

Departament de Farmacologia Terapèutica i Toxicologia
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

EFFECTOS DE LOS OPIOIDES SOBRE LA EXTRAVASACIÓN DE PLASMA EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN AGUDA PERIFÉRICA EN RATA

Memoria presentada por M. Asunción Romero Molina para optar al
grado de Doctora por la Universitat Autònoma de Barcelona
2003

Al llarg d'aquests darrers anys (comencem a contar des que vaig acabar la carrera, allà pels anys 88, ufffer!!) he conegut un grapat de gent que m'ha fet reflexionar sobre què és el més important a la vida. Cadascú, a la seua manera, m'ha fet veure que hi ha temps per a tot, que la vida és llarga, però al mateix temps curta. Durant la meua he plantat un arbre, he tingut una filla i ara acabe d'escriure el meu "llibre". Potser seria millor dir: el "nostre llibre". Aquesta tesis és el resultat no tant sols de "reflexions i pensaments científics" sinó de les bones estones que hem passat tots junts (oblidem les amargues, oi?).

Voldria agrair primer de tot a la Margarita i a l'Eulàlia, directores d'aquesta tesi, per haver-me donat la possibilitat de realitzar aquest treball, per la confiança depositada en mi, per compartir els seus coneixements, pels seus consells, i per les nostres converses *apoteòsiques i filatèliques*.

A l' Anna, per la seua col·laboració com a tutora, pel seu recolzament, tant personal com científic. Qui ens anava a dir que nos tornariem a veure!

A la Sílvia, pel suport constant, pels amables suggeriments, per escoltar-me en tot moment.

A la Marta i a la Núria (companyes i amigues de la carrera), per les estones compartides esperant que arribara l'hora de l'examen.

A l'Enric, el meu primer gran "boss" que va fer néixer en mi les ganes de "fer ciència" (tot i que em sembla que ell no s'en va adonar). A la Reina i a la Leo, amigues que feren que m'agradés viure a Girona (només de dilluns a divendres).

A la gent del departament de PQAT (IQS). A la Pili, a la Rosiane, amigues que sempre van tenir un somriure, inclús en moments que potser no tocaven. A Peyo, amic amb qui vaig aprendre a ser tolerant, que encara m'escolta i em diu, de quan en quan, allò que m'agrada sentir. A en Fran, amic del meu amic Peyo.

A en Ferran, per donar-me l'oportunitat de treballar en el seu grup i poder conèixer a la gent del CSIC. A la Fàtima (amiga de *talking & walking*, que sempre ha tingut temps de fer-me un truc allà on ella o jo estiguem). A l'Ivan, a l'Ariadna, a l'Alfred, a l'Àlex, a la Montse, a en Carles, a la Bea, a en Jordi, a la Sara. A en Josep, que sempre ha escoltat les meues queixes. Amics, tots ells, en la distància... solventable a través del ciberespai.

Als companys de la Unitat de Farmacologia de la Facultat d'Odontologia: la Raquel, la Salut, la Mireia, l'Àlex, el Xavi, sufridors directes d'aquesta tesi, per estar disposats a ajudar-me en tot moment. A en Jordi, a l'Olga (IMIM) pels seus consells "científics". A la gent de Bioquímica, de Biofísica, sobre tot a en Jordi, per tenir sempre cinc minuts i atendre les meues súpriques "informàtiques". A la gent d'Histologia i Anatomia Patològica, que m'han ajudat a resoldre dubtes. A l'Edu, amic que amb els seus mails durant les meues estades a l'estranger, ha fet que no m'anyorés tant.

A la Lizi, a la Gigi, a la Milena. A la Rie, a la Sophie, que un dia vàrem coincidir llunys dels nostres i compartirem molt més que paraules, descobrint al mateix temps que l'amistat no té distàncies. A la M^a Carmen, amiga de quasi gaire bé tota la vida, amb qui he viscut de tot... i més. A la María, a l'Helena, que sempre han tingut paraules d'ànim.

A el meu amic Juanma, per compartir molt més que converses "histaminèrgiques", per donar-me la "il·lusió" de continuar (y... punto).

A la meua família, per entendre que sempre he volgut ser una veterinària "atípica", per soportar els meus "dies grisos" (que són poquets), per estimar-me tal com soc.

A la meua filla, l'Elena, que sense saber-ho m'ha fet créixer (i no en alçada, hores d'ara ja no és possible!!) sinó com a persona.

I... si em deixo algú... que no es preocupi. L'inclouré en la propera tesi!!

Dedico aquesta tesi a les dues persones
que han estat punts de inflexió
en la meua vida:
l'Elena i en Juanma.

ABREVIATURAS

AA	ácido araquidónico
AC	adenilato ciclasa
ACTH	hormona adrenocorticotropa
ADN	ácido desoxirribonucleico
AINE	antiinflamatorio no esteroideal
AMPC	monofosfato de adenosina cíclico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
Asp	aspartato
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BHE	barrera hematoencefálica
C _{1,3,5...}	factores proteicos del sistema del complemento
CA	carragenina
Ca ²⁺	ión calcio
CCK	colecistoquinina (<i>colecistokinin</i>)
CGRP	péptido del gen relacionado con la calcitonina (<i>calcitonin gen-related peptide</i>)
COX-1	ciclooxigenasa 1 (constitutiva)
COX-2	ciclooxigenasa 2 (inducible)
CREB	factor de transcripción (<i>cAMP response element binding</i>)
CsA	ciclosporina A
CV	coeficiente de variación
DAG	diacilglicerol
DE ₅₀	dosis eficaz 50
EDRF	factor relajante endotelial (<i>endothelium derived releasing-factor</i>)
EEM	error estándar de la media
EET	ácido epoxieicosatrienoico
EL	lazos extracitoplasmáticos (<i>extraloops</i>)
ERK-1, -2	proteínquinasa-1, -2
GDP	guanosina 5'- difosfato
G _{i/o/s}	proteína G inhibidora/estimulante
Glu	glutamato
GMPC	guanosina 3', 5'- monofosfato cíclico
GPCR	proteína G (<i>G protein-coupled receptor</i>)
H ⁺	protón
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
5-HETE	ácido hidroxieticosatetraenoico
5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
5-LPX	5-lipooxigenasa
i.p.	vía intraperitoneal
i.v.	vía intravenosa
Ig	inmunoglobulina
IL	lazo intracitoplasmático (<i>intraloop</i>)
IL-(1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10 y 11)	interleucina
Ins(1,4,5)P ₃	inositol 1,4,5 trifosfato
IP ₃	inositol trifosfato
K ⁺	ión potasio
LP	lipoxina
LT	leucotrieno
MAP quinasas	quinasas (<i>mitogen-activated protein</i>)

MSH α , β	hormona estimulante de los melanocitos
Na ⁺	ión sodio
NA	noradrenalina
NK A, B	neurocinina (<i>neurokinin A,B</i>)
NK	células naturales asesinas (<i>natural killer</i>)
NO	óxido nítrico (<i>nitric oxide</i>)
NPY	neuropéptido Y
cNOS	óxido nítrico sintasa constitutiva (<i>nitric oxide synthase constitutive</i>)
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible (<i>nitric oxide synthase inducible</i>)
ONOO ⁻	peroxinitrito
ORL-1	receptor de nociceptina (<i>opioid receptor like-1</i>)
P	nivel de significación estadística
PAF	factor activador de plaquetas (<i>platelet-activating factor</i>)
Pc	presión capilar
PDIN	pro-dinorfina
PENC	pro-encefalina
P fi	presión del fluido intersticial
PG (F _{2α} , E ₂ , D ₂)	prostaglandina F _{2α} , E ₂ , D ₂
PGI ₂	prostaciclina I ₂
π	presión osmótica
π fi	presión osmótica del fluido intersticial
pH	concentración de hidrogeniones
PIP ₂	fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PK A, C	proteínquinasa A, C
PL A ₂ , C	fosfolipasa A ₂ , C
POE	péptido opioide endógeno
POMC	pro-opiomelanocortina
R ²	coeficiente de correlación entre variables
RO (μ , δ y κ)	receptor opioide
s.c.	vía subcutánea
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
SOE	sistema opioide endógeno
SP	sustancia P
s.p.	vía subplantar
SPGN	fibras simpáticas postganglionares (<i>sympathetic postganglionic neurons</i>)
TM	dominio transmembrana
TNF- α	factor de necrosis tumoral (<i>tumor necrosis factor-α</i>)
TX A ₂ , B ₂	tromboxano A ₂ , B ₂
VIP	péptido vasodilatador intestinal

1. ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.	La respuesta inflamatoria.	3
2.	Inflamación aguda.	
2.1.	Mastocitos. Histamina.	4
	Serotonina.	5
	Cininas.	6
	Taquicininas.	7
	Óxido Nítrico.	8
2.2.	Eicosanoides.	9
	Sistema del Complemento.	11
	Células leucocitarias.	12
3.	Tratamiento farmacológico de la inflamación.	16
3.1.	Glucocorticoides.	16
3.2.	Antiinflamatorios no esteroideos.	16
3.3.	Opioides.	17
3.4.	Otras posibilidades.	18
4.	Sistema opioide endógeno: receptores y ligandos endógenos.	20
4.1.	Receptores opioides (RO).	21
4.1.1.	Características moleculares de los RO.	22
4.1.2.	Activación de los RO. Consecuencias moleculares .	23
4.1.3.	Inactivación de los RO.	26
4.1.4.	Expresión de RO en estructuras supraespinales.	27
4.1.5.	Expresión de RO en estructuras neuronales periféricas.	28
4.1.6.	Expresión de RO en tejidos no neuronales periféricos.	29
4.2.	Péptidos opioides endógenos (POE).	30
4.2.1.	Características moleculares de los POE.	30
4.2.2.	Procesamiento enzimático de los POE.	32
4.2.3.	Distribución anatómica de los POE.	32
4.2.4.	Expresión de POE en estructuras no neuronales.	33
4.3.	Acciones farmacológicas de los opioides durante la inflamación aguda periférica.	34
5.	Modelos experimentales de estudio de la inflamación periférica.	37
5.1.	Modelo de inflamación aguda inducida por carragenina en rata.	38
5.1.1.	Edema.	39
5.1.2.	Extravasación plasmática.	40

II.	HIPÓTESIS y OBJETIVOS.	43
III.	MATERIAL y MÉTODOS.	45
	1. Animales.	45
	2. Reactivos y fármacos utilizados.	45
	2.1. Preparación de los reactivos y fármacos y vías de administración.	45
	3. Modelo de inflamación aguda periférica. Corroboración del modelo empleado en este estudio.	47
	3.1. Valoración del edema.	47
	3.2. Valoración de la extravasación de plasma.	48
	3.3. Evolución en el tiempo de la inflamación aguda periférica.	50
	4. Validación de las técnicas analíticas cuantitativas del edema y de la extravasación de plasma.	51
	5. Experimentos realizados con agonistas y antagonistas opioides	52
	5.1. Efecto de los agonistas opioides (μ , δ y κ) sobre el edema y la extravasación de plasma en la inflamación aguda periférica.	52
	5.2. Reversión de los efectos de los agonistas opioides durante la inflamación aguda periférica mediante antagonistas opioides.	53
	5.3. Determinación del componente periférico del efecto de los opioides sobre el edema y la extravasación plasmática	56
	5.4. Evaluación del lugar de acción de los opioides durante la inflamación aguda periférica.	57
	A) Tratamiento con capsaicina.	57
	Valoración de la eficacia del tratamiento con capsaicina.	58
	▪ Test de Randall-Selitto.	58
	▪ Inmunohistoquímica.	59
	B) Tratamiento con 6-hidoxidopamina.	61
	C) Tratamiento con ciclosporina A.	62
	D) Tratamiento con 48/80.	63
	D.1. Tratamiento con los antagonistas antihistaminérgicos mepiramina y cimetidina.	64
	D.2. Tratamiento con los antagonistas histaminérgicos específicos para los subtipos H ₁ , H ₂ y H ₃ : mepiramina, cimetidina y tioperamida, respectivamente.	65
	D.3. Administración de naltrindol (antagonista opioide δ_2 -selectivo) con morfina o fentanilo en animales no tratados con el compuesto 48/80.	67
	6. Estadística	67

IV. RESULTADOS	69
1. Respuesta inflamatoria aguda a la administración de carragenina en la pata de la rata.	70
1.1. Evolución del edema y de la extravasación plasmática.	
1.1.1. Edema.	70
1.1.2. Extravasación plasmática.	72
1.2. Obtención de los controles basales para el edema y la extravasación plasmática.	74
1.2.1. Efecto de la administración de solución salina por vía s.p.	74
1.2.2. Efecto de la administración de carragenina por vía s.p.	74
1.3. Coeficientes de variación de las técnicas analíticas empleadas: pletismografía y espectrofotometría.	75
2. Efecto de los agonistas y antagonistas opioides sobre el edema y la extravasación.	76
2.1. Efecto de los agonistas opioides μ , δ y κ sobre el edema inducido por carragenina.	77
2.2. Efecto de los agonistas opioides μ , δ y κ sobre la extravasación plasmática inducida por carragenina.	82
2.3. Potencia de los distintos agonistas opioides obtenidos a partir de las curvas dosis-respuesta.	88
2.4. Comparación de las potencias relativas de los agonistas opioides μ y δ sobre la extravasación de plasma.	89
2.5. Reversión del efecto inhibitor de los opioides sobre la extravasación plasmática mediante antagonistas específicos.	92
2.6. Efecto inhibitor de los opioides sobre la extravasación plasmática: valoración del componente periférico.	97
2.7. Reversión del efecto antiexudativo de la morfina y el fentanilo (agonistas μ) por el antagonista δ_2 -selectivo naltrindol.	103
3. Localización de los RO periféricos implicados en el efecto inhibitor de los agonistas opioides sobre la extravasación plasmática.	105
3.1. Valoración del componente nervioso sensorial: efecto del pretratamiento con la neurotoxina capsaicina.	105
3.1.1. Efecto del tratamiento con capsaicina sobre la extravasación plasmática y el edema.	105
3.1.2. Test de nocicepción mecánica (Randall-Selitto)	106

3.1.3.	Determinación del efecto del tratamiento con capsaicina mediante técnicas inmunohistoquímicas.	107
3.1.4.	Efecto de los agonistas opioides sobre la extravasación de plasma en animales tratados con capsaicina.	109
3.2.	Valoración del componente nervioso postganglionar simpático: efecto del pretratamiento con la neurotoxina 6-hidroxidopamina.	111
3.2.1.	Efecto del tratamiento con 6-hidroxidopamina sobre la extravasación plasmática y el edema.	111
3.2.2.	Efecto de los agonistas opioides sobre la extravasación plasmática en animales tratados con 6-hidroxidopamina.	112
3.3	Valoración del componente inmunitario: efecto del pretratamiento con el inmunosupresor ciclosporina A.	113
3.4.	Valoración del componente histaminérgico: efecto del pretratamiento con el compuesto 48/80 que induce la depleción de histamina de los mastocitos.	115
3.4.1.	Efecto de los agonistas opioides sobre la extravasación plasmática en animales tratados con el compuesto 48/80.	116
3.4.2.	Efecto del tratamiento con una mezcla de antagonistas histaminérgicos H ₁ (mepiramina) y H ₂ (cimetidina) sobre la extravasación de plasma.	119
3.4.3.	Efecto del tratamiento con antagonista histaminérgicos H ₁ H ₂ y H ₃ (mepiramina, cimetidina y tioperamida) sobre la extravasación de plasma.	122
V.	DISCUSIÓN	127
VI.	CONCLUSIONES	157
VII.	BIBLIOGRAFÍA	159

La acción analgésica de los fármacos opioides se conoce y utiliza en clínica desde hace siglos (Browstein, 1993). Desde la década de los años 70 se sabe que el efecto de los opioides se debe a su interacción con receptores específicos expresados en distintas áreas del sistema nervioso central (SNC) (Stein, 1993). Además de la acción analgésica se ha descrito recientemente que los opioides poseen un efecto antiinflamatorio debido también a la interacción de estos fármacos con receptores opioides (RO) presentes en estructuras anatómicas no sólo espinales y supraespinales sino también periféricas. Para poner de manifiesto estos efectos opioides periféricos, tanto antiinflamatorios como analgésicos se requiere la activación de los RO preexistentes en las terminaciones sensoriales (Barber y Gottschlinch, 1992; Pol *et al.*, 1994; 1996; Stein, 1995). En una situación de inflamación el perineuro pierde su integridad (Antonijevic *et al.*, 1995), permitiendo que los agonistas opioides tengan una mayor accesibilidad a los RO neuronales. Además, bajos niveles de pH incrementan la eficacia de los agonistas opioides al disminuir la inactivación de las proteínas G (Selley *et al.*, 1993), a través de las que inducen su efecto farmacológico.

