anti-hiperalgésico producido por la morfina 7 días después de la inflamación se debe al incremento en la densidad (número) de ROM, localizados principalmente en el tejido inflamado.

En nuestro modelo, el efecto anti-hiperalgésico de la morfina en la pata CTL de un animal con inflamación articular y en la de un animal no-inflamado fue el mismo, por lo que, tal como se ha mencionado anteriormente, utilizamos como controles las patas contralaterales. Algunos trabajos indican que en situaciones de inflamación periférica prolongada (14 días), los efectos de los agonistas opioides en la pata CTL también están aumentados, debido a la activación de encefalinas endógenas a nivel supra-espinal, que modularían la función de vías descendentes inhibitorias sobre la transmisión nociceptiva (Hurley y Hammond, 2000; 2001). En nuestro trabajo no hemos considerado esta hipótesis, puesto que no se evaluaron los efectos de la morfina por vía supra-espinal. En cualquier caso, la administración subcutánea de morfina no reveló cambios en la potencia del fármaco en la pata CTL a lo largo del tiempo, y además, tampoco se observaron cambios en la expresión proteica de ROM en la pata CTL, ni en los GRD ni en las médulas contralaterales, a los 7 días del inicio de la inflamación monoarticular.

La morfina también inhibió la alodinia mecánica de forma dosis-dependiente. Pero a diferencia de la hiperalgesia, el efecto anti-alodínico de la morfina no presentó diferencias significativas entre las patas CFA y CTL. Los resultados muestran que la presencia de inflamación incrementó el efecto anti-hiperalgésico de la morfina, pero no modificó el efecto anti-alodínico. Estas diferencias podrían estar en relación con el agente farmacológico (morfina) estudiado, aunque cabe mencionar que los efectos de los opioides sobre la alodinia no están bien establecidos; la mayoría de estudios están realizados en modelos de dolor neuropático, donde en general se acepta que los opioides son menos eficaces que en otros tipos de dolor, como el inflamatorio (Poyhia y col, 1999; Lashbrook y col, 1999). En nuestro estudio, la morfina inhibió la alodinia de una forma dosis-dependiente, aunque con menor eficacia que sobre la hiperalgesia térmica y mecánica, corroborando los hallazgos de otros investigadores (Nagakura y col, 2003).

Se postula entonces que las diferencias observadas podrían tener su base en los distintos mecanismos de acción que participan en cada una de las respuestas (hiperalgesia,

alodinia), tales como los tipos de fibras aferentes implicadas y la activación de circuitos espinales y/o supra-espinales, entre otros (Ossipov y col, 1999). Algunos autores han postulado que la hiperalgesia se produce por una *sensibilización* de los nociceptores C/A δ de alto umbral de excitación. Estos nociceptores o terminaciones sensoriales aferentes primarias contienen ROM en las terminaciones periféricas, hecho que podría explicar el efecto inhibitorio de la morfina sobre la hiperalgesia. Como hemos mencionado anteriormente, el hecho que durante la inflamación aumente el número de ROM en las terminaciones periféricas, explicaría también el aumento del efecto anti-hiperalgésico de la morfina durante la misma. La alodinia, en cambio, se produce principalmente por la sensibilización de terminaciones nerviosas o fibras de tipo A β , fibras que poseen un bajo umbral de excitación mecánica y que no contienen ROM en sus terminaciones (Taddese y col, 1995; Cerveró y Laird, 1996; Cain y col, 2001; Silbert y col, 2003). De esta forma, el mecanismo de acción anti-alodínica de la morfina no sería periférico, sino predominantemente central, hecho que ha sido recientemente demostrado en un modelo de inflamación crónica inducida por CFA (Li y Zhao, 2003). Otros estudios muestran resultados similares en modelos animales de inflamación por CFA, es decir, la presencia de ROM en las terminaciones centrales y periféricas de las fibras aferentes sensoriales primarias tipo C, pero no en las fibras A β (Stein y col, 2001; Städer y col, 2002). Aparentemente, por tanto, el efecto anti-alodínico de la morfina se produce por interacción con ROM post-sinápticos, situados en la médula espinal en el nivel de las neuronas de segundo orden y en centros superiores del encéfalo. La estimulación de ROM en estos centros activaría circuitos neuronales supra-espinales que estimulan sistemas facilitadores e inhibidores descendentes, los cuales modulan la transmisión nociceptiva en la médula espinal. Es probable que estos sistemas descendentes participen también en la modulación de la hiperalgesia, aunque en este caso aparentemente predomina la regulación en el ámbito espinal que se lleva a cabo por medio de circuitos neuronales localizados (Bian y col, 1998; Ossipov y col, 1999).

La participación de ROM centrales (y no de receptores periféricos) en el efecto anti-alodínico de la morfina pudo ser demostrado en el presente trabajo mediante la administración de antagonistas específicos de los ROM. De esta forma, el efecto anti-alodínico de la morfina fue completamente bloqueado por la NX (antagonista opioide μ de acción central y periférica)

tanto en la pata CTL como en la CFA. Sin embargo, la administración de un antagonista de acción preferentemente periférica (NXME) no fue capaz de revertir los efectos de la morfina sobre la alodinia en ninguna de las condiciones experimentales, demostrando que el efecto anti-alodínico de la morfina se produce por interacción con ROM localizados preferentemente en el SNC (Li y Zhao, 2003).

En cambio, los efectos anti-hiperalgésicos de la morfina durante la inflamación periférica se deben a la interacción del opioide con ROM situados tanto en el ámbito central como periférico. En nuestros experimentos, la administración de NX bloqueó completamente el efecto anti-hiperalgésico de la morfina en la pata inflamada, mientras que la NXME revirtió su efecto en aproximadamente un 60% (figuras 12 y 13). Estos resultados indican que el efecto inhibitorio de la morfina en la pata inflamada está mediado por interacción con ROM centrales y periféricos. En la pata CTL, la NX también antagonizó íntegramente los efectos de la morfina en los dos tests de hiperalgesia realizados. En cambio, la NXME no fue capaz de revertir los efectos anti-nociceptivos de la morfina en el plantar test, mientras que los bloqueó totalmente en el test de Randall y Selitto. Aunque no tenemos una interpretación para explicar este hecho, pensamos que debido a la reducida magnitud de los efectos de la morfina en la pata CTL, es posible que el resultado esté afectado por la sensibilidad de la técnica. Sin embargo, los resultados no pueden excluir que en el efecto anti-hiperalgésico de la morfina en el plantar test durante la inflamación por CFA intervengan otros mecanismos.

La participación del componente central y periférico en los efectos anti-nociceptivos de la morfina en animales con inflamación monoarticular, se evaluó también, valorando el efecto sobre la hiperalgesia mecánica (test de Randall y Selitto) producido por una dosis fija (100 μ g) de morfina administrada localmente, es decir, por vía subplantar. Esta dosis fue seleccionada a partir de estudios realizados por otros investigadores (Baamode y col, 2000; Perrot y col, 2001) y corresponde a una dosis de 4 mg/kg, si fuera administrada por vía sistémica. Es por tanto una dosis inferior a las DE_{50} obtenidas tras la administración subcutánea de morfina en el mismo test (12.8 y 6.3 mg/kg para las patas CTL y CFA, respectivamente); se pretendía evaluar si la administración subplantar de 100 μ g de morfina producía un efecto anti-hiperalgésico en las distintas condiciones experimentales, que estaría producido por la activación directa de los ROM

situados en la pata inflamada (Shook y col, 1987). Nuestros resultados muestran que la administración subplantar de una dosis única de morfina en la pata inflamada inhibió (aproximadamente un 30%) la hiperalgesia mecánica. Mientras que la administración de morfina en la pata CTL no produjo ningún efecto. Estos resultados contrastan con los obtenidos mediante la administración subcutánea de morfina: una dosis de 4 mg/kg produjo un efecto inhibitorio de aproximadamente un 12% en la pata CTL y un 30% en la pata CFA. Por tanto, nuestros resultados indican que la morfina (100 μ g) administrada en la pata inflamada activa ROM localizados en el tejido plantar y expresados "*de novo*" durante la inflamación. Los efectos anti-nociceptivos aumentados de la morfina durante la inflamación se producen preferentemente por interacción con ROM periféricos (Rodrigues y Duarte, 2000).

Diversos hechos sugieren la implicación del SOE en la modulación de la respuesta inflamatoria local, como es la presencia de POE en las células inmunes (macrófagos, linfocitos T, etc.), que infiltran los tejidos periféricos durante la inflamación (Rittner y col, 2001; Brack y col, 2004). Estas células expresan RO y también son capaces de sintetizar y liberar localmente POE (en el tejido inflamado). El papel fisiológico que desempeñan los POE en la modulación inhibitoria del proceso inflamatorio no se conoce con exactitud. Aparentemente podrían interactuar con RO situados en las terminaciones nerviosas sensoriales y simpáticas, inhibiendo a este nivel la transmisión nociceptiva (Schäfer y col, 1997; Mousa y col, 2003). Por otra parte, los POE liberados localmente podrían unirse a RO situados en las células inmunes e inhibir la liberación de mediadores de la inflamación; esta hipótesis está siendo investigada en la actualidad por miembros de nuestro grupo de investigación. El posible papel fisiológico que desempeña el SOE durante la hiperalgesia inducida por CFA pudo ponerse en evidencia, de forma indirecta, después de la administración de antagonistas opioides para el ROM. La administración de NX y NXME, cada uno individualmente, fue capaz de inducir hiperalgesia térmica (pero no mecánica) en la pata inflamada. Este hecho demuestra que durante la inflamación periférica, los POE ejercen un papel inhibitorio sobre la respuesta nociceptiva frente a un estímulo térmico. Otros estudios, realizados tanto por nuestro grupo (Planas y col, 1995; 2000) como por otros investigadores (Stein y col, 1995), han demostrado que el SOE ejerce además un control inhibitorio sobre el edema y la hiperalgesia mecánica. La discrepancia entre

estos trabajos y nuestros resultados actuales respecto a la hiperalgesia mecánica podrían estar en relación con el animal utilizado (rata, ratón) y/o las distintas condiciones experimentales.

Los **efectos de la administración sistémica de opioides sobre la inflamación** se estudiaron valorando la extravasación de plasma. En primer lugar comentaremos que, para este parámetro, no se compararon los efectos de la morfina entre las patas inflamadas y contralaterales, ya que el azul de Evans es administrado por vía endovenosa y alcanza todos los territorios vasculares (pata inflamada y no inflamada). De esta forma, la extravasación de plasma inducida por el proceso inflamatorio, se calcula restando el azul presente en la pata CTL del azul de Evans extravasado en la pata inflamada (ver material y métodos).

En presencia de inflamación periférica, la morfina inhibió la extravasación de plasma de forma dosis-dependiente, interaccionado predominantemente con ROM periféricos. De momento, no se conoce el mecanismo exacto a través del cual se produce este efecto inhibitorio. Sin embargo, se ha postulado que la activación de ROM (por la acción de opioides endógenos o exógenos), situados en las terminales periféricas, podría inhibir la liberación de neuropéptidos pro-inflamatorios tales como el CGRP o la sustancia P. En este sentido, los POE que se liberan a partir de las células inmunes que infiltran el tejido inflamado, podrían tener un papel importante en la modulación de la reacción inflamatoria local (Philippe y col, 2003; Walker, 2003; Brack y col, 2004). También se ha demostrado la existencia de ROM en las células del endotelio vascular, que al ser activados, disminuyen el tamaño de los espacios intercelulares donde se produce la extravasación de plasma (Stefano y col, 1995; Valle y col, 2001). Por tanto, es probable que la morfina administrada por vía sistémica, produzca su acción inhibitoria sobre la extravasación de plasma por interacción con ROM situados principalmente en el ámbito periférico. Es posible que el aumento en la densidad de ROM que observamos durante la inflamación esté en relación con el incremento de ROM situados tanto en el ámbito neuronal (terminaciones sensoriales) como extra-neuronal (células inmunes y endotelio vascular). Todos ellos podrían jugar un papel importante en la modulación inhibitoria de la extravasación de plasma, durante la inflamación inducida por CFA en el ratón (Joris y col, 1990; Barber, 1993; Perrot, 1999b; Stein y col, 2001).

El efecto inhibitorio de la morfina sobre la extravasación de plasma fue bifásico, hecho que ha sido puesto en evidencia por otros investigadores. Estos autores sugieren que este fenómeno podría estar en relación con estados de baja y alta afinidad del receptor, debido a cambios conformacionales que alteran su configuración; o bien a la activación de diferentes subtipos de ROM, puesto que existen múltiples variantes provenientes del "*splicing*" (Ferreira y Nakamura, 1979; Pasternak, 2001). De esta forma, la administración sistémica de morfina induce un efecto inhibitorio a dosis bajas, mientras que a dosis más elevadas este efecto tiende a desaparecer. Este tipo de respuesta bimodal a la morfina se ha observado no sólo sobre la inhibición de la extravasación de plasma, sino también respecto a otras acciones, tales como la inhibición de la liberación de sustancia P, que como hemos mencionado anteriormente, también está implicada en la extravasación inducida por el proceso inflamatorio (Suárez-Roca y Maixner, 1995; Lei y Rogers, 1999). Al margen de los mecanismos que pueden participar en el fenómeno, el comportamiento bimodal de la morfina sobre la extravasación de plasma parece tener relevancia en el ámbito clínico, ya que las dosis (altas) en las que desaparece el efecto sobre la extravasación son muy superiores a las dosis analgésicas utilizadas en práctica clínica (en ausencia de tolerancia). Es por ello que, por lo general, se acepta que a dosis analgésicas la morfina posee un efecto anti-extravasación importante.

La naturaleza opioide de los efectos de la morfina sobre la extravasación de plasma, así como el lugar predominante de acción (central, periférico) y la posible implicación del SOE, se estudiaron mediante la administración de los antagonistas NX y NXME. Ambos fármacos fueron capaces de bloquear completamente el efecto de la morfina sobre la extravasación. La completa reversión del efecto de la morfina por el antagonista de acción periférica NXME demostró que este efecto se produjo por interacción con ROM periféricos. Por otra parte, los antagonistas opioides administrados individualmente no modificaron (aumentaron) la extravasación de plasma en la pata con CFA, lo que indicaría que los POE liberados localmente no participan en la modulación fisiológica de la extravasación (pero sí de la nocicepción). Cabe mencionar que estos experimentos se efectuaron a los siete días desde el inicio de la inflamación y que en este momento la extravasación de plasma es menor que a las 4 horas (inflamación aguda), hecho que probablemente limita la sensibilidad del método. Por otra parte, experimentos realizados

por nuestro grupo en modelos de inflamación aguda (3 horas) demuestran que el SOE ejerce un control inhibitorio sobre el edema y la extravasación de plasma, controlando la salida de fluidos al espacio intersticial (Planas y col, 1995; 2000; Puig y col, 2002).

La caracterización de la aparición y desarrollo de **tolerancia a la morfina durante la inflamación periférica** se estudió después de la implantación subcutánea de un comprimido de morfina (75 mg) en animales inyectados con CFA. El método que hemos empleado en el presente estudio para inducir tolerancia ha sido ampliamente descrito en la literatura y utilizado con anterioridad por nuestro grupo (Pol y Puig, 1997). La implantación de un comprimido (pellet) subcutáneo de morfina libera el opioide de forma constante a la circulación, induciendo tolerancia sin periodos intermitentes de abstinencia ni cambios discontinuos en el comportamiento nociceptivo, observados cuando se usan inyecciones diarias de la droga para producir tolerancia (Gutstein, 1996; Li y Clark, 2002). También se ha demostrado que se desarrolla tolerancia de manera similar a otros métodos, como la implantación espinal de mini-bombas osmóticas de morfina, sin limitar la aparición de tolerancia sólo en el ámbito del SNC (Dunbar y Pulai, 1998; Vanderah y col, 2001).

Con el fin de comprobar que la absorción de morfina a partir del comprimido inducía niveles plasmáticos elevados del opioide, se realizaron determinaciones de morfina en plasma a lo largo del tiempo. Nuestros resultados muestran que los niveles plasmáticos de morfina fueron elevados a partir de las 24 horas, que el pico de morfina en plasma se alcanzó dos días después de la implantación del comprimido, y que los niveles se mantuvieron elevados hasta el tercer día desde la implantación, iniciando un descenso progresivo en días sucesivos. Estos resultados nos permitieron garantizar que los animales estaban bajo los efectos del opioide durante tres días y con unas concentraciones que consideramos suficientemente adecuadas para la inducción de tolerancia (Wang y col, 2002). Por otra parte, estudios realizados por nuestro grupo, así como por otros grupos de investigación, han demostrado que tres días después de la implantación subcutánea de un comprimido de 75 mg de morfina, los ratones presentan tolerancia a los efectos anti-nociceptivos de la morfina y síntomas de abstinencia tras la administración de naloxona (Pol y Puig, 1997; Smith y col, 1999; Bohn y col, 2000).

Sobre la base de estos resultados, se decidió llevar a cabo el presente estudio tres días después de la implantación del comprimido de morfina. Los niveles plasmáticos de morfina fueron similares en animales sin y con la inyección de CFA, hecho que eliminó la posibilidad de que la inflamación modificara la cinética de la morfina, y aseguró unas condiciones experimentales similares en los grupos de animales control y tratados con el agente inflamatorio, implantados ambos con el comprimido de morfina.

La presencia del comprimido de morfina subcutánea durante tres días produjo cambios sistémicos y conductuales en los animales, relacionados con la aparición de tolerancia opiode. De esta forma, al cabo de 1 hora se observó que los animales presentaron el fenómeno de Straub en la cola, que se caracteriza por una elevación de la misma de forma perpendicular al cuerpo, y una actividad locomotora aumentada, ambos fenómenos relacionados con las elevadas concentraciones de morfina en el plasma. Diferentes estudios han podido establecer que este comportamiento está mediado por la activación de ROM, situados predominantemente a nivel supra-espinal (Nath y col, 1994), y que tras la administración continuada (crónica) de morfina aparece tolerancia a este efecto (Zarrindast, 2001). Este hecho pudo ser confirmado en el presente estudio, puesto que tres días después de la implantación del comprimido, tanto el fenómeno de Straub como la hipermotilidad desaparecieron. Aparecieron sin embargo otros cambios en el estado físico de los animales, tales como alteraciones en el pelaje (que permanecía encrespado y poco reluciente), una conducta exploratoria disminuida, pérdida de peso y disminución de la temperatura corporal. Estos hallazgos han sido descritos anteriormente por otros investigadores, y se piensa que están relacionados con el efecto de la administración crónica de morfina sobre la liberación y niveles de ciertos factores de estrés (corticosterona, interleuquinas, etc.), que pueden alterar la actividad locomotora, los patrones de ingesta, el ritmo circadiano térmico, etc. (Sparber y col, 1979; Koob y col, 1998; Houshyar y col, 2001; Wang y col, 2002). Cuando estos animales tolerantes a la morfina recibieron una dosis alta de morfina (tratamiento agudo) por vía sistémica, apareció también el fenómeno de hipermotilidad descrito anteriormente. Sin embargo, en estos animales, para poner en evidencia este efecto fue preciso administrar dosis de morfina mucho más elevadas que en los animales placebo, lo que demostró la existencia de un proceso de adaptación a este fenómeno, es decir,

que se desarrolló tolerancia al mismo. La valoración de este fenómeno tiene importancia en el presente estudio, puesto que la hipermotilidad observada con dosis de morfina iguales o superiores a 10 mg/kg en animales placebo, y superiores a 50 mg/kg en animales tolerantes, fue el principal inconveniente que dificultó el poder completar las curvas D-R en el plantar test y el test de Von Frey. En nuestro caso, la valoración de este parámetro nos permitió una primera aproximación para validar el modelo de inducción de tolerancia a la morfina en el ratón mediante la implantación subcutánea de un comprimido de 75 mg de morfina.

Otro aspecto que utilizamos para poner en evidencia los efectos inducidos por la implantación del pellet de morfina fue el demostrar la presencia de dependencia opioide. Aunque posiblemente la dependencia y la tolerancia sean fenómenos disociables, la valoración de la dependencia en este modelo es un buen indicador de tolerancia a la morfina. De esta forma, la aparición de un síndrome de abstinencia después de la administración de antagonistas opioides, indica la presencia de tolerancia a la morfina en estos animales (Zeitz y col, 2001). Por tanto, además de los cambios descritos sobre el comportamiento, la presencia de tolerancia fue demostrada tras la administración de una dosis de 10 mg/kg de naloxona por vía subcutánea. La naloxona fue administrada tres días después de la implantación del comprimido de morfina y provocó un síndrome de abstinencia, que apareció inmediatamente después de su administración, caracterizado por agitación, incremento de la actividad espontánea, temblores, diarrea y saltos compulsivos (Bohn y col, 2000).

Los parámetros que reflejan la presencia de inflamación en los animales inyectados con CFA (peso / diámetro de la pata, extravasación de plasma) fueron evaluados en animales tolerantes y placebo, siete días después de la inyección del agente inflamatorio. De forma similar a lo que ocurre en animales no tolerantes, el peso / diámetro de la pata inflamada de los animales tolerantes aumentaron de forma significativa respecto a los valores basales, aunque en menor proporción que en los animales placebo (tabla 17). Sin embargo, el incremento en la extravasación de plasma fue similar en animales placebo y tolerantes. Estos resultados sugieren que niveles plasmáticos elevados de morfina mantenidos durante un determinado periodo de tiempo (tres días) disminuyen ligeramente, aunque de forma significativa (aproximadamente un 5%), el edema de la pata inflamada (evaluado por los cambios en el peso y diámetro de la

pata), pero no modifican la extravasación de plasma. Podríamos afirmar por tanto que durante la tolerancia opioide el edema podría estar disminuido, aunque no a expensas de la extravasación de plasma. Nuestros resultados son parecidos a los obtenidos por otros autores que estudian parámetros similares en modelos de tolerancia opioide en presencia de inflamación, y observan que el diámetro de las extremidades aumenta durante la inflamación de manera similar en animales placebo y tolerantes a la morfina (Honoré y col, 1997). Por último, nuestros resultados muestran que las patas contralaterales a las inflamadas, en animales placebo y tolerantes, presentaron un comportamiento similar, por lo que pudimos utilizar las patas CTL de animales tolerantes como controles, evitando de esta forma el uso innecesario de animales de experimentación.