En el tratamiento de los procesos inflamatorios, no sólo tiene importancia conseguir una buena analgesia, sino poder controlar otros aspectos derivados de este proceso, como por ejemplo, la formación de edema, la extravasación plasmática y la migración leucocitaria que caracterizan la zona inflamada. Hasta el momento, hay un buen conocimiento de los mecanismos periféricos a través de los cuales los opioides inducen analgesia durante la inflamación (Stein *et al.*, 1993). Sin embargo, se desconoce el papel preciso del sistema opioide endógeno (SOE) formado por los ligandos endógenos (péptidos opioides endógenos, POE) y los receptores opioides (RO) implicados, todos ellos, en la respuesta inflamatoria. Poco se sabe de la influencia que sobre el SOE tienen los distintos mediadores liberados durante la respuesta inflamatoria desde las distintas estructuras anatómicas implicadas en ésta como son: las terminaciones nerviosas sensoriales, las fibras simpáticas postganglionares, las células inmunes, el endotelio vascular y los mastocitos. Así pues, el estudio del proceso inflamatorio resulta dificultoso y complejo, teniendo en cuenta que es considerable el potencial de interacción entre los distintos mediadores, componentes neuronales (sensorial y simpático) y no neuronales (epitelio, endotelio, células inmunes y mastocitos). El conocimiento de

Introducción

los mecanismos endógenos a través de los cuales se produce la respuesta inflamatoria podría facilitar el diseño de fármacos antiinflamatorios que controlen más eficazmente la inflamación. Esto nos ha llevado a profundizar en el estudio del papel que desempeñan los opioides en la respuesta inflamatoria.

1. LA RESPUESTA INFLAMATORIA.

La inflamación es, desde el punto de vista filogenético y ontogenético, el mecanismo de defensa más antiguo de que dispone el organismo. Se caracteriza por cuatro signos clínicos observables, descritos por Celsus: **rubor, tumor, calor y dolor**. Esta reacción fisiológica permite hacer frente a agresiones producidas por gran variedad de estímulos, ya sean **endógenos**, en los que se incluyen las reacciones inmunopatológicas y algunos desórdenes neurológicos y genéticos, o factores **exógenos**, que pueden dividirse en *mecánicos* (lesiones traumáticas), *físicos* (temperaturas extremadamente altas o bajas, radiaciones ionizantes, microondas), *químicos* (agentes cáusticos, venenos, componentes genotóxicos y proteotóxicos), *biológicos* (virus, bacterias y parásitos) u otros relacionados con *déficits* en oxígeno, vitaminas o nutrientes básicos. No obstante, sea cual sea la etiología de la inflamación, ésta debe ser ordenada y controlada, dado que la reacción inflamatoria podría extenderse hacia zonas o tejidos circundantes.

Así pues, el organismo debe ser capaz de actuar rápidamente a partir de una amplia variedad de mecanismos celulares y humorales interconectados, evitando la posible diseminación de la lesión. La respuesta inflamatoria se sucede en tres fases distintas: a) la fase aguda transitoria, b) la fase subaguda caracterizada por la infiltración de células leucocitarias y fagocíticas, y c) una fase crónica proliferativa en la que el tejido sufre degeneración. Las reacciones inflamatorias agudas, en contraste con las crónicas, están generalmente limitadas en el tiempo, llegándose a la resolución de las lesiones originadas. El proceso inflamatorio agudo como tal se caracteriza por cambios vasculares, como son la **vasodilatación local** inducida por las modificaciones en el tono de los vasos de la zona lesionada, concretamente en las arteriolas, e **incrementos de la permeabilidad vascular** a nivel de las vénulas postcapilares, permitiéndose la difusión de fluido y componentes plasmáticos hacia el tejido, que llevan a la formación de **edema** y **extravasación plasmática**. También se suceden cambios celulares, como la **activación** de los **mastocitos** presentes en los tejidos así como la **migración** por quimiotaxis de **células leucocitarias** hacia la zona lesionada. Además, hay cambios neuronales. La **despolarización** de las terminaciones periféricas de las **fibras sensoriales** aferentes transmiten los impulsos nociceptivos a

zonas supraespinales lo que origina la **percepción del dolor**. Estas neuronas junto con las terminaciones **simpáticas postganglionares** (*sympathetic postganglionic neurons*, SPGN) liberan neuropéptidos que tienen un papel fundamental en la vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular. No obstante, cada uno de estos cambios puede presentarse aisladamente ya que son fenómenos locales, cuya finalidad es la de proteger al organismo contra las causas que alteran la homeostasis de éste.

2. INFLAMACIÓN AGUDA.

A continuación, y de manera más detallada, se describen los cambios que se suceden durante la **inflamación aguda** inducida por un agente flogógeno. Podemos distinguir:

2.1. La **primera fase** que va desde el momento en que se inicia la inflamación hasta aproximadamente una hora después. Se produce una **vasoconstricción** momentáneamente (la musculatura lisa de los vasos sanguíneos se contrae) y la piel de esta zona adquiere una coloración pálida, **seguida de vasodilatación** con un incremento del flujo sanguíneo (hiperemia) y enrojecimiento de la zona (eritema). En esta primera fase juegan un papel determinante los **mastocitos**, también conocidos como células cebadas, que se encuentran principalmente en el tejido conjuntivo, así como rodeando a vasos sanguíneos y linfáticos y terminaciones nerviosas periféricas. Contienen gránulos basófilos donde se almacenan histamina, serotonina, y heparina, entre otras sustancias, que se liberan de forma rápida por exocitosis al medio extracelular como respuesta a estímulos flogógenos ya sean nerviosos (Alving *et al.*, 1991; Weidner *et al.* 2000) o químicos (Moss, 1995).

La **histamina** ejerce una amplia variedad de efectos sobre procesos fisiológicos distintos. A través de la interacción de esta amina con dos subtipos de receptores conocidos como H₁ y H₂, acoplados a proteínas G, induce distintas respuestas sobre el tejido vascular. Concretamente, los receptores H₁, expresados en el endotelio vascular y activados por su ligando endógeno, causan una respuesta vasodilatadora rápida y corta, mientras que el efecto vasodilatador de

los subtipos H₂ expresados en las células de la musculatura lisa vascular es más lento y sostenido. La activación de estos receptores induce aumentos de inositol-trifosfato (IP₃) con la movilización de Ca²⁺ desde el retículo endoplasmático, e incrementos también de diacilglicerol (DAG) capaz de activar la proteinquinasa C (PK C). Recientemente se ha clonado el subtipo H₃, si bien su existencia farmacológica fue descrita en la década de los 80 (Lovenberg *et al.*, 1999). La activación de este receptor induce efectos anti-inflamatorios (Rouleau *et al.*, 2000), contrarrestando la vasodilatación inducida por los dos subtipos anteriores. Se ha descrito su expresión en terminaciones sensoriales periféricas (Ohkubo *et al.*, 1995), en fibras postganglionares simpáticas (Schlicker *et al.*, 1994) y en fibras colinérgicas (Blandina *et al.*, 1996). Su activación modula la liberación de neurotransmisores desde dichas fibras. Además, actúa como un autoreceptor controlando la síntesis y liberación de histamina. La administración de agonistas específicos para este receptor disminuye la síntesis de histamina en los mastocitos presentes en los tejidos inflamados (Dimitriadou *et al.*, 1994), y reduce la extravasación de plasma provocada por la inflamación neurogénica sin que se afecte la vasodilatación (Rouleau *et al.*, 1997; Boucher *et al.*, 2001).

Desde los mastocitos también se libera **serotonina**, ATP y otros cationes divalentes, así como proteasas. Las acciones de la serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) se deben a la activación de receptores específicos, 5-HT_{1(1A-1B-1D-1E-1F)}, 5-HT_{2(2A-2B-2C)}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5(5A-5B)}, 5-HT₆ y 5-HT₇, acoplados, a excepción del 5-HT₃, a proteínas G (Palacios *et al.*, 1990). La estimulación de los distintos subtipos de receptores 5-HT lleva a la inhibición de la adenilato ciclasa (AC), con la correspondiente reducción de AMPc, al aumento de la permeabilidad para el K⁺ y la hiperpolarización resultante, a la estimulación del ciclo de los fosfoinosítidos, con una clara relación entre su activación y la movilización de Ca²⁺ intracelular, en células musculares lisas y plaquetas. Otros subtipos de receptores están asociados con canales iónicos de Na⁺ y K⁺, cuya activación produce una rápida despolarización.

La 5-HT es un neurotransmisor esencial para muchos procesos fisiológicos que incluyen la regulación vascular y la contracción de la musculatura lisa no vascular, modulación de la agregación plaquetaria, la regulación del apetito, del humor, de

la ansiedad, efectos todos ellos mediados por los anteriores subtipos de receptores. La respuesta clásica de la 5-HT sobre los vasos es la vasoconstricción, tanto arteriolar como venosa, particularmente en los vasos cerebrales, esplénicos, renales y pulmonares. No obstante, también puede provocar vasodilatación arteriolar, sobre todo a nivel muscular y cutáneo. El efecto neto está determinado por el equilibrio entre sus acciones vasoconstrictoras y vasodilatadoras. La 5-HT amplifica la acción vasoconstrictora de noradrenalina (NA), angiotensina II y prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (Yu *et al.*, 2002). En tejidos periféricos induce dolor ya que actúa sobre las terminaciones sensoriales periféricas potenciando la acción proinflamatoria de la sustancia P (SP) (Khalil y Helme, 1990). La localización de distintos subtipos de receptores de la 5-HT en las fibras postganglionares simpáticas hace pensar en un posible efecto modulador de ésta sobre la actividad secretora de NA de las fibras postganglionares simpáticas (Pierce *et al.*, 1995). Se ha demostrado la participación de los subtipos 5-HT₁ y 5-HT_{2A} en la expresión de factores relajantes endoteliales como el *endothelium-derived releasing-factor* (EDRF), tras la activación de las plaquetas (Glusa y Roos, 1996).

A los 10 minutos de comenzar la inflamación ya se produce edema cuantificable. Este fluido extravascular, conocido como **trasudado**, está básicamente formado por agua y electrolitos, y es dependiente de los mediadores liberados inicialmente y de forma rápida, destacando especialmente la histamina (DiRosa *et al.*, 1971; Al-Haboubi y Zeitlin, 1983). Los factores lisosómicos liberados desde células afectadas por la respuesta inflamatoria son capaces de aumentar la permeabilidad vascular a concentraciones muy bajas así como de liberar histamina desde los mastocitos. De manera gradual van filtrándose hacia el tejido inflamado otros componentes proteicos de bajo peso molecular, como el factor XII de la coagulación, también conocido como factor de Hageman. Al entrar éste en contacto con el colágeno tisular se inicia una cascada de señales, a través de las cuales se activa la síntesis de cininas (Colman, 1999).

Las **cininas** son péptidos implicados en procesos vasculares y algésicos. Se forman a partir de los cininógenos plasmáticos (globulinas- α_2) por acción de serín-proteasas específicas (calicreínas) durante el proceso inflamatorio (Couture *et al.*, 2001). Destacan bradicinina, calidina y T-cinina. Todas ellas ejercen sus funciones

biológicas a través de receptores específicos, acoplados a proteínas G, conocidos como B₁ y B₂. El subtipo B₁ se expresa de manera inducible por lesión tisular, por ejemplo durante la inflamación. B₂ se expresa de manera constitutiva en muchos tejidos normales mediando los efectos de bradicinina y calidina en ausencia de inflamación a través de la activación de las fosfolipasas A₂ y C (PL A₂ y C). Ambos subtipos inducen vasodilatación incrementando la permeabilidad vascular, la activación de los nociceptores polimodales C y la síntesis de PG (Petho *et al.*, 2001). La activación de los receptores B₁, presentes en los macrófagos, inducen la síntesis del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina 1 (IL-1) (Dray y Perkins, 1993). La bradicinina induce la despolarización de las terminaciones periféricas nerviosas nociceptivas aferentes, estimulando la liberación de **taquicininas** como la **SP** y el **péptido relacionado con la calcitonina (CGRP)**, que inducen nocicepción y un incremento de la permeabilidad vascular (Geppeti, 1993; Gilligan *et al.*, 1994). Este último lleva al paso de proteínas plasmáticas acompañadas de agua hacia el tejido inflamado por lo que el nombre del fluido pasa a denominarse exudado o extravasación plasmática. Las terminaciones postganglionares simpáticas también son estimuladas por la bradicinina, liberando noradrenalina (NA) y también el neuropéptido Y (NPY), ambos con acciones vasoconstrictoras (Green *et al.*, 1998).

Las **taquicininas** son péptidos de bajo peso molecular. Destacamos, además de la SP, la neurocinina A (NK A) y la neurocinina B (NK B). Todos ellos median una amplia variedad de procesos fisiológicos en los tractos gastrointestinales, pulmonares y genito-uritarios a través de la estimulación de los receptores específicos, NK₁, NK₂ y NK₃, acoplados a proteínas G. Su activación lleva a aumentos en los niveles de IP₃ y DAG (Maggi, 1995). Experimentos preclínicos demuestran que las taquicininas están implicadas en la contracción de la musculatura lisa, vasodilatación, quimiotaxis y activación de las células inmunes. Liberadas a nivel periférico intervienen en la inflamación así como en la hiperalgesia (Lecci *et al.*, 2000).

En la zona inflamada se detectan niveles altos de SP con un máximo a los 30 minutos, manteniéndose durante las dos primeras horas de la inflamación. SP y CGRP producen vasodilatación, incremento de la permeabilidad, quimiotaxis leucocitaria, liberación de citocinas, enzimas lisosomales y PG, así como un

incremento de la expresión de moléculas de adhesión celular (Matucci-Cernic y Partsch, 1992). Todas estas acciones tienen lugar a través de la interacción de SP y CGRP con sus receptores específicos NK, expresados en las células endoteliales de capilares, arteriolas y vénulas postcapilares de la piel (Deguchi *et al.*, 1989; O'Flynn *et al.*, 1989; Grady *et al.*, 2000). Se ha demostrado que SP causa hiperemia cutánea y extravasación de plasma (Holzer 1998), mientras que CGRP induce sólo vasodilatación en muchos puntos del sistema vascular incluyendo la piel (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 1991; Holzer, 1998), sin incrementar la permeabilidad vascular. No obstante, CGRP facilita la extravasación de plasma inducida por cualquier estímulo.

Los cambios que se producen en el flujo sanguíneo inducen la síntesis de factores relajantes vasculares por parte de las células endoteliales, así como especies reactivas al O₂, entre ellas el **óxido nítrico** (*nitric oxide*, NO), el peroxinitrito (ONOO⁻) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Todas ellas activan mecanismos específicos que controlan el tono vascular favoreciendo la vasodilatación (Wollin, 1996). Mediadores inflamatorios tan diversos como bradicinina (Mitchell y Tyml, 1996), Ca²⁺ intracelular (He *et al.*, 1997), GMPc (Meyer y Huxley, 1992) y factores de crecimiento (Bates y Curry, 1996) inducen la síntesis de NO que actúa sobre la musculatura lisa de las arteriolas y precapilares (Lippe *et al.* 1993; Coleman, 2001). La síntesis del NO está determinada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que presenta dos isoformas: la constitutiva, cNOS, expresada constantemente y la isoforma inducible iNOS, expresada en muchos tipos de células incluyendo las células endoteliales, plaquetas, células mesangiales renales, mastocitos, macrófagos, neuronas, células musculares lisas, como respuesta a estímulos inflamatorios, produciéndose grandes cantidades de NO.

El comportamiento del NO ya sea en los vasos sanguíneos, en las plaquetas y leucocitos, en la neurotransmisión o bien en la respuesta inmunitaria inespecífica es dual. Es decir, a dosis bajas el NO ejerce funciones homeostáticas mientras que a dosis mucho más altas actúa como agente lesivo. El NO difunde desde la célula que lo genera hasta la célula efectora, donde interactúa con dianas moleculares específicas. En los vasos sanguíneos es un mediador fisiológico que induce

relajación vascular. Regula la activación plaquetaria inhibiendo la adhesión y agregación.

El incremento del catabolismo en la zona inflamada hace que aumente la temperatura, valorable en tejidos o estructuras periféricas del cuerpo como, por ejemplo, en la piel. El estado de **acidosis** al que se llega resulta óptimo para que las hidrolasas celulares inicien su actividad enzimática, tanto dentro como fuera de las células. La presencia de protones (H⁺) en el lugar de la inflamación estimula los nociceptores, incrementando la respuesta a la bradicinina y a otros mediadores pro-inflamatorios no proteicos como el ATP (Li *et al.*, 1996). Pese a que la inflamación implica un equilibrio entre los procesos catabólicos y los anabólicos y que ambos cursan paralelamente, los primeros predominan al inicio del proceso. Se ha demostrado que a los pocos minutos de iniciarse la inflamación se produce un incremento en los niveles de ADN y de ARN para la síntesis de nuevas proteínas que permiten la neoformación de la matriz extracelular así como de fibroblastos (Eckes *et al.*, 2000).

2.2. La **segunda fase** se inicia aproximadamente dos horas después de la acción del agente flogógeno. Se caracteriza por un aumento en los niveles de **eicosanoides**. Éstos se forman a partir del ácido araquidónico (AA), (Funk, 2001; Le Filliatre *et al.*, 2001; Hinz y Brune, 2002), que ingerido en la dieta o derivado del ácido linolénico se almacena formando parte de los fosfolípidos de la membrana celular. Como respuesta a estímulos físicos, químicos o mecánicos, el AA se libera por la activación de las PL A y C. En estado libre, su metabolización se debe a la acción de las ciclooxigenasas COX-1, enzima constitutiva implicada en la homeostasis en general y COX-2, expresada de manera inducible por mediadores proinflamatorios (Weinberg, 2000; Hinz y Brune, 2002); la 5-lipooxigenasa (5-LP), expresada sobre todo en células que participan en la respuesta inflamatoria (Sala *et al.*, 1998), y el citocromo P-450. Evidencias experimentales sugieren que las terminaciones sensoriales (Vasko *et al.*, 1994) y las fibras postganglionares simpáticas (Coderre *et al.*, 1989) también expresan la enzima COX-2.

Los **prostanoides**, que incluyen las **prostaglandinas** (PGE₂, PGD₂ y PGF_{2α}), los **tromboxanos** (TXA₂ y TXB₂) y la **prostaciclina** (PGI₂), se sintetizan a partir de la COX estimulada por la producción de NO (Salvemini *et al.*, 1996). La enzima 5-LP cataliza

primero la síntesis de los **leucotrienos** (LT A₄, B₄, C₄, D₄ y E₄) y en segundo lugar las **lipoxinas** (LX). También se forman fosfolípidos modificados representados por el factor activador de las plaquetas (*platelet-activating factor*, PAF). La acción del citocromo P-450 sobre el AA lleva a la síntesis de ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) e isómeros de los ácidos hidroxieicosatetraenoicos (D-HETE), con mecanismos de acción y efectos muy diferentes a los anteriores eicosanoides.

En la década de los 70 se demostró que las diferentes moléculas liposolubles que forman parte de la serie de PG inducían, según el tiempo en que se liberaban y la concentración de éstas durante la inflamación, distintos efectos proinflamatorios. Los niveles máximos de PGE₂ y PGI₂ se alcanzan al inicio de la reacción inflamatoria, mientras que en el caso de PGF_{2α} se detectan niveles elevados mucho más tarde, cuando la reacción está disminuyendo. Las acciones que de ellas se derivan son: vasodilatación con aumento del flujo sanguíneo en la microcirculación, sinergismo de la acción de otros mediadores vasoactivos como histamina y bradicinina (Yoshikai, 2001), además de promover la formación de edema y la sensibilización de los nociceptores. La presencia de receptores, acoplados a proteínas G, para estos eicosanoides en las fibras tanto sensoriales como simpáticas permiten especular sobre las posibles funciones autocrinas y paracrinas una vez liberadas las PG (Southall y Vasko, 2001).

El TXA₂, sintetizado en los monocitos, macrófagos y plaquetas, es un potente vasoconstrictor y favorece la agregación plaquetaria.

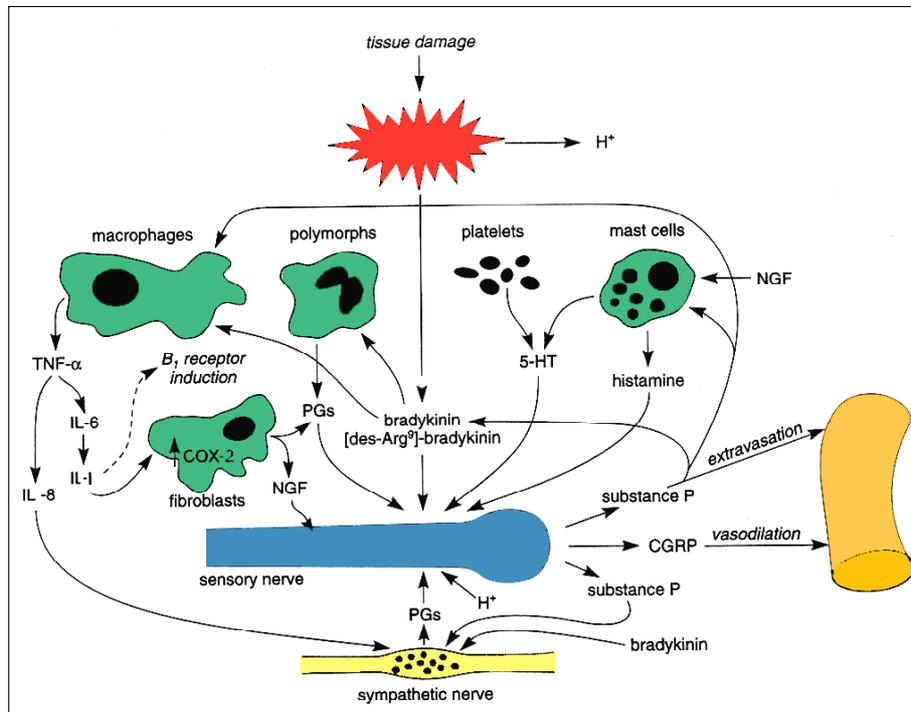
En cuanto a los LT, el LTB₄ ejerce una acción quimiotáctica, favoreciendo la adherencia de las células inflamatorias a las paredes de las vénulas postcapilares (Casale y Abbas, 1990), lo que lleva a un aumento de la permeabilidad plasmática. En el hombre, los LTC₄ y LTD₄ causan hipotensión además de exudado, llegando incluso a ser 1000 veces más potentes que la histamina (Piper, 1984), aunque a altas concentraciones llegan a causar vasoconstricción con reducción del exudado plasmático. El LTB₄ y el 5-HETE causan quimiotaxis y/o quimioquinesis de gran número de células, entre ellas los neutrófilos (Piper, 1984; Sala *et al.*, 1998).

Finalmente, las LX son eicosanoides con actividad antiinflamatoria en enfermedades inflamatorias como la glomerulonefritis (GN) y la hipersensibilidad.

Son capaces de inhibir la quimiotaxis sobre los neutrófilos, la adhesión y la trans migración leucocitaria (McMahon, 2001; Mitchell *et al.*, 2002).

Otro potente mecanismo iniciador y amplificador de la inflamación es el formado por **proteínas del sistema del complemento**. Se va activando desde el inicio de la respuesta inflamatoria por diferentes vías (vía clásica, vía de la lectina o vía alternativa), al fragmentarse en dos moléculas por procesos proteolíticos en cascada. Nueve son las proteínas que integran este sistema presente en el suero sanguíneo, designadas con los símbolos C1 hasta C9. Los diferentes fragmentos activados inducen sus acciones a través de su interacción específica con receptores presentes en distintas células, estimulando la trans migración de las células inflamatorias hacia el tejido lesionado por quimiotaxis, induciendo la degranulación de los mastocitos y basófilos, así como la secreción de aminas vasoactivas y síntesis de PG y LT, fagocitosis, lisis y opsonización de bacterias y cuerpos extraños (Kirschfink, 1997).

Figura 1. Componentes celulares y mediadores químicos de la inflamación.



Se detecta un importante movimiento de **células leucocitarias** en la zona lesionada que resultan imprescindibles para el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Mediante técnicas de tinción se han identificado las vénulas postcapilares como la diana de algunos mediadores inflamatorios implicados en la diapédesis de dichas células (Moyer *et al.*, 1988). Esta transmigración celular coincide con niveles máximos de la enzima COX-2 detectados en exudados plasmáticos (Sampson, 2000). Estudios histológicos y de microscopía electrónica demuestran cómo el número, la morfología y el tamaño de los espacios interendoteliales van cambiando a lo largo del proceso inflamatorio (Baluk *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 1999). En muchos órganos, las vénulas presentan sensibilidades diferentes a los mismos mediadores inflamatorios y, a diferencia de las arteriolas y capilares, las vénulas permiten la adherencia de leucocitos como respuesta específica a mediadores inflamatorios como la histamina, la bradicinina y la serotonina (Thruston *et al.*, 2000).

Las primeras células en llegar a la zona lesionada, inducidas directamente por la quimiotaxis provocada por C5a, C3a, PG, son los **neutrófilos**, con gran capacidad de destruir, fagocitar y eliminar el agente agresor. Generan señales quimiotácticas además de estimular otras células a liberar quimioatrayentes como la interleucina IL-8 (Wetering *et al.*, 2002).