En ausencia de inflamación, la implantación de un comprimido de morfina indujo tolerancia, pero no modificó el comportamiento nociceptivo frente a estímulos mecánicos (test de Randall y Selitto, Von Frey); sin embargo, disminuyó ligeramente (aunque de forma significativa) el comportamiento nociceptivo frente a un estímulo térmico (ligera analgesia en el plantar test). Estos resultados están en desacuerdo con los hallazgos de otros investigadores, que observan que la administración crónica de opioides induce hiperalgesia y alodinia (Celérièr y col, 2001; Li y col, 2001). Sin embargo, corroboran los obtenidos en otros trabajos que estudian el fenómeno de la tolerancia opioide en ausencia de inflamación, y demuestran que tres días después de la implantación del comprimido de morfina, los animales placebo y tolerantes presentan una respuesta similar frente a distintos estímulos nociceptivos (Dunbar y Pulai, 1998; Bohn y col, 2000). Es probable que estos resultados contradictorios estén en relación con el modelo utilizado para inducir tolerancia a los opioides. De esta forma, la administración discontinua de opioides mediante inyecciones diarias, o la interrupción de la administración del opioide después de una infusión continua, producen periodos intermitentes de abstinencia acompañados de hiperalgesia, alodinia y en algunos modelos dolor espontáneo, respuestas que aparentemente forman parte de los cambios adaptativos compensatorios que ocurren debido a la estimulación o activación crónica de los RO (Gutstein, 1996; Zeitz y col, 2001; Li y Clark, 2002). En nuestro modelo experimental, el efecto de la morfina fue continuo, ya que ésta se liberaba de forma constante a partir del comprimido subcutáneo, y los

experimentos se llevaron a cabo sin eliminar el comprimido, hecho que podría enmascarar los fenómenos de excitabilidad e hiperactividad neuronal que pueden aparecer tras la administración continua de opioides exógenos.

Al analizar los resultados obtenidos en animales tolerantes en presencia de inflamación, observamos que no hubo hiperalgesia térmica ni alodinia, y su comportamiento nociceptivo fue similar al observado en animales normales, es decir, sin inflamación ni tolerancia. Este hecho indicó que, después de la administración crónica de morfina, hubo un cierto grado o nivel de analgesia, o que probablemente desaparecieron la hiperalgesia / alodinia inducidas por la inflamación. Este hecho también pudo ser observado respecto a la hiperalgesia mecánica pero en menor magnitud (tabla 18). Estos resultados podrían explicarse debido a la activación simultánea de mecanismos pro- y anti-nociceptivos que se produce en presencia de una inflamación periférica crónica; estos mecanismos incluyen la activación o estimulación del SOE, que conlleva entre otros aspectos, un aumento de la expresión de ROM (Shaqura y col, 2004). Sin embargo, tal como se ha mencionado anteriormente, la administración crónica de morfina también induce una sensibilización o "up-regulation" de los sistemas pro-nociceptivos, principalmente a través de los receptores del NMDA, responsables de los efectos excitadores (hiperalgesia, alodinia) de los opioides (Trujillo y Akil, 1995; Mayer y col, 1999; Mao y col, 1995; 2001). Hasta el momento no se conocen con precisión los mecanismos implicados en el desarrollo de tolerancia opioide durante la inflamación, siendo éste de los primeros trabajos que plantea estudiar las características del desarrollo de tolerancia crónica a los opioides en presencia de un proceso inflamatorio también crónico. Por otra parte, existen serias dificultades, tal como se ha comentado anteriormente, para comparar los resultados de los distintos trabajos publicados en la literatura, a causa por ejemplo de los distintos diseños experimentales. En éstos, varía no sólo la especie animal estudiada (rata, ratón, primate, etc.) sino también la ruta / periodicidad / duración de la administración crónica de los opioides, entre otros parámetros (Hsu y Wong, 2000; Celérièr y col, 2001; Raghavendra y col, 2002).

Sin embargo, si quisiéramos simplificar la situación que aparece después de la administración crónica de morfina respecto a los efectos cuantificables mediante los tests de nocicepción (pro-nociceptivo, anti-nociceptivo), observamos que los ratones con inflamación y

tolerancia a la morfina se comportaron *normalmente*, es decir, como animales placebo sin inflamación. Este es un hecho interesante, puesto que tanto la inflamación como la tolerancia, cada uno de ellos individualmente, se ha descrito que pueden inducir hiperalgesia / alodinia y sin embargo, cuando ambos factores concurren desaparecen dichos efectos. Hay autores que postulan que durante la tolerancia a la morfina, si los niveles plasmáticos de la misma son elevados se observa un estado que podría considerarse *de equilibrio*, en el que los efectos o acciones medidas por los sistemas pro-nociceptivos están enmascarados por los de los sistemas anti-nociceptivos endógenos (opioides entre otros). De esta forma se alcanzaría un nivel homeostático aparente, de tal forma que si se retira el opioide se ponen de manifiesto los mecanismos compensatorios, manifestándose abiertamente la hiperalgesia (Nestler y Aghajanian, 1997; Li y col, 2001). Es decir, que según esta hipótesis el comprimido de morfina que utilizamos en nuestro estudio, después de tres días en que consideramos al animal tolerante, podría estar atenuando tanto la hiperalgesia inducida por la inflamación como la inducida por la tolerancia. Nuestros resultados sugieren efectivamente que en presencia de inflamación y tolerancia se llega a un estado de adaptación que podría considerarse *de equilibrio*, ya que se obtuvieron valores similares entre las patas CFA de animales tolerantes y las patas CTL de animales placebo. De esta forma, pensamos que tanto la hiperalgesia inducida por la inflamación, como los posibles cambios adaptativos resultantes de la administración crónica de morfina, serían contrarrestados por el efecto anti-nociceptivo inducido por la liberación de morfina al plasma a partir del comprimido de morfina.

Este hecho, por otra parte, nos impidió determinar el papel de la presencia previa de inflamación en la activación de los mecanismos pro-nociceptivos por la tolerancia a la morfina. Hay autores que sostienen que en presencia de dolor persistente (crónico) se agravan la hiperalgesia y la alodinia que aparecen durante el síndrome de abstinencia, es decir, que posiblemente ocurre una sinergia en la activación de los mecanismos pro-nociceptivos por los dos fenómenos (Raghavendra y col, 2002). En el mismo sentido, es posible que si el número de ROM está aumentado por la presencia de inflamación, se desarrolle tolerancia de una forma más rápida y eficaz. De acuerdo con esta hipótesis, durante la tolerancia, los RO ocupados por los agonistas (morfina por ejemplo) permanecerían acoplados a las cascadas de segundos

mensajeros, induciendo cambios adaptativos celulares específicos y por tanto, a mayor número de RO mayor tolerancia. Un ejemplo característico sería el aumento de los niveles de AMPc inducidos por la activación exagerada de la AC que se produce durante la tolerancia opioide (He y col, 2002), sin que de momento se conozca el papel exacto que desempeña el exceso intracelular del segundo mensajero sobre la tolerancia. Sin embargo, existen trabajos que se posicionan en el sentido contrario, es decir, que piensan que la tolerancia se desarrolla de forma similar en animales con y sin inflamación (Rahman y col, 1993; Honoré y col, 1997); se sugiere si acaso que la presencia previa de inflamación podría ser un adyuvante en el desarrollo de la tolerancia, facilitando su aparición, pero al parecer sin afectar a su *intensidad* (Gutstein y col, 1995; Li y col, 1999). De hecho, se postula que existe un umbral de dolor a partir del cual, aunque aumente la estimulación (por la concurrencia de los dos fenómenos), no se pueden observar variaciones en la *potencia* de la hiperalgesia (Zeitzy y col, 2001). En todo caso, por último, cabe mencionar que no se pueden discriminar específicamente los efectos de uno y otro factor (inflamación, tolerancia) y cuantificar de forma individual la contribución de cada uno, ya que es posible que ambos estén relacionados a través de sustratos neuronales y cascadas de señalización comunes (ver introducción: Mayer y col, 1999; Li y Clark, 2002).

Los efectos anti-nociceptivos y anti-extravasación de la **administración aguda de morfina**, administrada por vía sistémica, disminuyeron tanto en la pata CTL como en la CFA de animales implantados con un comprimido de morfina, hecho que demostró la presencia de tolerancia opioide. De esta forma, las curvas dosis-respuesta se desplazaron hacia la derecha, ya que fueron necesarias dosis mayores de morfina para obtener el mismo efecto que en animales placebo (control); corroborando los hallazgos de otros investigadores en modelos similares (Honoré y col, 1997; Smith y col, 1999; Bohn y col, 2002). En nuestro estudio, la tolerancia a la morfina se desarrolló tanto en presencia como en ausencia de inflamación, aunque posiblemente fue más pronunciada en animales con inflamación, ya que en los animales tolerantes desapareció el incremento en la potencia de la morfina inducido por el CFA. Así por ejemplo, cuando se evaluó el efecto inhibitorio de la morfina sobre la hiperalgesia térmica, observamos que la implantación del comprimido disminuyó aproximadamente 4.4 veces la

potencia de la morfina (administración aguda) en las patas CTL (sin inflamación), mientras que en las patas inflamadas la potencia disminuyó 7.6 veces (tabla 19). Por otra parte, los resultados también muestran que los efectos de la morfina fueron los mismos en presencia y en ausencia de inflamación: en los animales tolerantes no hubo diferencias en las respuestas anti-nociceptivas a la morfina en condiciones control y durante la inflamación (figura 18). De manera que, simplemente, se puede concluir que tanto los ROM presentes en los tejidos periféricos como los sintetizados "*de novo*" durante la inflamación, fueron tolerantes a los efectos de la administración aguda de morfina.

Para confirmar esta hipótesis evaluamos también en nuestro modelo los efectos anti-nociceptivos de la morfina administrada localmente, por vía subplantar. Estos experimentos se llevaron a cabo, además, con el fin de establecer si los ROM que se sobre-expresaron durante la inflamación y la tolerancia a la morfina, como se comenta más adelante, respondían a la administración local de morfina, es decir, si eran (o no) funcionales. En nuestro estudio pudimos observar que la administración subplantar de 100 µg morfina indujo un efecto anti-hiperalgésico (test de Randall y Selitto) en la pata inflamada de animales no-tolerantes de aproximadamente un 30%. Sin embargo, la misma dosis de morfina subplantar no provocó un efecto significativo en ninguna de las otras condiciones experimentales, es decir, cuando se inyectó en las patas CTL de animales placebo o tolerantes, o en la pata CFA de animales tolerantes con inflamación (figura 23). Estos resultados muestran que una dosis baja de morfina indujo analgesia local en presencia de inflamación, pero que esta misma dosis fue insuficiente para inducir analgesia en animales tolerantes a la morfina (con o sin inflamación). Los resultados demuestran, por tanto, que los ROM periféricos también fueron tolerantes a la morfina.