Les siguen los **monocitos**, células móviles también con capacidad fagocítica (Celi *et al.*, 1994). Dejan la sangre a las pocas horas de ser producidos migrando hacia casi todos los tejidos. Una vez allí se activan pasando a convertirse en macrófagos. Estos juegan un papel muy importante en el desarrollo de la inmunidad ya que tras la ingestión y el procesamiento del agente antigénico lo "presenta" a los linfocitos. Los **linfocitos T** y los macrófagos, una vez en el tejido inflamatorio, sintetizan y liberan factores proteicos como el TNF- α , la IL-1, así como factores estimulantes de neutrófilos y monocitos. El TNF- α interviene en la localización del agente nocivo, amplificación de las respuestas celulares y de los mediadores y en la limitación de la extensión y duración del proceso inflamatorio (Marino *et al.*, 1997). Los linfocitos no son células móviles como los granulocitos y los macrófagos. Pasan a la circulación a través de los canales linfáticos desde donde son drenados hacia el sistema venoso. Se localizan en grandes cantidades en los

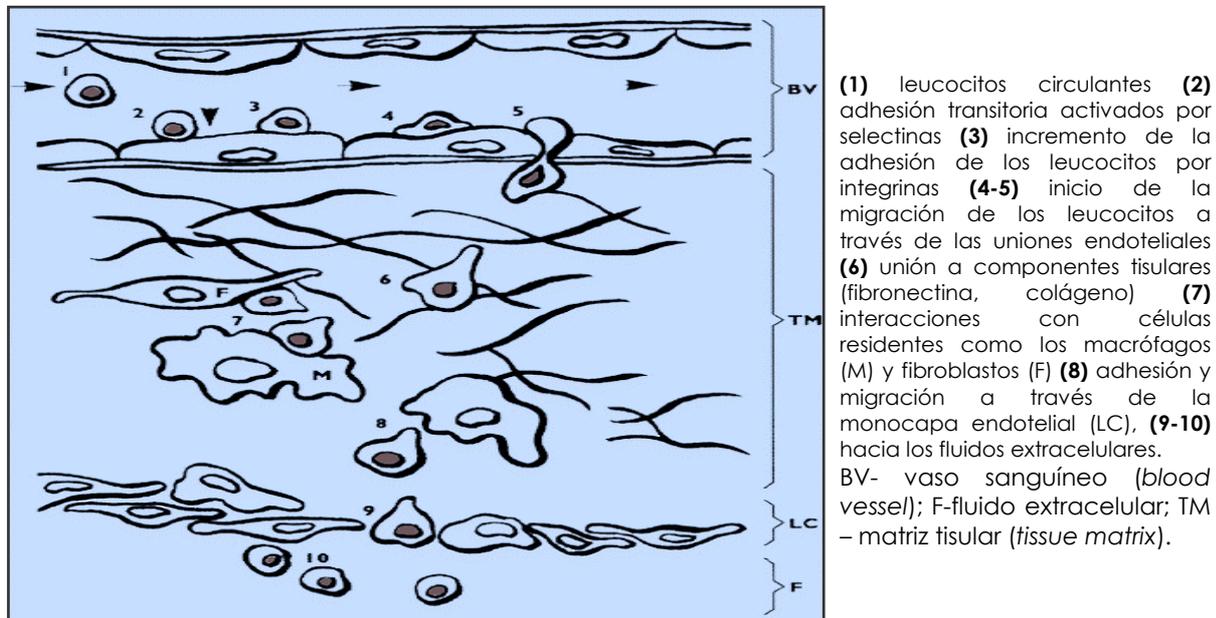
nódulos linfáticos, en las amígdalas, en el timo, en el bazo y en el tejido linfoide del tracto gastrointestinal. Los linfocitos T y B producen un amplio rango de péptidos distintos a las inmunoglobulinas y mediadores proteicos inflamatorios llamados **citocinas**. Estos últimos atraen y modulan las funciones de las células implicadas en las respuestas infecciosas e inmunoinflamatorias, incluyendo las células endoteliales, las células de la musculatura lisa y los fibroblastos. Las células conocidas como *natural killer* (NK) (Aronson *et al.*, 1988), con funciones fagocíticas, están en muy estrecha relación con los linfocitos T.

Otros granulocitos presentes en el tejido inflamado son los **eosinófilos**, si bien predominan en inflamaciones causadas por parásitos, eventualmente por hifomicetos, en reacciones alérgicas y en inflamaciones inespecíficas (Sampson, 2000). Liberan proteínas citotóxicas y mediadores lipídicos que causan lesión tisular. También inducen quimiotaxis sobre los mastocitos y basófilos. Los **basófilos**, considerados mastocitos circulantes, liberan histamina y cantidades menores de bradicinina y serotonina, contribuyendo al proceso inflamatorio y a reacciones alérgicas (Oliver *et al.*, 2000).

La **transmigración de leucocitos** desde los vasos sanguíneos hacia la zona inflamada sucede en varias fases secuenciales que dependen de circunstancias locales. El reclutamiento de células inflamatorias hacia los tejidos lesionados implica interacciones entre diferentes tipos de mediadores como el factor C5a, el PAF, el LT B₄, las IL-1 y 8 y el TNF- α . De esta manera se induce la expresión de genes que promueven la síntesis de proteínas proinflamatorias. Así pues, en las células endoteliales se induce la expresión de las **selectinas**, proteínas que promueven la pérdida del movimiento circulante de los leucocitos en el interior del vaso permitiendo la adhesión de éstos al endotelio venoso postcapilar (Thruston *et al.*, 2000). Seguidamente, se ven implicadas las **integrinas**, proteínas de superficie que participan directamente en las interacciones más firmes célula-célula. Otras moléculas implicadas en la adhesión superficial de las células de la serie blanca son el **fibrinógeno** y las **inmunoglobulinas (Ig)**. A partir de aquí, los leucocitos migran (Springer, 1994; Butcher *et al.*, 1996) mediante movimientos ameboides hacia la zona inflamada. El proceso de migración es similar para todos los granulocitos,

monocitos y linfocitos, difiriendo sólo los factores quimiotácticos y citocinas implicadas en el inicio y control.

Figura 2. Interacciones en el reclutamiento de leucocitos desde la sangre al tejido inflamado.



Las **citocinas** son proteínas generalmente glicosiladas, también conocidas como interleucinas (IL). Tienen capacidad de mediar y regular las respuestas inmunológicas e inflamatorias así como la hemopoyesis (Creange et al., 1998; Junger y Sorkin, 2000; Black y Garbutt, 2002). El origen celular de las IL es muy diverso. Son sintetizadas por linfocitos T y monocitos, por células endoteliales, epiteliales, fibroblastos, astrocitos y mastocitos (Gordon et al., 1990). Una misma citocina puede ejercer diversas funciones y actuar simultáneamente sobre múltiples poblaciones celulares. Su síntesis se induce como respuesta a estímulos activadores, liberándose y actuando sobre receptores específicos de membrana, cuya expresión también es a veces un fenómeno transitorio e inducido. Las citocinas ejercen su actividad de manera secuencial, sometidas a una compleja interregulación destinada a mantener la homeostasis de procesos proliferativos, de diferenciación y reparación celular (Shebuski y Kilgore, 2002). Entre sus efectos inflamatorios podemos destacar: la movilización y activación de los leucocitos, la activación de la proliferación y diferenciación de linfocitos T y B, la activación de las enzimas COX y LPX, la promoción de la síntesis de mediadores lipídicos, de NO, y otras citocinas así como de moléculas de adhesión. Las citocinas también activan

los eosinófilos, los monocitos, los mastocitos, las células NK. Causan expansión clonal de linfocitos T y atraen o reclutan células hacia la zona inflamada, induciendo cambios en la forma y movimiento de neutrófilos con movilización del Ca^{2+} intracelular. También tienen capacidad antivírica y antitumoral. Todas estas actividades biológicas desarrolladas por las citocinas están mediadas por la activación de receptores celulares específicos agrupados en varias superfamilias por homología estructural, aunque hasta el momento los mecanismos de transducción intracelular no se conocen muy bien.

De todo lo anterior se deduce que los mecanismos que controlan el proceso inflamatorio son múltiples y complejos, si bien las vías de señal proinflamatoria así como los mecanismos celulares que inician la respuesta inflamatoria en su gran mayoría están bien caracterizadas. Los productos de los sistemas enzimáticos sanguíneos (el sistema del complemento, el sistema de la coagulación, el sistema fibrinolítico y las cininas), los compuestos lipídicos de nueva síntesis como las PG y los LT, las sustancias vasoactivas liberadas desde los mastocitos tisulares, los basófilos, y las plaquetas, así como las IL, los neurotransmisores, etc., son, todos ellos, mediadores que facilitan y modulan la reacción inflamatoria. Todas estas sustancias pueden interaccionar, a distintos tiempos, con los componentes neuronales y no neuronales anteriormente mencionados. A la vez todas ellas son posibles dianas en el tratamiento farmacológico de la inflamación aguda, de manera que son muchas las posibilidades de tratamiento del proceso inflamatorio.

Hasta ahora poco se sabe sobre los mediadores y mecanismos que detienen la inflamación. Recientes estudios indican que la **resolución** de la **inflamación** es un proceso activo controlado por mediadores endógenos, que suprimen la expresión de genes proinflamatorios y señales celulares. También inducen apoptosis de las células inflamatorias y fagocitosis, cruciales para llegar a la resolución final con éxito (Willoughby *et al.*, 2000; Lawrence *et al.*, 2002). Parece que los macrófagos son una fuente importante de proteínas implicadas en la resolución de la inflamación. El control de estas células durante el desarrollo de la inflamación aguda puede ser crucial a la hora de determinar si la lesión se resuelve o se cronifica el proceso.

3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA INFLAMACIÓN.

Clásicamente los fármacos con acción antiinflamatoria se clasifican en dos grandes grupos: los glucocorticoides y los antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

3.1. Glucocorticoides.

Son hormonas sintetizadas en la corteza suprarrenal (cortisol, cortisona y corticosterona), implicadas en el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos y las proteínas. A dosis suprafisiológicas muestran una potente acción antiinflamatoria, lo que ha llevado al desarrollo de compuestos sintéticos con mayor poder antiinflamatorio que las hormonas naturales y con una reducida capacidad mineralcorticoide.

Los glucocorticoides actúan a través de receptores específicos citoplasmáticos, los cuales una vez activados migran al núcleo induciendo cambios en la transcripción de determinados genes implicados en la respuesta inflamatoria (Saklatvala, 2002). Los efectos antiinflamatorios de estas hormonas son el resultado de la inhibición de la expresión de citocinas proinflamatorias, como la IL-12, el TNF α y la producción de PG (Elenkov y Chrousos, 2002). De esta manera se disminuyen las manifestaciones inmediatas de la inflamación, como son rubor, dolor, etc., así como las tardías, entendiéndose como tales ciertos procesos de cicatrización y proliferación celular. También inhiben la vasodilatación y disminuyen el trasudado plasmático reduciendo la formación de edema. Modifican las interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales alterándose la trans migración de los primeros hacia la zona lesionada (Pitzalis *et al.*, 2002). Reducen la liberación de enzimas lisosomales así como de mediadores proinflamatorios y bloquean la recaptación extraneuronal de catecolaminas, potenciándose la vasoconstricción inducida por catecolaminas endógenas (Devillier, 2001; Belvisi *et al.*, 2001).

3.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

En 1971 Vane demostró que las acciones antiinflamatorias de los AINE se debían a la capacidad de inhibir la enzima COX. Des esta manera se disminuía la síntesis de PG y otros eicosanoides. En la década de los 90 se demostró la existencia de dos isoformas de esta enzima (Fu *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 1991): la COX-1, que se

expresa de manera constitutiva en prácticamente todos los tejidos y media respuestas fisiológicas (citoprotección del estómago, agregación plaquetaria, etc.), y la COX-2, expresada por células implicadas en la respuesta inflamatoria (macrófagos, monocitos, sinoviocitos) y regulada por un amplio espectro de mediadores específicos de la inflamación destacando las PG. Los efectos indeseables derivados de la administración de AINE, como son la úlcera gastrointestinal, la hemorragia gástrica y las disfunciones plaquetarias, se atribuyen a la supresión de la COX-1. Los efectos analgésicos y antipiréticos de los AINE se explican por la inhibición de la síntesis de PG dependientes de la COX-2. Esta es la razón por la que actualmente se hayan introducido en terapéutica inhibidores específicos de la enzima COX-2, como celecoxib, rofecoxib y otros al parecer con menos efectos indeseables de carácter digestivo pero no desprovistos de otros efectos indeseables como los que aparecen en el área cardiovascular (Hinz y Brune, 2002).

3.3. Opioides.

Estudios preclínicos realizados en la década de los 80 demostraron que los **opioides** son eficaces no sólo como analgésicos sino también como antiinflamatorios. En modelos de inflamación aguda inducida por agentes químicos, como el dextrano (Zeitune *et al.*, 1991), la carragenina (Joris *et al.*, 1991), la administración de morfina reduce el edema entre un 50% y un 30%, respectivamente, inhibiéndose también la extravasación plasmática en un 40% en este último modelo. Este opioide también altera la capacidad fagocítica de neutrófilos y monocitos (Luza, 1992). Estudios *in vitro* demuestran que los POE interaccionan con los granulocitos, sobre todo neutrófilos induciendo cambios en la forma de dichas células (Falke y Fischer, 1985; Fischer y Falke, 1987), modificando su adherencia al endotelio vascular y modulando la fase de trans migración celular de la respuesta inflamatoria. De esta manera se reduce el paso de estas células hacia la zona lesionada, inibiéndose los efectos proinflamatorios ocasionados por ellas.

Hasta el momento, no se conocen con exactitud los mecanismos mediante los cuales los opioides inducen estos efectos. Sin embargo es conocida la importante implicación de neurotransmisores como SP y el CGRP, así como la histamina en el efecto antiinflamatorio de estos fármacos. La activación de los RO

induce una disminución en la liberación de dichos neurotransmisores desde las terminaciones sensoriales nociceptivas (Khalil y Helme, 1990).

Tabla 1. Principales efectos terapéuticos de los opioides.

EFFECTO	USO TERAPÉUTICO
Analgesia Sedación / sueño Constipación Depresión refleja de la tos Depresión respiratoria Depresión circulatoria Náuseas y vómitos Retención urinaria Euforia, disforia	Tratamiento del dolor, anestesia Anestesia, sedación Antidiarreicos Antitusígenos
DISMINUCIÓN DEL EDEMA Y DE LA EXTRAVASACIÓN DE PLASMA	ANTIINFLAMATORIOS

La tolerancia y la dependencia física que induce la administración de opioides, así como los efectos indeseables, como la depresión del sistema respiratorio y circulatorio, las náuseas, los vómitos, la euforia, derivados todos ellos de su acción central harían desaconsejable su uso como antiinflamatorios. Sin embargo, la administración tópica de fármacos opioides o la de productos con reducida capacidad para atravesar la BHE evitaría su paso al SNC, previniendo los efectos no deseables de acción central.

3.4. Otras posibilidades.

Teniendo en cuenta que durante la inflamación participan numerosos mediadores y células, una estrategia a seguir es la de impedir que éstos lleguen a actuar, antagonizándolos mediante la administración de sustancias que impidan su interacción con los receptores específicos u órganos diana.

Así pues tenemos los **inmunosupresores** cuya administración reduce el número de células inmunitarias del organismo disminuyendo el paso de éstas a la zona lesionada, evitando la liberación de citocinas, quimiocinas, etc. La

administración de **antagonistas** para los distintos **mediadores proinflamatorios**, bradicinina, histamina, serotonina, SP, leucotrienos, complemento (Quartara y Maggi, 1998; Marone *et al.*, 1999; Graziano *et al.*, 2000; Smith y Smith, 2001) **inhibidores** de **enzimas** como la NOS (Olszanecki *et al.*, 2002) o la 5-LPX con la consecuente disminución de la respuesta inflamatoria. El empleo de **inhibidores** de la expresión de **moléculas de adhesión** (Machelska *et al.*, 1998) al endotelio vascular, que evitan el paso de células leucocitarias hacia el tejido lesionado modificando considerablemente la formación de edema y extravasación de plasma en zonas periféricas ya sean articulares, cutáneas o del aparato respiratorio.