En distintos modelos animales, sin y con inflamación, ha sido demostrado que la administración crónica de morfina induce tolerancia tanto para los efectos centrales como periféricos, de tal forma que el efecto anti-nociceptivo de una determinada dosis de morfina subplantar desaparece si los animales reciben el fármaco de forma crónica (Kolesnikov y col, 1996; Aley y Levine, 1997b; Honoré y col, 1997). También se ha postulado que la inducción de tolerancia opioide es más pronunciada en el sistema nervioso periférico que en el central

(Kolesnikov y col, 1999), sin que este hecho haya podido ser demostrado de forma definitiva. De esta forma, otros autores piensan que no existe tolerancia a la analgesia opiode periférica en presencia de inflamación (Ueda y Inoue, 1999; Nozaki-Taguchi y Yaksh, 1999). Este hecho podría ser explicado sobre la base de una liberación local continua de POE a partir de las células inmunes (que producen anti-nocicepción), ya que los POE no inducen tolerancia (Stein y col, 1996; 2001). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo indican que en presencia de inflamación periférica se desarrolló tolerancia a la morfina, tanto central como periféricamente, puesto que los ROM presentes en el tejido inflamado, aunque incluso estaban aumentados, no eran funcionales.

La **expresión de ROM** se estudió valorando los niveles proteicos de los receptores en la almohadilla plantar, los GRD y la médula espinal de animales tolerantes a la morfina, en presencia y ausencia de inflamación. Los niveles proteicos de ROM fueron determinados por Western blot, y en nuestras condiciones experimentales pudimos obtener un patrón de bandas similar al obtenido por otros autores (Bernstein y Welch, 1998; Mousa y col, 2001; Pol y col, 2001). La banda de aproximadamente 50 KDa, que se corresponde con el peso molecular conocido del receptor clonado se observó en todos los tejidos, aunque mientras que en el tejido plantar no siempre se pudo observar, su expresión fue consistente e intensa en los GRD y en la médula espinal, y fue la que se determinó por densitometría. En el tejido plantar, la otra banda de aproximadamente 70 KDa fue la que se observó con especial intensidad y se utilizó para la cuantificación por densitometría. De hecho, en la almohadilla plantar, esta banda (70 KDa), cuyo mayor peso molecular se atribuye a modificaciones post-traduccionales (siendo la más frecuente la glicosilación), indica que las proteínas (ROM) provienen de los cuerpos celulares, y que por transporte axonal terminan localizadas en las terminales periféricas donde han sido determinadas.

Con la técnica utilizada en el presente trabajo para determinar la concentración de ROM (Western blot), no es posible comparar los contenidos absolutos de expresión de estos receptores en los diferentes tejidos. Sin embargo, cualitativamente sí se observa, por ejemplo, que en presencia de inflamación y/o tolerancia a la morfina, la expresión de ROM fue superior

en el tejido plantar que en los GRD y la médula espinal. Otros autores, utilizando técnicas de "binding" e inmunohistoquímica, demuestran que en el SNC (hipotálamo) hay una mayor densidad de ROM constitutivos, y que su densidad disminuye progresivamente en la médula espinal y en tejidos periféricos (GRD) (Buzas y Cox, 1997; Shaqura y col 2004). Sin embargo, independientemente del contenido absoluto de ROM en cada tejido estudiado, éstos y otros autores también observan que el aumento de ROM producto de la inflamación, es mayor en periferia que en la médula espinal. En cuanto a la tolerancia a la morfina, también se ha observado que, en estas condiciones experimentales, el incremento de expresión de ROM en la médula espinal es mayor que en el cerebro (Mousa y col, 2002; Shaqura y col 2004).

En el presente estudio, nuestro objetivo principal fue establecer si el aumento en la expresión de ROM observado durante la inflamación periférica persistía, o no, en presencia de inflamación más tolerancia a la morfina. También pretendíamos establecer una posible correlación entre los resultados conductuales y los cambios en la expresión de ROM en el ámbito espinal y/o periférico. Al revisar los experimentos conductuales pudimos observar que el incremento del efecto anti-nociceptivo de la morfina inducido por la inflamación no se observó en animales tolerantes (con inflamación), lo que nos hizo pensar que la expresión de ROM podría estar disminuida (o inalterada) en estas condiciones experimentales. Sin embargo, los niveles proteicos de ROM aumentaron significativamente en animales tolerantes a la morfina tanto en ausencia como en presencia de inflamación, y en todos los tejidos estudiados (almohadilla plantar, GRD y médula espinal). El mayor aumento en la expresión de ROM se observó en la almohadilla plantar y los GRD de animales inflamados y tolerantes, mientras que en la médula espinal este aumento fue comparable al observado en los animales tolerantes sin inflamación (figuras 25-27).

Como ya se ha comentado anteriormente, la inflamación aumentó la expresión de ROM tanto en periferia como en la médula espinal, siendo este incremento mucho más acentuado en el lugar de la inflamación. La tolerancia, por su parte, aumentó también la expresión de ROM en nuestras condiciones experimentales, de tal forma que, cuando evaluamos la expresión de dichos receptores en presencia de inflamación más tolerancia, podría pensarse que los incrementos fueron aditivos. Este hallazgo fue muy evidente en la almohadilla plantar, pero su

intensidad disminuyó progresivamente a nivel de los GRD y de la médula espinal. Podría pensarse que a medida que nos aproximamos a niveles superiores de regulación en el SNC, aumenta la complejidad de los procesos adaptativos inducidos tanto por la inflamación como por la tolerancia. O bien que la mayor densidad previa de ROM observados en periferia (tejido subplantar durante la inflamación) provocaría aumentos mayores (He y col, 2002). De momento no tenemos explicación alguna sobre la posible función que tiene la sobre-expresión de ROM en presencia de inflamación más tolerancia observada en tejidos periféricos, aunque es posible que esta sobre-expresión sea consecuencia de los procesos adaptativos (plasticidad neuronal) inducidos por la lesión inflamatoria y/o la exposición prolongada a la morfina. También desconocemos la localización exacta de los ROM que se sobre-expresan en estas condiciones experimentales, es decir, si están situados en un nivel neuronal o extra-neuronal (células inmunes, vasos sanguíneos). Aunque pensamos que es probablemente en el ámbito neuronal donde podría producirse el principal aumento en la expresión de ROM.

En la literatura, existen resultados contradictorios respecto a los efectos de la tolerancia sobre la expresión de ROM. Algunos autores demuestran que la administración crónica de morfina aumenta la expresión de ROM tanto en el cerebro como en la médula espinal (Besse y col, 1992; Tejwani y col, 1998; Fabian y col, 2002; 2003); mientras que otros demuestran lo contrario (Bernstein y Welch, 1998; Chichewitz y col, 2001). En cuanto a los efectos de la administración crónica de morfina sobre la transcripción génica de los ROM, también existen resultados discordantes: desde la ausencia de cambios en los niveles de RNAm del ROM observados en el cerebro (Brodsky y col, 1995; Buzas y col, 1997; Castelli y col, 1997) hasta una disminución significativa de éstos en distintas zonas del sistema nervioso (GRD, médula, etc.) (Chen y col, 1997; Meuser y col, 2003). Probablemente, los distintos modelos de inducción de tolerancia, los patrones de administración de morfina, el tiempo de exposición a la misma, entre otros factores, podrían explicar estos resultados contradictorios.

Actualmente está aceptado que la "*down-regulation*", o disminución del número de ROM neuronales, no es un factor importante en el desarrollo de tolerancia. Hay autores que demuestran que los agonistas opioides regulan de forma diversa los ROM (tráfico intracelular, etc.), de forma que por ejemplo fármacos como la etorfina y la morfina inducen la aparición de

tolerancia a sus efectos anti-nociceptivos, pero sólo la etorfina provoca una disminución de la densidad de ROM a nivel de la membrana neuronal, aparentemente relacionada con la internalización del receptor (figura 6; Patel y col, 2002). Efectivamente se ha demostrado que la morfina no promueve una internalización eficiente de los ROM (Keith y col, 1996), y se postula que, de hecho, la internalización y reciclaje de los ROM es un mecanismo que podría disminuir la aparición de tolerancia opioide (He y col, 2002; Kieffer y Evans, 2002). Agonistas opioides capaces de inducir la internalización de los receptores evitarían la unión prolongada agonista-receptor, y en consecuencia, una activación continuada de las cascadas de señalización intracelular responsables de la activación de mecanismos adaptativos, tales como: superactivación del sistema PKA-AC-AMPC, alteraciones en proteínas reguladoras de los ROM (β -arrestina) o de las proteínas G (RGS), etc. (Nestler y Aghajanian, 1997; Whistler y von Zastrow, 1998; Garzón y col, 2001; Bohn y col, 2000; 2002).

Un hecho que podría explicar (al menos en parte) el aumento en la expresión de ROM que observamos en animales con inflamación más tolerancia, podría estar en relación con el hecho que ciertos mediadores inflamatorios como las citoquinas y algunos componentes de las cascadas de señalización intracelular, activan la transcripción de los ROM. Aunque actualmente se desconoce cuales son los principales responsables del incremento en la expresión de ROM durante la inflamación periférica, estudios realizados en cultivos celulares han demostrado que algunas citoquinas liberadas durante el proceso inflamatorio, como IL-1 o IL-4, inducen la transcripción de ROM activando de forma directa o indirecta los factores de transcripción AP-1 o STAT6, que interaccionan con la región promotora del gen de los ROM (Börner y col, 2002). Aún son menos conocidos los posibles mecanismos que conducirían a un aumento en la expresión de ROM, con relación a la administración crónica de opioides. El análisis de la región promotora del gen del ROM sugiere que el AMPC y otros componentes de la cascada de señalización intracelular, que aumentan tras la activación crónica de los ROM, también regulan la expresión de los receptores activando distintos factores de transcripción, incluyendo la proteína CREB o el factor AP-1; éste último, por ejemplo, se ha demostrado que es activado por la PKC, de gran relevancia durante la tolerancia a la morfina (Börner y col, 2002). La vía de la MAPK, activada por la acción de la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G, que traslada esta proteína del

citosol al núcleo, también conduce a la activación de estos factores de transcripción (Yoshikawa y col, 2000; Lee y Lee, 2003). De modo que como parte de los procesos de adaptación que se originan por la administración crónica de opioides, es posible que la inducción de la expresión de ROM tenga un papel importante. En este sentido, Tejwani y col (1998) piensan que parte de los ROM de nueva formación, serían formas menos activas y susceptibles de ser fosforiladas, y por tanto menos efectivas para inducir anti-nocicepción. En nuestro caso, por tanto, la falta de eficacia de la morfina no está en relación con una "*down-regulation*" de los ROM, sino a una pérdida de funcionalidad.