El conocimiento que se tiene en la actualidad de los mecanismos celulares y moleculares sobre la regulación del proceso inflamatorio permite el empleo de otros fármacos cuya estrategia está dirigida a prevenir la respuesta inflamatoria, en vez de atenuar las acciones de los mediadores una vez liberados.

4. SISTEMA OPIOIDE ENDÓGENO (SOE): receptores y ligandos endógenos.

De todos es conocido que el opio era empleado en la antigüedad por sus acciones analgésicas. Durante muchos siglos fue una de las pocas opciones realmente eficaces de que disponían los médicos para combatir el dolor. En 1805, Friedrich Sertürner, un joven farmacéutico alemán, consiguió aislar la morfina, el principal alcaloide del opio, y pocos años después se aislarían la codeína y la papaverina. El empleo de morfina en lugar de opio no se generalizó hasta que aparecieron las agujas hipodérmicas en 1853, hecho que permitió su administración por vía parenteral (Browstein, 1993).

El uso indiscriminado de morfina en los soldados heridos en las guerras puso de manifiesto la adicción que inducía este analgésico. Ello estimuló la búsqueda de fármacos de eficacia similar a la morfina pero carentes de su capacidad adictógena. Se obtuvo la diacetilmorfina, conocida como heroína, muy utilizada a principios del siglo XX hasta descubrirse que su capacidad adictógena era aún superior a la de la morfina.

Desde que en 1973 los grupos de Snyder, Simon y Terenius descubrieran la existencia de los receptores opioides (RO), se han intensificado los esfuerzos dedicados a estudiar sus funciones. Ello ha permitido identificar tres tipos de RO a los que se les ha denominado mu (μ), delta (δ) y kappa (κ) (Martin *et al.*, 1976; James y Goldstein, 1984; Gillan y Kosterlitz, 1982). Mediante el empleo de agonistas y antagonistas selectivos se han podido conocer las características de cada uno de ellos, su distribución tanto en estructuras supraespinales y espinales como periféricas, así como sus ligandos endógenos (péptidos opioides endógenos, POE) conocidos como encefalina, β -endorfina y dinorfina (Hughes *et al.*, 1975; Li y Chung, 1976; Goldstein *et al.*, 1979).

Tanto los receptores (RO) como los péptidos opioides endógenos (POE) forman parte del denominado sistema opioide endógeno (SOE) distribuido ampliamente por el organismo de los mamíferos y que es capaz, no sólo de modular el dolor y la afectividad, sino también otras funciones del sistema nervioso como el aprendizaje y la memoria, la actividad locomotora, la secreción

neuroendocrina, funciones vegetativas, así como respuestas inmunológicas (Herz, 1998; Schultz y Gross, 2001; Cabot, 2001).

4.1. RECEPTORES OPIOIDES (RO).

El reciente clonaje de los RO de las especies murina y humana, ha permitido conocer sus propiedades farmacológicas y bioquímicas, su distribución anatómica, así como los mecanismos moleculares que regulan su síntesis. De los resultados obtenidos en estudios farmacológicos y bioquímicos se concluye la existencia de subtipos distintos para cada RO, esto es: tres subtipos μ (μ_1 , μ_2 y μ_3), dos subtipos δ (δ_1 y δ_2) y tres para el receptor κ (κ_1 , κ_2 y κ_3) (Jiang *et al.*, 1991; Wollemann *et al.*, 1993; Zaki *et al.*, 1996; Pasternak, 2001), si bien no se han confirmado molecularmente.

Debido a esta multiplicidad de RO y a su amplia distribución en estructuras espinales y supraespinales (Mansour *et al.* 1995), la administración de opioides induce un gran número de respuestas farmacológicas (Stanfa y Dickenson, 1995), encontrándose diferencias muy importantes entre los RO μ y κ (Pan, 1998).

Sea cual sea el tejido y la especie de donde se han aislado los RO los resultados indican, hasta ahora, un sólo gen de origen (Uhl *et al.*, 1994; Kieffer, 1997). La presencia de intrones en la secuencia génica permite quizás, mediante el *splicing* alternativo, la generación de variantes y probablemente de los distintos subtipos de RO (Pan, 2002). Todo indica que las condiciones ambientales del tejido (neuronal o no neuronal) pueden inducir la expresión de uno u otro subtipo de RO. Por otra parte, las líneas celulares empleadas para estos estudios pueden subestimar la posible variabilidad existente dentro de la familia de RO (Wei y Loh, 2002). Hasta el momento se sabe que los RO tanto de rata como de ratón son aparentemente idénticos a los RO humanos (Kieffer, 1997), tanto en la estructura como en la respuesta farmacológica, quedando justificados todos los estudios comparativos realizados.

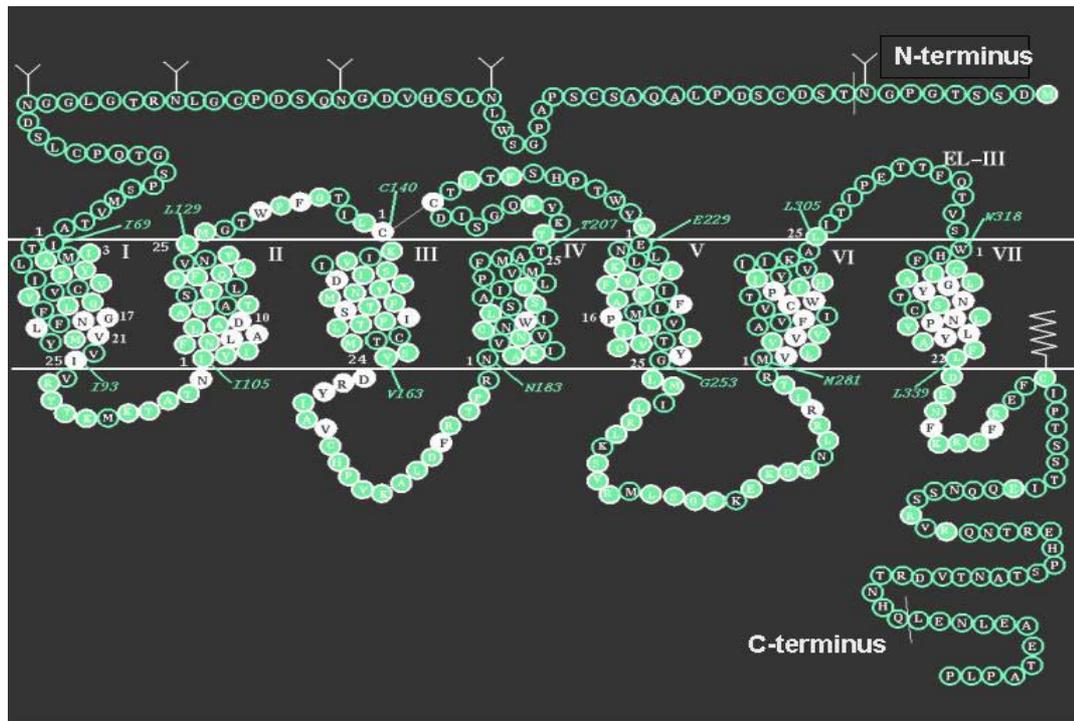
Recientemente, se ha aislado un nuevo RO denominado ORL-1 (*opioid receptor like 1 u orphan OR*; Wick *et al.*, 1994; Anton *et al.*, 1996; Peluso *et al.*, 1998) cuyo ligando endógeno es un péptido de 17 aminoácidos denominado

nociceptina (Meunier *et al.*, 1995; Reinscheid *et al.*, 1995) que posee un cierto parecido con la dinorfina.

4.1.1. Características moleculares de los RO.

Los análisis de la secuencia de los RO μ , δ y κ clonados demuestran que son receptores de membrana acoplados a proteínas G, con 398, 372 y 380 aminoácidos, respectivamente. Presentan una estructura molecular con siete dominios hidrofóbicos α -hélices que atraviesan la membrana celular, conocidos como dominios transmembrana (TM), interconectados por medio de seis lazos o bucles, tres de ellos expuestos al espacio extracelular (*extracelular loops*, EL) y los otros tres en el citoplasma (*intracelular loops*, IL). El extremo N-terminal queda expuesto fuera de la célula con múltiples lugares glicosilados, mientras que la región C-terminal se localiza en el citoplasma celular. El tercer lazo intracelular (IL3) tiene múltiples α -hélices anfipáticas, y el cuarto lazo intracelular (IL4) está formado por lugares susceptibles a reacciones de palmitoilación muy cerca del extremo C-terminal (Evans *et al.*, 1992; Kieffer *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1993a y b; Li *et al.*, 1993; Meng *et al.*, 1993).

Entre los diferentes RO hay un 60-70% de homología. Los dominios TM y IL son los que presentan mayor homología con un 73-76% y 86-100%, respectivamente. La mayor divergencia se encuentra en las secuencias aminoacídicas del extremo N-terminal, los EL segundo y tercero y el C-terminal con sólo un 9-10%, 14-72% i 14-20% de holomogía respectivamente (Chen *et al.*, 1993 a y b). La mayoría de ligandos se unen entre las hélices si bien, algunas veces, los lazos periplasmáticos también están implicados en el reconocimiento del ligando (Jordan y Devi, 1998). El segundo y tercer lazo citoplasmáticos, así como parte del extremo C-terminal del RO están implicados en el reconocimiento de la proteína transductora. Experimentos de sustitución por mutagénesis dirigida de determinados aminoácidos en la estructura del receptor han permitido identificar los residuos que participan en dicha unión. Así, se ha sabido que la sustitución de un solo residuo (Lys108) permite la unión de agonistas específicos μ a RO- δ portadores de dicha sustitución (Minami *et al.*, 1996) o que la sustitución de un solo residuo de serina en los tres RO (Ser196 en los μ , Ser177 en los δ y Ser187 en los κ) confiere propiedades de agonista a antagonistas opioides inespecíficos como la naloxona (Claude *et al.*, 1996).

Figura 3. Receptor opioide μ .

4.1.2. Activación de los RO y consecuencias moleculares.

El agonista opioide interacciona con el receptor específico, RO, propagándose la señal de transducción mediante una interacción secuencial con proteínas G y el sistema efector. Este último puede ser: adenilato ciclasa (Evans *et al.*, 1992; Kieffer *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1993 a y b; Meng *et al.*, 1993); canales de Ca^{2+} de tipo N (Tallent *et al.*, 1994) y L (Piros *et al.*, 1996); la fosfolipasa C (PLC C) (Johnson *et al.*, 1994; Spencer *et al.*, 1997); canales de K^+ (Henry *et al.*, 1995) y proteínquinas ERK_1 y ERK_2 ; (Fukuda *et al.*, 1996; Li y Chang, 1996).

La activación o inhibición de los sistemas efectores lleva a cambios en los niveles intracelulares de segundos mensajeros (AMPc, IP_3 , DAG), que alteran la fosforilación de proteínas intracelulares. Estas modificaciones cambian la expresión de proteínas acopladas a canales iónicos, proteínas nucleares como son los factores de transcripción denominados CREB (*cAMP response element binding*) y fos (Messersmith *et al.*, 1998). Estas proteínas se unen a secuencias específicas de ADN en las regiones promotoras de determinados genes implicados en la respuesta inflamatoria, modificando la síntesis de proteínas proinflamatorias.

Como ya se ha comentado, los RO se encuentran acoplados a proteínas G. Estas proteínas G transfieren la señal a otras proteínas celulares con actividad enzimática (AC, PLP C, etc.) que catalizan la síntesis de segundos mensajeros. La proteína G que estimula el sistema enzimático productor de segundo mensajero se denomina proteína G estimuladora (G_s), mientras que la que inhibe dicho sistema enzimático se conoce como proteína G inhibidora (G_i). Ambos tipos de proteínas G son triméros constituidos por una subunidad α , capaz de unirse a nucleótidos de guanina, una subunidad β y una subunidad γ (Neer y Clapham, 1988; Neer y Smith, 1996). Tanto la proteína G_s como la G_i pueden existir en dos estados diferentes. En su forma inactiva, las proteínas G son trímeros cuya subunidad α presenta una molécula de GDP unida. Cuando el complejo ligando-receptor se une al complejo proteína G-GDP, el GDP es desplazado por el GTP. Este intercambio de nucleótido lleva a la disociación del trímero, dando lugar al dímero $\beta\gamma$ y a un complejo $G\alpha$ -GTP, el cual estimulará (en el caso de G_s) o inhibirá (en el caso de G_i) al sistema generador del segundo mensajero. Tras la hidrólisis del GTP, el complejo $G\alpha$ -GDP resultante se une de nuevo al dímero $\beta\gamma$, generándose de nuevo la forma inactiva original. Se conocen, como mínimo, 16 isoformas de la subunidad α , siete β y cinco γ , hecho que confiere gran diversidad de vías de señal a la proteína G (Neer y Clapham, 1988).

Así pues, los RO activados se acoplan a proteínas G_i/G_o , ambas formas sensibles a la toxina pertusis. La activación de los receptores μ , δ y ORL-1 con la proteína $G_{i/o}$ lleva a la inhibición de la AC (Sharma *et al.*, 1977), y a la apertura los canales de K^+ (North *et al.* 1987). La activación del receptor κ induce el cierre de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (Hescheler *et al.*, 1987; Surprenant *et al.*, 1990). Recientemente, se ha demostrado la capacidad de los RO en regular la cascada de las MAP quinasas (*mitogen-activated protein*) (Li y Chang, 1996; Fukuda *et al.*, 1996).