En conclusión, los resultados de este estudio nos han permitido caracterizar y validar un **modelo de tolerancia opioide en presencia de inflamación monoarticular en el ratón**. La inducción de monoartritis mediante la inyección de CFA provoca una respuesta inflamatoria localizada, acompañada de extravasación de plasma, hiperalgesia y alodinia. La inflamación produce además la activación local de sistemas moduladores inhibitorios tales como el sistema opioide endógeno, sobre el cual induce un incremento en la expresión de ROM (evidenciada por Western blot) y en la liberación de POE (demostrada tras la administración de antagonistas opioides). En estas condiciones experimentales (inflamación), la potencia de la morfina subcutánea sobre la pata inflamada aumenta aproximadamente el doble que en ausencia de inflamación. El aumento en la expresión de ROM en la periferia, y en menor proporción en la médula espinal, nos lleva a concluir que el mayor efecto (potencia) de la morfina durante la inflamación por CFA podría explicarse por el incremento de ROM expresados tanto en el sistema nervioso central (médula espinal) como en la periferia (GRD y tejido subplantar). En cambio, en la sección contralateral a la inflamación no se observan cambios ni en la potencia de la morfina ni en la expresión de ROM, demostrándose la unilateralidad de la inflamación.

La implantación, en animales inyectados con CFA, de un comprimido de morfina que libera el fármaco de forma sostenida, provoca la aparición de tolerancia a los efectos anti-nociceptivos y anti-extravasación de la morfina, tras su administración aguda. Por otra parte, la presencia de niveles elevados de morfina en el plasma de estos animales disminuye ligeramente

el edema, y bloquea la hiperalgesia y alodinia producto de la inflamación periférica. Probablemente, esto es debido al equilibrio que se establece entre los mecanismos pro- y anti-nociceptivos inducidos por cada uno de los factores individualmente (inflamación, tolerancia). La tolerancia a la morfina induce un aumento en la expresión de ROM en el SNC (médula) y en periferia (GRD, tejido plantar), que es mayor en presencia de inflamación. A pesar de ello, en presencia de inflamación y tolerancia a la morfina, no se observa un aumento en los efectos de la morfina, lo que sugiere una pérdida de funcionalidad de los receptores.

El desarrollo de tolerancia a la morfina en animales con inflamación por CFA, por tanto, presenta unas características específicas distintas a las obtenidas en ausencia de inflamación, en particular en lo que respecta al aumento en la expresión de ROM en animales con inflamación y tolerancia. Es posible que la investigación del papel que desempeñan estos ROM periféricos durante la inflamación, y la tolerancia opioide, abra nuevas perspectivas terapéuticas en la búsqueda de fármacos y modalidades terapéuticas que nos permitan mejorar el tratamiento del dolor osteoarticular crónico en humanos.

- 1- La administración subplantar de CFA induce una respuesta inflamatoria localizada, caracterizada por la aparición de edema (aumento del peso y del diámetro de la pata) y extravasación de plasma. La inflamación va acompañada de hiperalgesia (térmica y mecánica) y alodinia (mecánica). El proceso inflamatorio local no modifica el peso, la temperatura corporal o el tránsito gastrointestinal del sujeto experimental. Asimismo, no se observan cambios en la pata contralateral, por lo que concluimos que la inyección de CFA induce una monoartritis unilateral, sin provocar afectación sistémica.
- 2- La administración subcutánea de morfina inhibe la nocicepción de forma dosis-dependiente. En presencia de inflamación, el efecto anti-hiperalgésico de la morfina (DE_{50} plantar test: 2.7; Randall y Sellito: 6.3 mg/kg) aumenta aproximadamente dos veces respecto al control (DE_{50} plantar test: 4.9; Randall y Sellito: 12.8 mg/kg). Sin embargo, los efectos anti-alodínicos permanecen inalterados (DE_{50} test de Von Frey: control: 5.1 mg/kg; CFA: 4.9 mg/kg).
- 3- Los efectos anti-hiperalgésicos de la morfina administrada por vía sistémica están mediados por interacción con ROM centrales y periféricos; mientras que los efectos anti-alodínicos se producen por la activación de ROM situados predominantemente en el SNC. Estos hechos se demuestran mediante la administración de NX y NXME, antagonista de acción preferentemente periférica. La inflamación induce la liberación de péptidos opioides endógenos, cuyo efecto es revertido por la administración de los antagonistas.
- 4- Durante la inflamación, la morfina inhibe la extravasación de plasma de una forma dosis-dependiente, presentando un efecto bifásico, de manera que el efecto inhibitorio disminuye progresivamente cuando se administran dosis superiores a 10 mg/kg. El efecto anti-extravasación de la morfina está mediado por ROM localizados preferentemente en la periferia.

- 5- La implantación de un comprimido de morfina subcutánea induce cambios sistémicos y conductuales, que indican la aparición de tolerancia opiode. En presencia de inflamación, la implantación del comprimido de morfina, atenúa el edema y disminuye la hiperalgesia y alodinia inducidas por el agente inflamatorio (CFA).

- 6- La implantación subcutánea de un comprimido de morfina induce tolerancia para los efectos anti-nociceptivos y anti-extravasación, demostrada por una desviación a la derecha de las curvas D-R tras la administración aguda de morfina. La inflamación no previene la aparición de tolerancia, que se observa indistintamente en presencia y ausencia de inflamación. Los ROM periféricos son tolerantes a la morfina, hecho demostrado tras la administración subplantar del opiode.

- 7- La inflamación periférica aumenta la expresión de ROM en la almohadilla plantar (aproximadamente 4 veces), en los GRD (x2.5) y en la médula espinal (x1.5), respecto a los valores controles. Este hecho explica el aumento del efecto anti-hiperalgésico y anti-inflamatorio de la morfina durante la inflamación. La tolerancia a la morfina aumenta de forma similar la expresión de ROM en todos los tejidos estudiados. En presencia de inflamación y tolerancia el aumento en la expresión de ROM es mayor en la almohadilla plantar (unas 10 veces) y en los GRD (x3), mientras que no varía en la médula espinal (x1.5). A pesar de ello, durante la tolerancia a la morfina, en presencia o ausencia de inflamación, no se observa un aumento en los efectos de la morfina, lo que sugiere una pérdida de funcionalidad de los receptores.

1. Aley KO, Levine JD. Multiple receptors involved in peripheral alpha 2, mu, and A1 antinociception, tolerance, and withdrawal. *J Neurosci*, 17: 735-744, 1997(a).
2. Aley KO, Levine JD. Different mechanisms mediate development and expresión of tolerance and dependence for peripheral mu-opioid antinociception in rat. *J Neurosci*, 17: 8018-8023, 1997(b).
3. Andersen ML, Tufik S. Altered sleep and behavioral patterns of arthritic rats. *Sleep Res Online*, 3: 161-167, 2000.
4. Antonijevic I, Mousa SA, Schäfer M, Stein C. Perineural defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. *J Neurosci*, 15: 165-172, 1995.
5. Atcheson R, Lambert DG. Update on opioid receptors. *Brit J Anaesth*, 73: 132-134, 1994.
6. Baamode A, Álvarez-Vega M, Hidalgo A, Menéndez L. Effects of intraplantar morphine in the mouse formalin test. *Jpn J Pharmacol*, 83: 154-156, 2000.
7. Ballet S, Conrath M, Fischer J y col. Expression and G-protein coupling of mu-opioid receptors in the spinal cord and dorsal root ganglia of polyarthritic rats. *Neuropeptides*, 37: 211-219, 2003.
8. Barber A. Mu and kappa-opioid receptor agonists produce peripheral inhibition of neurogenic plasma extravasation in rat skin. *Eur J Pharmacol*, 236: 113-120, 1993.
9. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurociencia. Explorando el cerebro*. Masson, Williams & Wilkins, 1998.
10. Bennett GJ. Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: Focus on the NMDA-receptor. *J Pain Symptom Manag*, 19: S2-S6, 2000.
11. Bernstein MA, Welch SP. Mu-opioid receptor down-regulation and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation in a mouse of chronic morphine tolerance. *Mol Brain Res*, 55: 237-242, 1998.
12. Besse B, Lombard JM, Besson JM. Up-regulation of [H^3] DAMGO and [H^3] DTLET opioid binding sites in laminae I-II of the spinal cord of intact and deafferent morphine tolerant rats. *Neurosci Lett*, 136: 209-212, 1992.

13. Besse D, Weil-Fugazza J, Lombard MC y col. Monoarthritis induces complex changes in mu, delta, and kappa-opioid binding sites in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Eur J Pharmacol*, 233: 123-131, 1992.
14. Bevan SJ, Geppetti P. Protons: small stimulants of capsaicin-sensitivity sensory nerves. *Trends Neurosci*, 17: 509-512, 1994.
15. Bian D, Ossipov MH, Malan TP, Porreca F. Tactile allodynia, but not thermal hyperalgesia, of the hindlimbs is blocked by spinal transection in rats with nerve injury. *Neurosci Lett*, 241: 79-82, 1998.
16. Bileviciute I, Stenfors C, Theodorson E y col. Significant changes in neuropeptide concentrations in the brain of normotensive (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats following knee joint monoarthritis. *Brain Res*, 704: 71-78, 1995.
17. Bley KR, Hunter JC, Eglen RM, Smith JA. The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *Trends Pharmacol Sci*, 19: 141-147, 1998.
18. Bohn LM, Gainetdinov RR, Fang-Tsyr L y col. Mu-Opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature*, 408: 720-723, 2000.
19. Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG. Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in beta-arrestin-2 knock-out mice. *J Neurosci*, 22: 10494-10500, 2002.
20. Börner C, Höllt V, Krauss J. Involvement of Activator Protein-1 in transcriptional regulation of the human mu-opioid receptor gene. *Mol Pharmacol*, 61: 800-805, 2002.
21. Brack A, Rittner HL, Machelska H y col. Endogenous peripheral antinociception in early inflammation is not limited by the number of opioid-containing leukocytes but by opioid receptor expression. *Pain*, 108: 67-75, 2004.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Bioch*, 72: 248-254, 1976.
23. Brodsky M, Elliott K, Hynansky A, Inturrissi CE. CNS levels of mu opioid receptor (MOR-1) mRNA during chronic treatment with morphine or naltrexone. *Brain Res Bull*, 38: 135-141, 1995.

24. Budai D. Neurotransmitters and receptors in the dorsal horn of the spinal cord. *Acta Biol Szeged*, 44: 21-38, 2000.
25. Butler SH, Godefroy F, Besson JM, Weil-Fugazza J. A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. *Pain*, 48: 73-81, 1992.
26. Buzas B, Cox BM. Quantitative analysis of mu and delta opioid receptor gene expression in rat brain and peripheral ganglia using competitive polymerase chain reaction. *Neurosci*, 76: 479-489, 1997.
27. Cabot PJ. Immune-derived opioids and peripheral antinociception. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 28: 230-232, 2001.
28. Cain DM, Khasabov SG, Simone DA. Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin. *J Neurophysiol*, 85: 1561-1574, 2001.
29. Castelli MP, Mellis M, Mamei M y col. Chronic morphine and naltrexone fail to modify receptor mRNA levels in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 45: 149-153, 1997.
30. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M y col. A capsaicin homologue with a high threshold nocuous heat. *Nature*, 398: 436, 1999.
31. Celérière E, Laulin JP, Corcuff JB y col. Progressive enhancement of delayed hyperalgesia induced by repeated heroin administration: A sensitization process. *J Neurosci*, 21: 4074-4080, 2001.
32. Cerveró F, Laird JM. Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. *Pain*, 68: 13-23, 1996.
33. Cha EY, Mouledous L, Harris JR y col. Nitroglycerin inhibits the development of morphine tolerance and dependence in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 74: 551-557, 2003.
34. Chakrabarti S, Wang L, Tang WJ, Gintzler A. Chronic morphine augments adenylyl cyclase phosphorylation: Relevance to altered signalling during tolerance/dependence. *Mol Pharmacol*, 54: 949-953, 1998.
35. Chakrabarti S, Oppermann M, Gintzler A. Chronic morphine induces the concomitant phosphorylation and altered association of multiple signaling proteins: A novel mechanism for modulating cell signalling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 4209-4214, 2001.

36. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW y col. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Meth*, 53: 55-63, 1994.
37. Chen JJ, Dymshitz J, Vasko MR. Regulation of opioid receptors in rat sensory neurons in culture. *Mol Pharmacol*, 51: 666-673, 1997.
38. Chen Y, Mestek A, Liu J y col. Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol*, 44: 8-12, 1993.
39. Chichewitz DL, Haller VL, Welch SP. Changes in opioid and cannabinoid receptor protein following short term combination treatment with D9-Tetrahydrocannabinol and morphine. *JPET*, 297: 121-127, 2001.
40. Colman RW. Biologic activities of the contact factors in vivo-potential of hypotension, inflammation and fibrinolysis and inhibition of cell adhesion, angiogenesis and thrombosis. *Thromb Haemost*, 82: 1568-1577, 1999.
41. DeLeo JA, Tanga FY, Tawfik VL. Neuroimmune activation and neuroinflammation in chronic pain and opioid tolerance/hiperalgesia. *Neuroscientist*, 10: 40-52, 2004.
42. Dell'Antonio G, Quattrini A, Dal Cin E y col. Antinociceptive effect of a new P_{2z}/PSX7 antagonist, oxidized ATP, in arthritic rats. *Neurosci Lett*, 327: 87-90, 2002.
43. Dickenson AH, Chapman V, Green GM. The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. *Gen Pharmacol*, 28: 633-638, 1997.
44. Dirig DM, Yaksh TL. In vivo prostanoid release from spinal cord following peripheral inflammation: effects of substance P, NMDA and capsaicin. *Brit J Pharmacol*, 126: 1333-1340, 1999.
45. Dolan S, Field LC, Nolan AM. The role of nitric oxide and prostaglandin signaling pathways in spinal nociceptive processing in chronic inflammation. *Pain*, 86: 311-320, 2000.
46. Donaldson LF, Hamar AJ, McQueen DS, Seckl JR. Increased expression of preprotachykinin, calcitonin gene related-peptide, but not vasoactive intestinal peptide messenger RNA in dorsal root ganglia during the development of adjuvant monoarthritis in the rat. *Mol Brain Res*, 16: 43-49, 1992.

47. Donaldson LF, Seckl JR, McQueen DS. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose. *J Neurosci Meth*, 49: 5-10, 1993.
48. Dray A, Bevan S. Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. *TIPS*, 14: 287-290, 1993.
49. Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Brit J Anaesth*, 75: 125-131, 1995.
50. Du J, Zhou S, Coggeshall RE, Carlton SM. NMDA-induced excitation and sensitization of normal and inflamed nociceptors. *Neurosci*, 118: 547-562, 2003.
51. Dubner R, Gold M. Neurobiology of pain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 7627-7630, 1999.
52. Dunbar SA, Pulai IJ. Repetitive opioid abstinence causes progressive hyperalgesia sensitive to NMDA receptor blockade in the rat. *JPET*, 284: 678-686, 1998.
53. Eisinger DA, Ammer H, Schulz R. Chronic morphine treatment inhibits opioid receptor desensitization and internalization. *J Neurosci*, 22: 10192-10200, 2002.
54. Evans CJ, Keith DE, Morrison H y col. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*, 258: 1952-1955, 1993.
55. Fabian G, Bozo B, Szikszay G y col. Chronic morphine-induced changes in mu-opioid receptor and G protein of different subcellular loci in rat brain. *JPET*, 302: 774-780, 2002.
56. Fabian G, Tombor B, Nemeth I y col. Upregulation of mu opioid receptors by voluntary morphine administration in drinking water. *Acta Biol Hung*, 54: 157-166, 2003.
57. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Rev Immunol*, 14: 397-440, 1996.
58. Ferguson SSG. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, 53: 1-24, 2001.
59. Ferreira SH, Nakamura M. Prostaglandin hyperalgesia II. The peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonists. *Prostaglandins*, 18: 191-200, 1979.
60. Ferreira J, Santos AR, Calixto JB. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intratechal injection of glutamate in mice. *Neuropharmacol*, 38: 835-842, 1999.
61. Fields HL. Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. *Prog Brain Res*, 122: 246-253, 2000.

62. Galeotti N, Chelardini C, Bartolini A. Role of 5-HT₄ receptors in the mouse passive avoidance test. *JPET*, 286: 1115-1121, 1998.
63. Garnier M, Zaratini PF, Ficalora G y col. Up-regulation of Regulator of G protein-Signalling-4 expression in a model of neuropathic pain and insensitivity to morphine. *JPET*, 304: 1299-1306, 2003.
64. Garzón J, Rodríguez-Díaz M, López-Fando A, Sánchez-Blázquez P. RGS9 proteins facilitate acute tolerance to mu-opioids in vivo. *Eur J Neurosci*, 13: 801-811, 2001.
65. Green PG, Jänig W, Levine JD. Negative feedback neuroendocrine control of inflammatory response in the rat is dependent on the sympathetic postganglionic neuron. *J Neurosci*, 17: 3234-3238, 1997.
66. Guo H, Huang LM. Alteration in the voltage dependence of NMDA receptor channels in rat dorsal horn neurones following peripheral inflammation. *J Physiol*, 537: 115-123, 2001.
67. Gutstein HB, Trujillo KA, Akil H. Does chronic nociceptive stimulation alter the development of morphine tolerance? *Brain Res*, 680: 173-179, 1995.
68. Gutstein HB. The effects of pain on opioid tolerance: how do we resolve the controversy? *Pharmacol Rev*, 48: 403-411, 1996.
69. Hargreaves K, Dubner R, Brown F y col. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 32: 77-88, 1988.
70. Hassan AHS, Ableitner A, Stein C, Hertz A. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptor in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neurosci*, 55: 185-195, 1993.
71. Hay CH, Trevethick MA, Wheelon JS y col. The potential role of spinal cord cyclooxygenase-2 in the development of Freund's complete adjuvant-induced changes in hyperalgesia and allodynia. *Neurosci*, 78: 843-850, 1997.
72. He L, Fong J, Zastrow M, Whistler JL. Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance oligomerization. *Cell*, 108: 271-282, 2002.
73. Hernández-Delgadillo GP, López-Muñoz FJ, Salazar LA, Cruz SL. Morphine and dipyrone co-administration delays tolerance development and potentiates nociception. *Eur J Pharmacol*, 469: 71-79, 2003.

74. Hiranuma T, Kitamura K, Taniguchi T y col. Protection against dynorphin (1-8) hydrolysis in membranes preparations by the combination of amastatin, captopril and phosphoramidon. *JPET*, 286: 863-869, 1998.
75. Honoré P, Catheline G, Le Guen S, Besson JM. Chronic treatment with systemic morphine induced tolerance to the systemic and peripheral antinociceptive effects of morphine on both carragenin induced hyperalgesia and spinal c-Fos expression in awake rats. *Pain*, 71: 99-108, 1997.
76. Houshyar H, Cooper ZD, Woods JH. Paradoxical effects of chronic morphine treatment on the temperature and pituitary-adrenal responses to acute restraint stress: a chronic paradigm. *J Neuroendocrinol*, 13: 862-874, 2001.
77. Hsu MM, Wong CS. The roles of pain facilitatory systems in opioid tolerance. *Acta Anesthesiol Sin*, 38: 155-166, 2000.
78. Hurley RW, Hammond DL. The analgesic effects of supraspinal μ and δ opioid receptor agonists are potentiated during persistent inflammation. *J Neurosci*, 20: 1249-1259, 2000.
79. Hurley RW, Hammond DL. Contribution of endogenous enkephalins to the enhanced analgesic of supraspinal mu opioid receptor agonists during inflammatory injury. *J Neurosci*, 21: 2536-2545, 2001.
80. Iadarola MJ, Douglass J, Civelli O, Naranjo JR. Differential activation of spinal cord dynorphin and enkephalin neurons during hyperalgesia: evidence using cDNA hybridisation. *Brain Res*, 455: 205-212, 1988.
81. Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature*, 377: 591-594, 1995.
82. Inoue M, Mishina M, Ueda H. Locus-specific rescue of GluRepsilon1 NMDA receptors in mutant mice identifies the brain regions important for morphine tolerance and dependence. *J Neurosci*, 23: 6529-6536, 2003.
83. Janeway CA, Bottomly K. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell*, 76: 275-285, 1994.
84. Ji RR, Zhang Q, Law PY y col. Expression of mu, delta and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J Neurosci*, 15: 8156-8166, 1995.

85. Jordan B, Devi LA. Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. *Br J Anaesth*, 81: 12-19, 1998.
86. Joris J, Costello A, Dubner R, Hargreaves KM. Opiates suppress carrageenan-induced edema and hyperthermia at doses that inhibit hyperalgesia. *Pain*, 43: 95-103, 1990.
87. Kayser V, Guilbaud G. Repeated low doses of morphine induces a rapid tolerance in arthritic rats but a potentiation of opiate analgesia in normal animals. *Brain Res*, 383: 392-396, 1986.
88. Kayser V, Chen YL, Guilbaud G. Behavioural evidence for a peripheral component in the enhanced antinociceptive effect of a low dose of systemic morphine in carrageenin-induced hyperalgesic rats. *Brain Res*, 560: 237-244, 1991.
89. Keith DE, Murray SR, Zaki PA y col. Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J Biol Chem*, 271: 19021-10924, 1996.
90. Kest B, Hopkins E, Palmese A y col. Morphine tolerance and dependence in nociceptin/orphanin FQ transgenic KO mice. *Neurosci*, 104: 217-222, 2001.
91. Khalil Z, Helme RD. Serotonin modulates substance P-induced plasma extravasation and vasodilatation in rat skin by an action through capsaicin-sensitive primary afferent nerves. *Brain Res*, 527: 292-298, 1990.
92. Kieffer BL, Evans CJ. Opioid tolerance-search of the holy grail. *Cell*, 108: 587-590, 2002.
93. Kirschfink M. Controlling the complement system in inflammation. *Immunopharmacol*, 38: 51-62, 1997.
94. Kolesnikov YA, Pick CG, Ciszewska G, Pasternak GW. Blockade of tolerance to morphine but not to kappa opioids by a nitric oxide synthase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 5162-5166, 1993.
95. Kolesnikov YA, Jain S, Wilson R, Pasternak GW. Peripheral morphine analgesia: synergy with central sites and a target of morphine tolerance. *JPET*, 279: 502-506, 1996.
96. Kolesnikov YA, Pasternak GW. Topical opioids in mice: analgesia and reversal of tolerance by a topical NMDA antagonist. *JPET*, 290: 247-252, 1999.
97. Koob GF, Bloom FE. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science*, 242: 715-722, 1988.