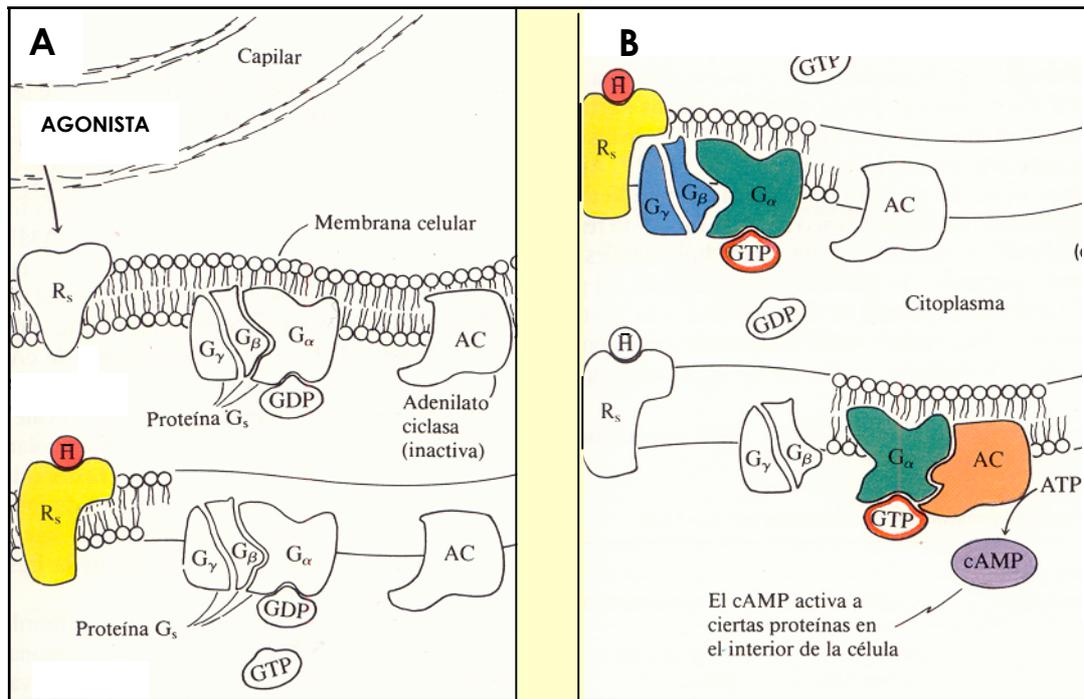
La activación de los RO μ , δ y ORL-1 hiperpolariza la neurona por la entrada de K^+ , hecho que disminuye la duración de los potenciales de acción, atenuándose o inhibiéndose la excitabilidad de las terminaciones sensoriales periféricas nociceptivas así como la propagación de dichos potenciales (Fan *et al.*, 1991; Childers, 1991; Piro *et al.*, 1996; Jordan y Devi, 1998). El bloqueo de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, sobre todo por los RO κ , provoca una reducción de

la entrada de este catión, con cambios en el potencial de membrana y por lo tanto en la despolarización de la neurona (Duggan y North, 1983; Kanjhan, 1995; Vaughan y Christie, 1996) y disminución de la liberación de neurotransmisores excitadores como SP (Lembeck y Donnerer, 1985) y glutamato (Grubb, 1998).

Además de estas acciones inhibitoras de los opioides por su interacción con los RO acoplados a proteínas $G_{i/o}$ se han demostrado efectos estimulantes como resultado de la interacción de dichos receptores con proteínas G_s , sensibles a la toxina del cólera (Crain y Shen, 1990; 1996; Ammer y Schulz, 1997;). Estudios realizados en cultivos celulares implican las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas $G_{i/o}$ en la estimulación de la AC de tipo II (Olianas y Onali, 1999), mientras que en otros se habla de la entrada del Ca^{2+} y activación de la calmodulina (Fields y Sarne, 1997).

La estimulación de la AC lleva a la activación de proteinquinasas, como la PK A, incrementándose los niveles de fosforilación, entre otras, de proteínas sinápticas (Sarne *et al.*, 1996), induciendo sobre las neuronas respuestas estimulantes. Se ha demostrado que la estimulación de la PL C por la unión RO-fármaco puede llevar a un incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular, catión liberado desde el retículo endoplásmico, con la consiguiente formación de DAG e IP_3 induciendo una respuesta excitadora (Jin *et al.*, 1994; Harrison *et al.*, 1998). Estudios *in vitro* realizados a partir de neuronas procedentes del ganglio de la raíz dorsal apuntan a la participación de proteínas G_s en la activación de la AC, el aumento en la duración del potencial de acción y el cierre de los canales de K^+ (Cruciani *et al.*, 1993; Crain y Shen, 1998). Cabe destacar que tanto la vía inhibitora como la estimulante pueden activarse simultáneamente por los opioides. A bajas concentraciones (nM) de agonistas μ o δ opioides se potencia la síntesis de AMPc, mientras que los efectos inhibitoros se establecen a mayores concentraciones (μM) (Fields y Sarne, 1997). Así pues, el efecto opioide puede ser dual, en función del balance entre las dos vías, solapándose o no según los mecanismos a través de los que están reguladas.

Figura 4. Etapas en la transducción de señal de un agonista a través de su interacción con el receptor específico de membrana.



A) El agonista se une al receptor de membrana induciendo un cambio conformacional en él, permitiéndole intercambiar GDP por GTP. **B)** Este complejo interactúa con la adenilato ciclasa (AC), que activada induce la formación de AMPc. En el caso concreto de los RO éstos están principalmente acoplados a proteínas G_i, obteniéndose una inactivación de la AC y por lo tanto, una reducción de los niveles de AMPc.

4.1.3. Inactivación de los RO.

Inmediatamente después de la administración de agonistas opioides los RO se activan. Al mismo tiempo, se inician procesos reguladores, que llevan a la inactivación de los mismos, con una disminución en número y pérdida de funcionalidad, conocida como desensibilización. Se han realizado estudios inmunohistoquímicos con microscopía confocal, tanto en células transfectadas humanas como de murinos, así como en muestras histológicas después de administrar agonistas opioides. Los resultados obtenidos visualizan cambios en la distribución de los receptores μ (Sternini *et al.*, 1996;), δ (Trapaidze *et al.*, 2000) y κ (Zhu *et al.*, 1998) en las membranas plasmáticas de las células estudiadas, con una rápida internalización de los mismos por endocitosis, con la formación previa de oligómeros (Gaudriault *et al.*, 1997). El proceso de internalización del receptor también se ha observado en neuronas *in vivo* (Sternini *et al.*, 1996), y de igual

manera que con los sistemas *in vitro*, ocurre a los pocos minutos de la activación de los RO μ y δ (Hasbi *et al.*, 2000). Como otros receptores acoplados a proteínas G, a esta fase de internalización de los RO le sigue el reciclado y la resensibilización de los mismos, recuperándose la funcionalidad de los mismos, mecanismos dependientes del estado de fosforilación de los mismos (Yu *et al.*, 1997), implicándose el sistema de las MAP quinasas (Polakiewick *et al.*, 1998).

El proceso conocido como *down-regulation* es un proceso más lento, observado varias horas después de una exposición continuada a los agonistas (Law *et al.*, 2000). Si bien en ambos procesos, internalización y *down-regulation* aparecen vesículas intracelulares que contienen los RO (Keith *et al.*, 1998), es concretamente con el segundo que se llega a la degradación lisosomal de estos receptores. No obstante, no todos los opioides se comportan de la misma manera. Estudios tanto *in vivo* como *in vitro* indican que, aunque ciertos agonistas alcaloides estimulan la internalización de los RO de manera similar a los ligandos endógenos, la morfina activa los RO μ sin internalizarlos (Cvejic y Devi, 1997).

4.1.4. Expresión de RO en estructuras supraespinales.

Mediante técnicas de autorradiografía se han localizado y cuantificado los lugares de unión de RO con sus ligandos a nivel del **SNC**. Las posibles limitaciones para su resolución anatómica se han suplido con las técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica que permiten visualizar el ARNm localizado en las células que sintetizan el RO en cuestión (Mansour *et al.*, 1993, 1996). El conocer la localización anatómica de los RO sugiere la posible modulación del SOE sobre otros sistemas neuronales como el dopaminérgico, colinérgico y serotoninérgico (Mansour *et al.*, 1995).

Tabla 2. Caracterización de los RO clonados.

RO clonados	DISTRIBUCIÓN del ARNm
μ	• Tálamo, núcleo estriado, locus coeruleus y núcleo del tracto solitario.
δ	• Córtex, núcleo estriado reticular lateral.
κ	• Hipotálamo, núcleo accumbens, sustancia negra, área ventral tegmental, núcleo del tracto solitario.

Los RO clonados tienen propiedades de unión a sus ligandos similares a los RO caracterizados a partir de homogenados de cerebro.

4.1.5. Expresión de RO en estructuras neuronales periféricas.

Los estudios anatómicos (LaMotte *et al.*, 1976; Stein *et al.*, 1990; Hassan *et al.*, 1993; Jeanjean *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 1995; Coggeshall *et al.*, 1997), moleculares (Mansour *et al.* 1995) y electrofisiológicos (Moises *et al.*, 1994) han demostrado que los tres tipos de RO (μ , δ y κ), se expresan en **las neuronas sensoriales**, concretamente, en los cuerpos celulares de estas neuronas localizados en las raíces de los ganglios dorsales (Ji *et al.*, 1995; Mansour *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1998). Los RO una vez sintetizados son transportados en vesículas hacia las terminaciones nerviosas periféricas (Stein *et al.*, 1990; Hassan *et al.*, 1993; Coggeshall *et al.*, 1997) al igual que hacia estructuras centrales (LaMotte *et al.*, 1976). La masa de RO se localiza en las terminaciones presinápticas de las fibras C al entrar en la médula espinal, si bien también hay una expresión de RO a nivel postsináptico (Besse *et al.*, 1990). Estudios de saturación y competición indican que las características farmacológicas de estos tres RO periféricos son similares a los de los RO expresados en el cerebro (Hassan *et al.*, 1993).

Se ha demostrado que la inflamación periférica influye en la expresión de los RO en las terminaciones nerviosas sensoriales (Ji *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1998). Aunque los niveles de ARNm de los distintos RO en los ganglios dorsales no varían significativamente (Schäfer *et al.*, 1995), se han apreciado cambios importantes en el número de RO. Estos resultados sugieren que la inflamación incrementa el transporte de RO hacia las terminaciones nerviosas, localizados no sólo en el extremo sino también a lo largo del axón (Stein *et al.*, 1990; Hassan *et al.*, 1993; Jeanjean *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996). De esta manera se aumenta la densidad de los mismos en los nervios cutáneos de los tejidos inflamados además de inducirse un incremento del número de terminales nerviosas periféricas sensoriales (Hassan *et al.*, 1992).

A niveles bajos de pH, situación característica de la inflamación, se incrementa la eficacia de los agonistas opioides por dos mecanismos: por una parte se altera la interacción de los RO con las proteínas G (Selley *et al.*, 1993), y por otra los agonistas tienen mejor acceso a los RO neuronales, debido a que la inflamación ocasiona la disrupción del perineuro. En circunstancias normales, el perineuro, vaina conectiva que envuelve cada fibra nerviosa dentro de cada

nervio periférico, actúa como barrera evitando la difusión de péptidos de alto peso molecular o moléculas hidrofílicas (Olsson, 1990). En estados de inflamación, la disrupción del perineuro facilita el paso de péptidos opioides y otras macromoléculas a las neuronas sensoriales (Antonijevic *et al.*, 1995). Estudios recientes demuestran que la analgesia opioide periférica y la disrupción de la barrera perineural coinciden en el tiempo durante las fases iniciales de la inflamación y que ambos mecanismos pueden ser inducidos por el incremento de la osmolaridad en tejidos subcutáneos normales (Antonijevic *et al.*, 1995).

Se ha sugerido la **localización de RO a nivel de terminaciones simpáticas postganglionares (SPGN)** (Wüster *et al.*, 1981; Berzetei *et al.*, 1987, 1988). Estas fibras están implicadas en los efectos antinociceptivos/antiinflamatorios periféricos tras la administración de agonistas opioides δ y κ en estados de hiperalgesia inducida por bradicinina (Taiwo y Levine, 1991; Green y Levine, 1992) y por carragenina (Nakamura y Ferreira, 1987). Sin embargo, otros resultados experimentales cuestionan esta implicación (Koltzenburg *et al.*, 1992; Schuligoi *et al.*, 1994; Schäfer *et al.*, 1994). La extravasación plasmática inducida por bradicinina (Lee *et al.*, 1991; Miao *et al.*, 1996) y 5-HT (Pierce *et al.*, 1995) es dependiente de las SPGN, reduciéndose de manera significativa después de la simpatectomía química tras la administración de 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

4.1.6. Expresión de RO en tejidos no neuronales periféricos.

Los RO también se **expresan en las células inmunes** (Hassan *et al.*, 1993; Sharp *et al.*, 1998), presentando características similares a los RO localizados en las neuronas (Bidlack *et al.* 1992; Walker *et al.* 1997). Los opioides modulan la proliferación de las células inmunes así como algunas de sus funciones (Bryant y Holaday, 1993; Panerai y Sacerdote, 1997). Acciones inmunomoduladoras como la quimiotaxis, la producción de superóxido y de citocinas o la degranulación de los mastocitos pueden ser inhibidas o estimuladas a través de la activación de los RO (Heijnen *et al.*, 1991; Panerai y Sacerdote 1997; Sharp *et al.*, 1998).

Resultados experimentales obtenidos *in vitro* en **endotelio vascular** destacan la posible presencia de RO (μ_3) en estas estructuras no neuronales (Stefano *et al.*, 1995) cuya activación potencia la síntesis de NO, modulando la respuesta

inflamatoria y disminuyendo la adhesión de células leucocitarias al endotelio vascular. No obstante, otros resultados experimentales describen este posible subtipo de RO μ como un receptor perteneciente a otra familia distinta a la opioide (Makman *et al.*, 1998).

4.2. PÉPTIDOS OPIOIDES ENDÓGENOS (POE).

4.2.1. Características moleculares de los POE.

Los POE se clasifican en tres familias distintas. Cada una de ellas deriva de moléculas precursoras genéticamente diferentes. Sin embargo, estudios realizados mediante técnicas de ADN recombinante demuestran que entre ellos hay una gran semejanza y esto hace pensar que derivan de un gen inicial común. Destacamos la proopiomelanocortina (POMC), proteína precursora de las β -endorfinas; la proencefalina (PENC), precursora de la síntesis de las encefalinas y la prodinorfina (PDIN), precursora de las dinorfinas. La secuencia de estas tres proteínas se caracteriza por presentar, de manera repetida, ciertas secuencias de aminoácidos (Met- o Leu-encefalina) a lo largo de su estructura.

La POMC contiene una secuencia de Met-encefalina que codifica a la vez péptidos opioides y no opioides. De estos últimos destacamos la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y los péptidos de la familia de la hormona estimulante de los melanocitos (MSH). Generalmente, los POE están flanqueados por dos aminoácidos básicos (arginina y lisina). La región central de la POMC puede procesarse de diferentes maneras según el tejido que la exprese, generando ACTH, β -lipotropina, α -MSH, γ -lipotropina, β -MSH y β -endorfina. Aunque esta última contiene una secuencia met-encefalina no se convierte en este péptido (Scholzen *et al.*, 2000). La PENC contiene no menos de cuatro copias de Met-encefalina y una de Leu-encefalina, flanqueadas por pares de aminoácidos básicos. En el extremo C-terminal del precursor se encuentra el heptapéptido Met-encefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸, también flanqueado por aminoácidos básicos. La PDIN presenta tres copias de Leu-encefalina. El procesamiento selectivo en los residuos Lys-Arg comporta la formación de los péptidos α y β -neoendorfina y dinorfina A (1-17), el procesamiento subsiguiente de la dinorfina A da lugar a la dinorfina A (1-8) y

dinorfina B (1-13). El procesamiento completo en los pares de aminoácidos básicos da lugar finalmente a la Leu-enkefalina.