98. Koob GF, Sanna PP, Bloom FE. Neuroscience of addiction. *Neuron*, 21: 467-476, 1998.
99. Kraus J, Borner C, Giannini E y col. Regulation of mu-opioid receptor gene transcription by interleukin-4 and influence of an allelic variation within a STAT6 transcription factor binding site. *J Biol Chem*, 276: 43901–43908, 2001.
100. Kraus J, Borner C, Giannini E, Hollt V. The role of nuclear factor kappaB in tumor necrosis factor-regulated transcription of the human mu-opioid receptor gene. *Mol Pharmacol*, 64: 876-884, 2003.
101. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
102. Lane-Ladd SB, Pineda J, Boundy VA y col. CREB (cAMP response Element-Binding Protein) in the Locus Coeruleus: Biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. *J Neurosci*, 17: 7890-7901, 1997.
103. Larcher A, Laulin JP, Celérièr E y col. Acute tolerance associated with a single opiate administration: involvement of N-methyl-D-aspartate-dependent pain facilitatory systems. *Neurosci*, 84: 583-589, 1998.
104. Larson AA, Brown DR, Samy EI-Atrash, Walser MM. Pain threshold changes in adjuvant-induced inflammation: A possible model of chronic pain in the mouse. *Pharmacol Biochem Behav*, 24: 49-53, 1986.
105. Lashbrook JM, Ossipov MH, Hunter JC y col. Synergistic antiallodynic effects of spinal morphine with ketorolac and selective COX-1 and 2-inhibitors in nerve-injured rats. *Pain*, 82: 65-72, 1999.
106. Law PY, Loh HH. Regulation of opioid activities. *JPET*, 289: 607-624, 1999.
107. Lee PW, Lee YM. Transcriptional regulation of mu-opioid receptor gene by cAMP pathway. *Mol Pharmacol*, 64: 1410-1418, 2003.
108. Lei YH, Rogers DF. Effects and interactions of opioids on plasma extravasation induced by cigarette smoke in guinea pig bronchi. *Lung Cel Mol Physiol*, 276: L391-397, 1999.
109. Levac BA, O'Dowd BF, George SR. Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signalling units. *Curr Opin Pharmacol*, 2: 76-81, 2002.

110. Li J, Wong CH, Huang KS y col. Morphine tolerance in arthritic rats and serotonergic system. *Life Sci*, 64: PL 111-116, 1999.
111. Li S, Zhu J, Chen C y col. Molecular cloning and expression of a rat kappa opioid receptor. *Biochem J*, 295: 629-633, 1993.
112. Li S, Zhao ZQ. Morphine-induced decrease in mechanical allodynia is mediated by central, but not peripheral, opioid receptors in rats with inflammation. *Eur J Pharmacol*, 481: 203-206, 2003.
113. Li X, Clark JD. Morphine tolerance and transcription factor expression in mouse spinal cord. *Neurosci Lett*, 272: 79-82, 1999.
114. Li X, Angst MS, Clark JD. A murine model of opioid-induced hyperalgesia. *Mol Brain Res*, 86: 56-62, 2001.
115. Li X, Clark JD. Hyperalgesia during opioid abstinence: mediation by glutamate and substance P. *Anesth Analg*, 95: 979-984, 2002.
116. Ma W, Zheng WH, Powell K y col. Chronic morphine exposure increases the phosphorylation of MAP Kinases and the transcription factor CREB in dorsal root ganglion neurons: an in vitro and in vivo study. *Eur J Neurosci*, 14: 1091-1094, 2001.
117. Maekawa K, Kinami M, Masuda T, Satoh M. Expression of mu- and kappa-, but not delta-, opioid receptor mRNA is enhanced in the spinal cord horn of arthritic rats. *Pain*, 64: 365-371, 1996.
118. Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E y col. Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science*, 273: 657-659, 1996.
119. Mao J, Price DD, Mayer DJ. Mechanism of hyperalgesia and morphine tolerance: a current view of their possible interactions. *Pain*, 62: 259-274, 1995.
120. Mao J, Mayer DJ. Spinal cord neuroplasticity following repeated opioid exposure and its relation to pathological pain. *Ann NY Acad Sci*, 933: 175-184, 2001.
121. Mao J, Sung B, Ji RR, Lim G. Chronic morphine induces downregulation of spinal glutamate transporters: Implications in morphine tolerance and abnormal pain sensitivity. *J Neurosci*, 22: 8312-8323, 2002.

122. Mayer DJ, Mao J, Holt J, Price DD. Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 7731-7736, 1999.
123. Meunier JC, Mollereau C, Toll L y col. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL-1. *Nature*, 377: 532-535, 1995.
124. Meuser T, Giesecke T, Gabriel A y col. Mu-opioid receptor mRNA regulation during morphine tolerance in rat peripheral nervous system. *Anesth Analg*, 97: 1458-1463, 2003.
125. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 57: 1-64, 1999.
126. Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P y col. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS lett*, 341: 33-38, 1994.
127. Mousa SA, Zhang Q, Sitte N y col. Beta-endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *J Neuroimmunol*, 115: 71-78, 2001.
128. Mousa SA, Machelska H, Schäfer M, Stein C. Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain. *J Neuroimmunol*, 126: 5-15, 2002.
129. Mousa SA. Morphological correlates of immune-mediated opioid analgesia. *Adv Exp Med Biol*, 521: 77-87, 2003.
130. Nagakura Y, Okada M, Kohara A y col. Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: Time course of progression and efficacy of analgesics. *JPET*, 306: 490-497, 2003.
131. Nath C, Gupta MB, Patnaik GK, Dhawan KN. Morphine-induced Straub tail response: mediated by central mu-2-opioid receptor. *Eur J Pharmacol*, 263: 203-205, 1994.
132. Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science*, 278: 58-63, 1997.
133. Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Rev Neurosci*, 2: 119-128, 2001.
134. Niissalo S, Hukkanien M, Imai S y col. Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. *Ann NY Acad Sci*, 966: 384-399, 2001.

135. Nozaki-Taguchi N, Yaksh TL. Characterization of the antihyperalgesic action of a novel peripheral mu-opioid receptor agonist-loperamide. *Anesthesiol*, 90: 225-234, 1999.
136. Ossipov MH, Di Bian T, Marlan TP y col. Lack of involvement of capsaicin-sensitive primary afferents in nerve-ligation injury induced tactile allodynia in rats. *Pain*, 79: 127-133, 1999.
137. Pan Y. Identification and characterization of a novel promoter of the mouse mu opioid receptor gene (*Oprm*) tha generates splice variants. *Gene*, 295: 97-108, 2002.
138. Parada CA, Tambeli CH, Cunha FO, Ferreira SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neurosci*, 102: 937-944, 2001.
139. Pasternak KR. The pharmacology of mu analgesics: from patients to genes. *Neuroscientist*, 7: 220-231, 2001.
140. Patel MB, Patel CN, Rajashekara V, Yoburn BC. Opioid agonists differentially regulate mu-opioid receptors and trafficking proteins in vivo. *Mol Pharmacol*, 62: 1464-1470, 2002.
141. Pearson CM. Development of arthritis, periarthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med*, 91: 95-101, 1956.
142. Perrot S. Morphine in nonmalignant joint pain. Physiological rationale, value, and limitations. *Revue du rhumatisme (Engl ed)*, 66: 271-277, 1999(a).
143. Perrot S, Guibaud G, Kayser V. Effects of intraplantar morphine on paw edema and pain-behaviour in a rat model of repeated acute inflammation. *Pain*, 83: 249-257, 1999(b).
144. Perrot S, Guibaud G, Kayser V. Differential effects of peripheral and systemic morphine and naloxone in a rat model of repeated acute inflammation. *Anesthesiol*, 94: 870-875, 2001.
145. Philippe D, Dubuquoy L, Groux H y col. Anti-inflammatory properties of the mu-opioid receptor support its use in the treatment of colon inflammation. *J Clin Invest*, 111: 1329-1338, 2003.
146. Philippe L, Gegout-Pottie P, Guincamp C y col. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. *Am J Physiol*, 273: R1550-R1556, 1997.

147. Planas ME, Rodríguez L, Sánchez S y col. Pharmacological evidence for the involvement of the endogenous opioid system in the response to local inflammation in the rat paw. *Pain*, 60: 67-71, 1995.
148. Planas ME, Sánchez S, Rodríguez L y col. Antinociceptive/anti-edema effects of liposomal morphine during acute inflammation of the rat paw. *Pharmacol*, 60: 121-127, 2000.
149. Pol O, Puig MM. Reversal of tolerance to the antitransit effects of morphine during acute intestinal inflammation in mice. *Brit J Pharmacol*, 122: 1216-1222, 1997.
150. Pol O, Alameda F, Puig MM. Inflammation enhances mu-opioid receptor transcription and expresión in mice intestine. *Mol Pharmacol*, 60: 894-899, 2001.
151. Pol O, Puig MM. Expression of opioid receptors during peripheral inflammation. *Curr Topics Med Chem*, 4: 51-61, 2004.
152. Powell KJ, Hosokawa A, Bell A y col. Comparative effects of cyclo-oxygenase and nitric oxide syntase inhibition on the development and reversal of spinal opioid tolerance. *Brit J Pharmacol*, 127: 631-644, 1999.
153. Poyhia R, Xu M, Kontinen VK y col. Systemic physostigmine shows antiallodynic effects in neurophatic rats. *Anesth Analg*, 89: 428-433, 1999.
154. Przewlocki R, Przewlocka B. Opioids in chronic pain. *Eur J Pharmacol*, 429: 79-91, 2001.
155. Puig MM, Romero A, Pol O y col. Efectes antinociceptius i antiinflamatoris dels opioides. *Unitats de dolor: realitat avui, repte per al futur*, 23: 281-289, 2002.
156. Raghavendra V, Rutkowski MD, DeLeo JA. The role of spinal neuroimmune activation in morphine tolerance/hiperalgesia in neurophatic and sham-operated rats. *J Neurosci*, 22: 9980-9989, 2002.
157. Rahman AF, Takahashi M, Kaneto H. Development of tolerance to morphine antinociception in mice treated with nociceptive stimulants. *Jpn J Pharmacol*, 63: 59-64, 1993.
158. Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn*, CXI: 409-419, 1957.
159. Richardson JD, Vasko MR. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *JPET*, 302: 839-845, 2002.

160. Rittner HL, Brack A, Machelska H y col. Opioid peptide expressing leukocytes-identification, recruitment and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiol*, 95: 500-508, 2001.
161. Rodrigues ARA, Duarte IDG. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive potassium channels. *Brit J Pharmacol*, 129: 110-114, 2000.
162. Salo P. The role of joint innervation in the pathogenesis of arthritis. *Can J Surg*, 42: 91-100, 1999.
163. Sammons MJ, Raval P, Davey PT y col. Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of nerve growth factor and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Brain Res*, 876: 48-54, 2000.
164. Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Díaz M, López-Fando A y col. The GBeta5 subunit that associates with the R7 subfamily of RGS proteins regulates mu-opioid effects. *Neuropharmacol*, 45: 82-95, 2003.
165. Schäfer M, Imai Y, Uhl GR, Stein C. Inflammation enhances peripheral mu opioid receptor-mediated analgesia, but not mu-opioid receptor transcription in dorsal root ganglia. *Eur J Pharmacol*, 279: 165-169, 1995.
166. Schäfer M, Mousa SA, Stein C. Corticotropin-releasing factor in antinociception and inflammation. *Eur J Pharmacol*, 323: 1-10, 1997.
167. Schaible HG, Ebersberger A, Von Banchet GS. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann NY Acad Sci*, 966: 343-354, 2002.
168. Scholz J, Wolf CJ. Can we conquer pain? *Nat Neurosci*, 5: 1062-1067, 2002.
169. Schultz JE, Gross GL. Opioids and cardioprotection. *Pharmacol Ther*, 89: 123-137, 2001.
170. Schwartz TW, Holtz B. Molecular structure and function of 7TM G-protein-coupled receptors. CRC press: *Textbook of receptor pharmacology*, 81-110, 2003.
171. Shaqura MA, Zöllner C, Mousa SA y col. Characterization of mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in rat hypothalamus, spinal cord and primary afferent neurons during inflammatory pain. *JPET*, 308: 712-718, 2004.
172. Shoda T, Fukuda K, Uga H y col. Activation of mu-opioid receptor induces expression of c-fos and junB via MAPK cascade. *Anesthesiol*, 95: 983-989, 2001.

173. Shook JE, Pelton JT, Hruby VJ, Burks TF. Peptide opioid antagonist separates peripheral and central opioid antinociceptive effects. *JPET*, 243: 492-500, 1987.
174. Silbert SC, Beacham DW, McCleskey EW. Quantitative single-cell differences in mu-opioid receptor mRNA distinguish myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci*, 23: 34-42, 2003.
175. Smith FL, Lohmann AB, Dewey W. Involvement of phospholipid signal transduction pathways in morphine tolerance in mice. *Brit J Pharmacol*, 128: 220-226, 1999.
176. Smith FL, Javed RR, Elzey MJ, Dewey W. The expression of a high level of morphine antinociceptive tolerance in mice involve both PKC and PKA. *Brain Res*, 985: 78-88, 2003.
177. Solans A, Carnicero M, de la Torre R, Segura J. Comprehensive Screening Procedure for Detection of Stimulants, Narcotics, Adrenergic Drugs, and Their Metabolites in Human Urine. *J Anal Toxicol*, 19: 104-114, 1995.
178. Sparber SB, Gellert VF, Fossom L. On the use of operant behavior to study neuropsychopharmacology of opiates with special reference to morphine and its relationship to dopamine in the central nervous system. *Adv Biochem Psychoph*, 20: 453-491, 1979.
179. Städler S, Gunzer MM, Metzger D. Localization of mu-opioid receptor 1A on sensory nerve fibers. *Regulatory Pept*, 110: 75-83, 2002.
180. Stefano GB, Hartman A, Billinger TV y col. Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilatation. *J Biol Chem*, 270: 30290-30293, 1995.
181. Stein C, Millan MJ, Herz A. Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: Alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacol Biochem Behav*, 31: 445-451, 1988(a).
182. Stein C, Millan MJ, Yassouridis A, Herz A. Antinociceptive effects of mu and kappa agonists in inflammation are enhanced by a peripheral opioid receptor-specific mechanism. *Eur J Pharmacol*, 155: 255-264, 1988(b).
183. Stein C, Millan MJ, Shippenberg TS, Herz A. Peripheral effect of fentanyl upon nociception in inflamed tissue of the rat. *Neurosci Lett*, 84: 225-228, 1988(c).

184. Stein C. Mechanisms of disease: The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N Eng J Med*, 332: 1685-1690, 1995.
185. Stein C, Pflüger M, Yassouridis A y col. No tolerance to peripheral morphine analgesia in presence of opioid expression in inflamed synovia. *J Clin Invest*, 98: 793-799, 1996.
186. Stein C, Maxhelska H, Binder W, Schäfer M. Peripheral opioid analgesia. *Curr Opin Pharmacol*, 1: 62-65, 2001.
187. Suárez-Roca H, Maixner W. Morphine produces a biphasic modulation of substance P release from cultures dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett*, 194: 41-44, 1995.
188. Taddese A, Nah SY, McCleskey EW. Selective opioid inhibition of small nociceptive neurons. *Science*, 270: 1366-1369, 1995.
189. Taylor DA, Fleming WW. Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids. *JPET*, 297: 11-18, 2001.
190. Tejwani GA, Sheu MJ, Sribanditmongkol P, Satyapriya A. Inhibition of morphine tolerance and dependence by diazepam and its relation to mu-opioid receptors in the rat brain and spinal cord. *Brain Res*, 797: 305-312, 1998.
191. Teschmacher H, Koch G, Brantl V. Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers*, 43: 99-117, 1997.
192. Tiseo PJ, Inturrisi CE. Attenuation and reversal of morphine tolerance by the competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist LY274614. *JPET*, 268: 195-201, 1993.
193. Trujillo KA, Akil H. Inhibition of opioid tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science*, 251: 85-87, 1991.
194. Trujillo KA, Akil H. Inhibition of opioid tolerance by non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Brain Res*, 633: 178-188, 1994.
195. Trujillo KA, Akil H. Excitatory amino acids and drugs of abuse: a role for N-methyl-D-aspartate receptors in drug tolerance, sensitization and physical dependence. *Drug and Alcohol Dependence*, 38: 139-154, 1995.
196. Truong W, Cheng C, Ku QG y col. Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury. *Ann Neurol*, 53: 366-375, 2003.

197. Udaka K, Takeuchi Y, Movat HZ. Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability. *Proc Soc Exp Biol Med*, 133: 1384-1387, 1970.
198. Ueda H, Inoue M. Peripheral morphine analgesia resistant to tolerance in chronic morphine-treated mice. *Neurosci Lett*, 266: 105-108, 1999.
199. Ulloa-Aguirre A, Conn PM. G-protein coupled receptors and G-proteins. *Principles of Molecular regulation* (Conn & Means eds; Humana Press): 3-26, 2003.
200. Valle LI, Pol O, Puig MM. Intestinal inflammation enhances the inhibitory effects of opioids on intestinal permeability in mice. *JPET*, 296: 378-387, 2001.
201. Vanderah TW, Suenaga NMH, Ossipov MH y col. Tonic descending facilitation from rostral ventromedial medulla mediates opioid-induced abnormal pain and antinociceptive tolerance. *J Neurosci*, 21: 279-286, 2001.
202. Walker JS. Anti-inflammatory effects of opioids. *Adv Exp Med Biol*, 521: 148-160, 2003.
203. Wang J, Charboneau R, Balasubramanian S y col. The immunosuppressive effects of chronic morphine treatment are partially dependent on corticosterone and mediated by the mu-opioid receptor. *J Leukocyte Biol*, 71: 782-790, 2002.
204. Wang Z, Gardell LR, Ossipov MH y col. Pronociceptive actions of dynorphin maintain chronic neuropathic pain. *J Neurosci*, 21: 1779-1786, 2001.
205. Way EL, Loh HH, Shen FH. Simultaneous quantitative assessment of morphine tolerance and physical dependence. *JPET*, 167: 1-8, 1969.
206. Wei Y, Hao JX, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z. The development of morphine tolerance and dependence in rats with chronic pain. *Brain Res*, 756: 141-146, 1997.
207. Whistler JL, von Zastrow M. Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 9914-9919, 1998.
208. Whistler JL, Chuang HH, Chun P y col. Functional dissociation of mu opioid receptor signalling and endocytosis: implications for the biology of tolerance and addiction. *Neuron*, 23: 737-746, 1999.
209. Williams JT, MacDonald JC, Manzoni O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev*, 81: 299-343, 2001.

210. Yaksh TL, Hua XY, Kalcheva I y col. The spinal biology in humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 7680-7686, 1999.
211. Yoshikawa M, Nakayama H, Ueno S y col. Chronic fentanyl treatments induce the up-regulation of mu-opioid receptor mRNA in rat pheochromocytoma cells. *Brain Res*, 859: 217-223, 2000.
212. Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature*, 386: 499-502, 1997.
213. Zarrindast M, Alaei Nia K, Shafizadeh M. On the mechanism of tolerance to morphine-induced Straub tail reaction in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 69: 419-424, 2001.
214. Zeitz KP, Malmberg AB, Gilbert H, Basbaum AI. Reduced development of tolerance to the analgesic effects of morphine and clonidine in PKC γ mutant mice. *Pain* 94: 245-253, 2001.
215. Zhang J, Ferguson SSG, Barak LS y col. Role of G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 7157-7162, 1998.
216. Zhang Q, Schäfer M, Elde R, Stein C. Effects of neurotoxins and hindpaw inflammation on opioid receptor immunoreactivities in dorsal root ganglia. *Neurosci*, 85: 281-291, 1998.
217. Zhao Q, Garreau I, Sannier F, Piot JM. Opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. *Biopolymers*, 43: 75-98, 1997.
218. Zhou L, Zhang Q, Stein C, Schäfer M. Contribution of opioid receptors on primary afferent versus sympathetic neurons to peripheral opioid analgesia. *JPET*, 286: 1000-1006, 1998.
219. Zöllner C, Shaqura MA, Bopaiah CP y col. Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. *Mol Pharmacol*, 64: 202-210, 2003.
220. Zubieta JK. Regional mu opioid receptor regulation of sensory and affective dimensions of pain. *Science*, 293: 311-315, 2001.

AC:	adenilato ciclasa
ADME:	asta dorsal médula espinal
AMPc:	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AUC:	área debajo de la curva
BSA:	suero de albúmina bovina
CCK:	colecistoquinina
CFA:	adyuvante de Freund; sección inflamada
CGRP:	péptido relacionado con la calcitonina
COX:	ciclooxigenasa
CREB:	proteína que se une a elementos de respuesta a AMPc
CRF:	factor liberador de corticotropina
CTL:	contralateral
DAG:	diacilglicerol
DE:	dosis eficaz
D-R:	dosis–respuesta
EEM:	error estándar de la media
Emax:	efecto máximo observado
GABA:	ácido γ -aminobutírico
GRD:	ganglio de la raíz dorsal
GRK:	proteína quinasa proteína G-acoplada
IL:	interleuquina
iNOS:	óxido nítrico sintasa inducible
IP₃:	inositoltrifosfato
kg:	kilogramo
MAPK:	proteína quinasa mitógeno-activada
mg:	miligramo
μg:	microgramo
ml:	mililitro

μl:	microlitro
MS:	morfina
NGF:	factor de crecimiento neuronal
NK:	neuroquinina
NMDA:	N-metil-D-aspartato (receptor de glutamato y aspartato)
NO:	óxido nítrico
NX:	naloxona
NXME:	naloxona metiodada
PLB:	placebo
PBS:	tampón fosfato
PLC:	fosfolipasa C
PKA:	proteína kinasa A
PKC:	proteína kinasa C
PM:	peso molecular
POE:	péptido opioide endógeno
RGS:	regulador señalización proteínas G
RO:	receptor opioide
ROM:	receptor opioide μ
SDS-PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico
SNC:	sistema nervioso central
SNP:	sistema nervioso periférico
SOE:	sistema opioide endógeno
SS:	suero salino
TGI:	tránsito gastrointestinal
TNFα:	factor de necrosis tumoral α
TOL:	tolerante