Las enzimas que fragmentan las moléculas precursoras no siempre liberan estas secuencias de Met-enkefalina o de Leu-enkefalina en forma pura sino asociadas a fragmentos de cadenas de aminoácidos que pueden modificar la afinidad y la potencia de acción sobre los RO. Recientemente se ha descubierto un nuevo tipo de tetrapéptidos endógenos selectivos para los receptores μ (Zadina *et al.*, 1997; Hackler *et al.*, 1997) llamados endomorfina que son estructuralmente distintos de los POE ya conocidos y cuyos genes aún no han sido aislados. Otros péptidos endógenos con acciones opioides μ son ciertas proteínas de la leche, conocidas como β -caseomorfina (Teschemacher *et al.*, 1997) o de la cadena β de la hemoglobina, llamadas hemorfina (Zhao *et al.*, 1997).

Tabla 3. Principales péptidos opioides endógenos (POE) y sintéticos.

POE	
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 ⁵]encefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
[Leu ⁵]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
Péptidos opioides sintéticos	
DAMGO	[D-Ala ² , MePhe ⁴ , Gly(ol) ⁵]encefalina
DPDPE	[D-Pen ² , D-Pen ⁵]encefalina
DSLET	[D-Ser ² , D-Pen ⁵]encefalina-Thr ⁶
DADLE	[D -Ala ² , D-Leu ⁵]encefalina
CTOP	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH ₂
[D-Ala ² , Glu ⁴]deltorfina	Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH ₂
Morficeptina	Tyr-Pro-Phe-Pro-NH ₂
PL017	Tyr-Pro-MePhe-D-Pro-NH ₂
DALCE	[D -Ala ² , Leu ⁵ , Cys ⁶]encefalina

4.2.2. Procesamiento enzimático de los POE.

Mientras que la liberación de POE a nivel de SNC es tónica como respuesta a un estímulo despolarizante en el SNP y desde las células del sistema inmune se debe a la acción de diversos mediadores inflamatorios.

Las moléculas precursoras de los POE se activan mediante la escisión de enlaces entre residuos básicos. El procesamiento no es el mismo en todos los tejidos y un mismo receptor puede originar diferentes péptidos, según el tejido y la señal recibida. Además, las peptidasas implicadas no son específicas, ya que la especificidad del sustrato es similar a la de otras enzimas como la tripsina, las carboxipeptidasas B y E, y posiblemente las aminopeptidasas (Sato *et al.*, 1992; Rosei *et al.*, 1994; Hiranuma *et al.*, 1998).

Por otra parte, la inactivación de los POE en el espacio extracelular es muy rápida y se debe a la acción enzimática de las peptidasas localizadas en la membrana celular que degradan los péptidos en fragmentos inactivos. Las enzimas mejor estudiadas son las encefalinasas, como la endopeptidasa neutra (Dutriez *et al.*, 1992; Otero *et al.*, 1993) y la aminopeptidasa N (Waters *et al.*, 1996; Balog *et al.*, 1999).

Los POE son fácilmente degradados por las peptidasas específicas, y tienen una muy baja capacidad de penetrabilidad a través de las membranas. La administración sistémica de inhibidores de estas peptidasas les confiere un cierto grado de protección de esta rápida degradación (Roques *et al.*, 1993).

4.2.3. Distribución anatómica de los POE.

La distribución a nivel del SNC de los distintos péptidos es muy amplia, existiendo diferencias en cuanto a la localización exacta de cada uno de ellos. Así pues, en estructuras supraespinales y concretamente en el núcleo arqueado, el hipotálamo y en los lóbulos anterior y medio de la hipófisis se encuentra una gran población de neuronas que expresan POMC. Desde estas áreas proyectan largos axones hacia diferentes estructuras del sistema límbico, tálamo medial, sustancia gris periacueductal, *locus coeruleus*, formación reticular, núcleo parabraquial y ambiguo, núcleo del tracto solitario y motor dorsal del vago. De esta manera,

según el tipo de célula, ubicación y especialización, el procesamiento de POMC en ACTH, β -endorfina o melanotropinas será diferente.

Las neuronas que contienen péptidos derivados de PENC se distribuyen por todo el SNC (Khachaturian *et al.*, 1983; Pego-Reigosa *et al.*, 2000), desde la corteza, donde hay gran cantidad de neuronas y fibras nerviosas, hasta las las láminas I y II de la médula espinal. Algunas forman pequeños circuitos locales, mientras que otras extienden sus proyecciones hacia regiones más distales. Las técnicas histoquímicas de hibridación *in situ* e inmunocitoquímica han demostrado la expresión de PENC a nivel del cerebelo. Posiblemente, esta extensa distribución haga que este sistema participe en funciones tanto sensoriales, como motoras y neuroendocrinas.

La distribución de PDIN también es extensa: corteza, estriado, amígdala, hipocampo, hipotálamo, sustancia gris periacueductal, diversos núcleos del tronco cerebral y asta dorsal de la médula espinal. A nivel de las vías nigro-estriónígrica y el sistema neurosecretor hipotálamo-hipofisario PDIN se co-expresa y co-libera con la vasopresina. Parece ser que la acción de la dinorfina a este nivel es inhibir la liberación de esta última. También hay expresión de PENC y PDIN en los lóbulos de la hipófisis, sistema nervioso vegetativo y entérico y en la médula suprarrenal. Se han detectado péptidos derivados prodinorfina y/o proencefalina a nivel de ganglios (Botticelli *et al.*, 1981; Przewlocki *et al.*, 1983) y de terminaciones periféricas de los nervios sensoriales (Weihe *et al.*, 1985; Hassan *et al.*, 1992).

En cuanto a la distribución de la expresión de nociceptina así como de su receptor específico, ORL1, es bastante difusa, tanto en el SNC como a nivel espinal.

Finalmente, también existe expresión de POE en los ganglios de la raíz dorsal, en los plexos nerviosos del estómago e intestino (Kromer, 1990).

4.2.4. Expresión de POE en estructuras no neuronales.

Cabe destacar la expresión de POE en la médula suprarrenal, el sistema reproductor, glándulas exocrinas del tracto gastrointestinal y en células del sistema inmune (Stein *et al.*, 1990, 1993). Durante la inflamación, los niveles de expresión de POMC, pro-encefalina, β -endorfina y met-encefalina, están incrementados considerablemente tanto en linfocitos como en macrófagos infiltrados en el tejido

lesionado (Przewlocki et al., 1992). Estudios recientes, demuestran que los macrófagos y otras células inmunes, como los linfocitos, expresan β -endorfina y met-enkefalina (Przewlocki et al., 1992; Herz, 1995).

4.3. Acciones farmacológicas de los opioides durante la inflamación aguda periférica.

La multiplicidad de RO y la amplia distribución de opioides induce una gran cantidad de efectos farmacológicos. En el hombre, los opioides, administrados sistémicamente, se utilizan por su efecto analgésico, debido a la activación simultánea de RO situados a nivel periférico, espinal y supraespinal, existiendo sinergia entre las acciones espinales y supraespinales (Kolesnikov et al., 1996). Por otra parte, la administración local de agonistas μ o δ por vía periférica, intratecal, o intracerebroventricular también induce antinocicepción, con características bien definidas tanto en modelos animales como en el hombre.

Como ya se ha descrito anteriormente, durante la inflamación periférica, ya sea aguda o crónica, los opioides, además de esta acción antinociceptiva, presentan un efecto antiinflamatorio. En modelos de inflamación articular inducida por estímulos eléctricos (estimulación del nervio safeno), por mediadores proinflamatorios (bradicinina, PG, 5-HT, etc) o bien por sustancias químicas (formol, carragenina) se ha demostrado que la administración sistémica de opioides μ (morfina, remifentanilo), δ (análogos de las encefalinas) y κ (U-50,488H), disminuye el edema y la extravasación plasmática (Bartho y Szolcsanyi, 1981; Gyres et al., 1985; Green y Levine, 1992; Gavalas et al., 1994; Taylor et al., 2000), efectos revertidos tras la administración del antagonista opioide no selectivo naloxona. La administración de fármacos de acción exclusivamente periférica (Ferreira et al., 1984; Wilson et al., 1996), refuerza la idea de una modulación opioide periférica en la que participan no sólo estructuras neuronales sino también extraneuronales. En el modelo de inflamación aguda inducida por formol los opioides administrados directamente en la zona inflamada pueden tener efectos pro y antiinflamatorios, revertidos por antagonistas selectivos periféricos (Hong y Abbott, 1995). Así pues, los agonistas μ , DAMGO y δ , DPDPE, atenúan la extravasación, tanto en las fases iniciales como en

las tardías del proceso inflamatorio, mientras que el agonista κ , U-50,488H la incrementa aunque sólo en la fase inicial.

En el modelo de artritis crónica inducida por el adyuvante de Freund el agonista κ , U-50,488H, resultó ser el mejor antiinflamatorio administrado localmente (Wilson *et al.* 1996; Binder y Walker, 1998). La administración de otro agonista κ específico de acción periférica, denominado asimadolina, corroboró estos resultados (Bush *et al.*, 2001), reduciendo la artritis inducida por adyuvante en rata en más de un 80%.

De todo lo anterior deducimos que sea cual sea la causa de la inflamación la respuesta final es la misma: hiperemia, edema, extravasación de plasma, dolor. Tanto los mediadores como los tejidos neuronales y no neuronales que participan en esta respuesta inflamatoria son los mismos en todos los casos. Sin embargo, la importancia o el peso de cada uno de ellos en este proceso resulta distinto en función del estímulo flogógeno que inicie esta respuesta fisiopatológica. Según los modelos experimentales empleados en estos estudios los resultados que se obtienen tras la administración de agonistas opioides de diferentes selectividades pueden ser distintos. Parecería que en modelos de inflamación crónica hay una mayor participación de los RO κ en la atenuación de la extravasación de plasma mientras que en modelos de inflamación aguda inducida por formol o por CA son los RO μ y δ los más implicados.

La liberación de neurotransmisores proinflamatorios como la SP desde las **terminaciones aferentes primarias** (Baluk, 1997), está inhibida por opioides (Yaksh, 1988; Walker *et al.*, 2000). La administración de los agonistas morfina y U-50,488H regulan la liberación de SP de manera bifásica. A dosis nM morfina ejerce un efecto inhibitorio de la liberación de SP, mientras que el agonista κ facilita su liberación. Contrariamente, a dosis μ M morfina potencia su liberación, mientras que U-50,488H la inhibe (Suarez-Roca y Maixner, 1993). No obstante, las concentraciones necesarias de este neurotransmisor para inducir una respuesta vasodilatadora son menores que las requeridas para estimular los nociceptores (Weidner *et al.*, 2000). Ello indica que las dosis de agonistas con efectos antiinflamatorios no tienen porqué ser las mismas que las requeridas para conseguir una respuesta antinociceptiva. Los opioides también regulan la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina,

la NA y la dopamina (Devoto *et al.*, 2002), tanto en el SNC como en el SNP (Sarne *et al.*, 1996) así como de aminoácidos excitadores como el Glu y el Asp (Kangrga y Randic, 1991; Nicol, 2002).

Los estudios de tolerancia a la morfina demuestran que este opioide altera el **sistema inmunitario** (Liang-Suo *et al.*, 2002), causando inmunosupresión. Regula la proliferación de los linfocitos (Bayer *et al.*, 1990; 1992), la producción de anticuerpos, la actividad citotóxica de las células *natural killer*. También inhibe las funciones proinflamatorias de los neutrófilos, los monocitos y los macrófagos (Carr, 1991; Rojavin *et al.*, 1993). Los mecanismos a través de los cuales se inducen estos efectos implican los RO expresados tanto en la membrana plasmática de las células inmunes (Sibinga y Golstein, 1988; Hassan *et al.*, 1993; Lang *et al.*, 1995) como los localizados en el SNC (Fecho *et al.*, 1996; Sharp *et al.*, 1998).

La activación de los RO μ , δ y κ por sus ligandos endógenos, expresados en estructuras periféricas inhiben la transmisión nociceptiva y la respuesta inflamatoria, mientras que la activación del receptor ORL-1 induce los efectos contrarios (Inoue *et al.*, 1998). No obstante, hay estudios en los que se obtienen resultados contradictorios (Helyes, 1997). Los opioides endógenos, como la dinorfina A y la hemorfina-7 inducen cambios en las acciones inmunomoduladoras (Thomas *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1998; Sanderson *et al.*, 1998). Los estudios realizados por Planas *et al.* (1995) han corroborado la liberación de POE durante la inflamación periférica y el efecto inhibitor que tienen sobre ésta.

Las acciones fisiológicas de los POE están reguladas por diversos neuromoduladores. Entre ellos, el octapéptido colecistocinina (CCK) juega un papel muy importante (Wiesenfeld-Hallin *et al.*, 1999). Estudios anatómicos muestran que la distribución de POE y RO en diversas áreas del SNC es la misma que la de CCK y sus receptores específicos, CCK₁ y CCK₂ (Zhang *et al.*, 2000). Los receptores CCK modulan el SOE en procesos fisiológicos como el control del dolor o modulación de las respuestas emocionales (Pommier *et al.*, 2002). Además, la activación del receptor CCK₂ reduce el efecto analgésico de la morfina o de POE (Noble *et al.*, 1993).

Otros agonistas como los α 2-adrenérgicos (clonidina, dexmedetomidina, NA) potencian el efecto analgésico de los opioides μ (Ossipov *et al.*, 1990), pero no los agonistas δ (Sullivan *et al.*, 1992).

5. MODELOS EXPERIMENTALES DE ESTUDIO DE LA INFLAMACIÓN PERIFÉRICA.

Para valorar la actividad antiinflamatoria de los fármacos se dispone de modelos experimentales *in vivo*, que permiten evaluar los cambios más característicos que inducen los fármacos en estudio sobre las distintas etapas del proceso inflamatorio. Si recordamos, al inicio de la inflamación se producen cambios vasculares debidos a la vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular, seguidos de la infiltración leucocitaria hacia la zona lesionada y todo ello acompañado de respuestas nerviosas, tanto sensoriales como simpáticas. La valoración de cualquiera de estos elementos participantes en la respuesta inflamatoria nos permite conocer la posible capacidad del fármaco para reducir la inflamación.

Los principales modelos experimentales de que se dispone para estimar la inflamación sobre todo en las fases aguda y subaguda son :

- Eritema inducido por rayos ultravioleta en cobaya.
- Edema subplantar y cambios en la permeabilidad vascular inducidos por distintas sustancias irritantes en rata (Winter *et al.*, 1962; Vinegar *et al.*, 1975).
- Edema y cambios en la permeabilidad intestinal inducidos por métodos químicos (etanol, ácido acético) o biológicos (administración local de parásitos tales como *Trichinella spiralis* o *Nippostrongylus brasiliensis*).

En cuanto al estudio de los procesos inflamatorios crónicos los modelos a seguir son los siguientes:

- Inflamación crónica articular por adyuvante de Freund en ratón y rata.
- Inflamación crónica intestinal inducida por agentes farmacológicos (aceite de croton, carragenina, ácido trinitrobenzenosulfónico, entre otros).

Además, se disponen de los métodos *in vitro* que permiten estudiar la acción antiinflamatoria de un fármaco valorando los cambios cuantitativos de los autacoides implicados en el proceso inflamatorio (histamina, serotonina, bradicinina, SP, PG, TX, LT, PAF, citocinas y linfocinas, quimiocinas).

Debe tenerse en cuenta que la respuesta del animal en cada uno de estos modelos es distinta, así como el efecto observado sobre el edema, la extravasación de plasma o la transmigración celular. Ello sugiere que, aunque los mediadores del proceso inflamatorio son los mismos, las interacciones que se establecen entre ellos y las diferentes estructuras neuronales o no neuronales que expresan receptores específicos para aquellos pueden ser diferentes en cada caso.

5.1. Modelo de inflamación aguda inducida por carragenina en rata.

Entre los modelos anteriormente citados, el descrito por Winter *et al.* (1962) permite de una manera fácil y reproducible cuantificar dos de los parámetros más característicos de la inflamación como son el edema y la extravasación de plasma. En este modelo se induce una inflamación aguda localizada en la pata del animal tras la administración de carragenina (CA), polisacárido sulfatado polianiónico, por vía subplantar.

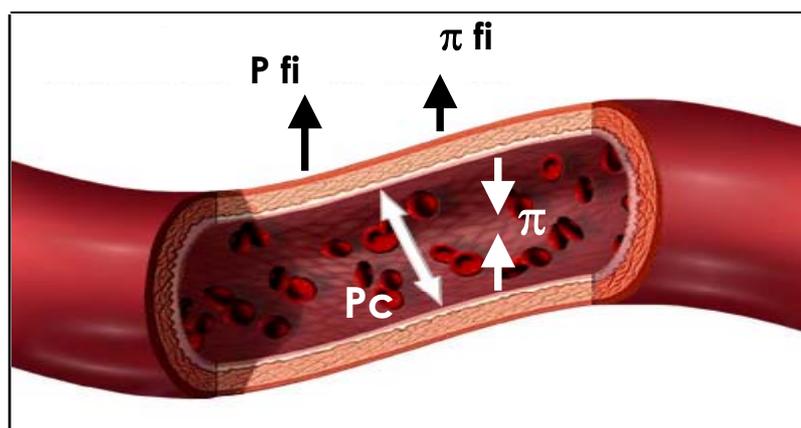
Consideramos oportuno profundizar en la diferencia entre edema y extravasación, por ser los dos parámetros inflamatorios que hemos utilizado en este estudio para valorar el efecto antiinflamatorio de los fármacos opioides. Inicialmente, podemos establecer que el edema se debe principalmente a cambios en el flujo sanguíneo, como la vasodilatación arteriolar y la modificación de la tensión vascular, mientras que para que tenga lugar la extravasación de plasma es necesario que la permeabilidad del endotelio vascular a las proteínas se vea modificada, y más concretamente que aumente el diámetro de los poros que se forman en los espacios intercelulares.

5.1.1. Edema.

Edema significa exceso de líquido en el espacio intersticial. Este espacio está estructurado en una matriz formada por colágeno y fibras de proteoglicano, así como pequeñas cantidades de agua. Las fibras le confieren al fluido intersticial la consistencia de gel, hecho que limita los efectos de la gravedad. La tensión ejercida por las fibras de colágeno comprime las células, manteniendo espacios intercapilares-intercelulares. Este empuje crea una presión negativa en el intersticio que contribuye al paso de agua desde los vasos sanguíneos hacia los espacios intersticiales pero no a su reabsorción. Durante el inicio de la respuesta inflamatoria la estructura de la matriz intersticial comienza a modificarse. Las proteínas de alto peso molecular se fragmentan incrementando la presión intersticial hasta alcanzar niveles supraatmosféricos lo que induce a una mayor difusión del fluido acuoso desde los vasos sanguíneos hacia el intersticio.

En esta situación, la presión de las vénulas postcapilares se incrementa, superándose la presión osmótica del torrente sanguíneo. El volumen de la zona lesionada va aumentando por la acumulación de fluido plasmático en el espacio intersticial debido no sólo al aumento de flujo por diferencia de presiones sino también a una insuficiente recuperación de éste hacia la sangre a través del sistema linfático. Cuatro factores, todos ellos importantes, son los que determinan el movimiento de líquido desde el tejido sanguíneo hasta los espacios intersticiales: 1) la presión capilar, P_c ; 2) la presión del fluido intersticial, P_{fi} ; 3) la presión coloidosmótica del plasma, π ; y 4) la presión coloidosmótica del fluido intersticial, π_{fi} .

Figura 5. Edema



Así pues, mientras que la presión capilar (P_c), la presión negativa del líquido intersticial (P_{fi}) y la π del líquido intersticial (π_{fi}) tienden a producir ósmosis de fluido acuoso hacia el exterior de la membrana capilar, la tendencia de la π del plasma es desplazar agua hacia el interior del vaso sanguíneo a través de la membrana capilar (figura 5). Cabe destacar que en el extremo capilar arterial la presión neta que se origina provoca la difusión del agua hacia afuera, mientras que la baja presión en el extremo capilar venoso modifica el balance de fuerzas en favor de la absorción. Así pues, en condiciones normales se establece un equilibrio a nivel de la membrana capilar de manera que el volumen de líquido que difunde hacia afuera de los capilares es el mismo que el que es devuelto a la circulación por resorción en los extremos venosos de los capilares.

Para cuantificar el edema se emplea la técnica descrita por Lence (1962) conocida como pletismografía, y modificada por Damas y Remacle-Volon (1992).

5.1.2. Extravasación plasmática.

Mientras que el edema se forma por la salida de líquido desde los extremos capilares arteriulares, el paso de proteína tiene lugar en mayor proporción desde las vénulas postcapilares, por ser histológicamente menos complejas. En los años 60, Majno y Palade propusieron que la salida de plasma desde la circulación hacia el intersticio durante la inflamación aguda estaba acentuada por mediadores como bradicinina o histamina, y que se debía al aumento de tamaño de los espacios interendoteliales. Los cambios morfológicos observados en las células endoteliales hizo pensar en la participación de mecanismos contráctiles a partir de elementos proteicos que modificarán las uniones entre células (Miller y Sims, 1986). Teniendo en cuenta que las propiedades tanto estructurales como funcionales del endotelio vascular varían según el lugar anatómico y su posición a lo largo del árbol vascular es importante la identificación del lugar exacto donde se produce el exudado plasmático.

Las uniones intercelulares son determinantes en la permeabilidad endotelial. Dichas uniones están formadas por complejos proteicos integrados en la misma célula y su adyacente. Una de las características de estas uniones interendoteliales es su organización dinámica, es decir, son capaces de cambiar rápidamente su estructura para permitir el paso de constituyentes plasmáticos y células circulantes,

efecto que, en muchos de los casos, es rápidamente reversible (cuestión de minutos). Durante situaciones de inflamación aguda o crónica los mediadores celulares expresados son capaces de incrementar la permeabilidad endotelial, por su unión a receptores específicos que una vez activados generan señales intracelulares que causan la reorganización del citoesqueleto con la apertura de las uniones interendoteliales, como por ejemplo, un aumento intracelular de Ca^{2+} , el cual moviliza las fibras de actina-miosina, reorganizando la estructura de los espacios interendoteliales e incrementando el diámetro de poro (Dejana y Del Maschio, 1995).

Estudios realizados en microvasos de tráquea indican que la formación de espacios entre las células endoteliales conocidos como *gaps* es infrecuente en condiciones normales, es decir, en ausencia de inflamación. Por el contrario, en una situación de inflamación aguda la aparición de estos *gaps* coincide con la salida de fluido plasmático, siendo más abundantes en las vénulas postcapilares e infrecuentes o inexistentes en los capilares y arteriolas (McDonald, 1999).

El paso de albúmina y otras proteínas plasmáticas al tejido extravascular no sólo está determinado por el aumento de los espacios interendoteliales, sino que hay otros factores a tener en cuenta como son: la presión capilar, el tamaño y carga de la proteína, el tamaño y número de los poros, así como la carga de la membrana endotelial. El cambio en la carga puede modificar rápidamente la permeabilidad de la membrana y el coeficiente de filtración, especialmente para la albúmina. La carga electrostática de los grandes poros es debida a los polímeros de proteoglicanos. Sus cargas negativas atraen las moléculas de albúmina cargadas positivamente, reduciendo la permeabilidad de la membrana e impidiendo el paso de albúmina a su través. Bradicinina, histamina y trombina con cargas menores incrementan la permeabilidad vascular permitiendo el paso de la albúmina. Una vez las proteínas del plasma son filtradas a través del endotelio venoso hacia el fluido intersticial no pueden ser reabsorbidas. El sistema linfático es el responsable de su reincorporación a la circulación sanguínea (Holiday, 1999).

Como se ha descrito, durante el incremento de permeabilidad se incrementa la filtración de la albúmina sin que se vean afectadas otras proteínas. El salida de albúmina de los vasos sanguíneos hace que disminuya la π en sangre

mientras que en el espacio intersticial hay un aumento de dicha proteína aumentándose también la π fi. Cuando esto sucede el sistema linfático reabsorbe tanto el agua como las proteínas acumuladas en los espacios extravasculares por el cambio de permeabilidad, reincorporándolas nuevamente a la circulación sanguínea a través de los vasos linfáticos colectores. Sin embargo, en ocasiones la velocidad de reabsorción es menor que la de formación del exudado, acumulándose el edema.

Una de las técnicas utilizadas para poder cuantificar la albúmina que extravasa al tejido inflamado es la descrita por Udaka *et al.* (1970). Esta técnica consiste en inyectar el colorante azul de Evans al animal de experimentación. El colorante se fija a la albúmina, proteína mayoritaria del plasma, formándose el complejo estable proteína-colorante, valorable mediante espectrofotometría visible (620 nm).

El edema y la extravasación plasmática forman parte de la respuesta inflamatoria aguda que tiene lugar en numerosos órganos, incluyendo las articulaciones y la piel, cuando son sometidos a estímulos nocivos. Ambos parámetros inflamatorios están controlados por mecanismos humorales y neuronales. En la práctica clínica los opioides se utilizan principalmente como analgésicos. No obstante, en los últimos años el conocimiento de sus efectos antiedematoso y antiexudativo ha abierto una nueva posibilidad de tratamiento farmacológico de la inflamación. La expresión de los RO así como su caracterización y función antinociceptiva está bien documentada, no sólo a nivel de SNC sino también en tejidos nerviosos periféricos y células inmunes. Por el contrario, su posible función antiinflamatoria no es tan conocida.

Nuestra **hipótesis** plantea que la modulación opioide del edema y la extravasación plasmática durante la respuesta inflamatoria aguda, se debe a la activación de RO de localización periférica y a las posibles interrelaciones que se establecen con otros sistemas endógenos, distintos al opioide e implicados en la inflamación.

Para demostrar esta hipótesis se han planteado los siguientes **objetivos**:

1. Estudiar el efecto de opioides, agonistas y antagonistas (μ , δ y κ) sobre el edema y la extravasación plasmática durante la inflamación aguda periférica.
2. Conocer el tipo/s de RO implicado/s en la acción antiinflamatoria.
3. Valorar el papel de los RO periféricos en el proceso inflamatorio.
4. Precisar la o las estructuras anatómicas periféricas implicadas en el efecto modulador de los opioides sobre la inflamación.

Si se demuestra la hipótesis de la modulación del edema y la extravasación plasmática por la acción de fármacos opioides sobre RO de localización periférica se justificaría la administración terapéutica de fármacos opioides exclusivamente de acción periférica para tratar la inflamación. Con ello, se evitarían la mayor parte de los efectos indeseables que caracterizan a los opioides y que son debidos a la acción central de estas sustancias.

1. Animales.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 150 ± 10 g, en condiciones óptimas de estabulación, con una temperatura constante ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), una humedad ambiental del 40-60%, y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Los animales tuvieron libre acceso al agua y a la comida. La manipulación de éstos se realizó de acuerdo con la directiva de la Comunidad Europea sobre el uso y cuidado de los animales de experimentación (Directiva del Consejo Económico de la Comunidad Europea 86/609/ECC Noviembre 24, 1986). Los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona.

2. Reactivos y fármacos utilizados.

Se emplearon: azul de Evans (Sigma), capsaicina (Sigma), carragenina tipo IV lambda (Sigma), ciclosporina A (Sandimmun A[®], cedido por Laboratorios Novartis), cimetidina (Sigma), compuesto 48/80 (Sigma), CTOP (RBI), DPDPE (Sigma), DMSO (dimetilsulfóxido; Sigma), fentanilo (Fentanest[®], Roche), formamida (Merck), ketamina (Ketolar[®], Parke-Davis), mepiramina (Sigma), MR2266 (cedido por Dra. Pol; IMIM), clorhidrato de morfina (Alcaliber S.A.), clorhidrato de naloxona (Sigma), metilyoduro de naloxona (Sigma), clorhidrato de naltrindol (RBI), PL017 (Peninsula Laboratories INC), paraformaldehído (Merck), SNC 80 (Tocris), NaCl (Merck), tioperamida (Sigma), tween 80 (Sigma), U-50,488H (RBI), clorhidrato de xilacina (Rompún[®], Bayer).

2.1. Preparación de los reactivos y fármacos y vías de administración:

Se preparó una solución de carragenina (CA) al 1% y otra solución de azul de Evans al 9% en NaCl isotónico 0.9% (solución salina, SS). Ketamina y clorhidrato de xilacina se administraron a las dosis de 100 mg.kg^{-1} y 10 mg.kg^{-1} , respectivamente, diluídos ambos compuestos en SS.

Los agonistas opioides morfina (MS), fentanilo (FN) y U-50,488H (U50) se administraron diluídos en SS. Los agonistas opioides peptídicos DPDPE (DP) y PL017

(PL) se disolvieron en agua bidestilada, previamente desgasificada. SNC 80 (SN), agonista opioide sintético no péptido, se preparó en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) 10 mM. En todos los casos se preparó una solución *stock* a partir de la cual se prepararon las dosis correspondientes a cada fármaco (ver tabla 3). Los antagonistas clorhidrato de naloxona (Nx), metilyoduro de naloxona (NxMet), naltrindol (NTI) y MR2266 (Mr) se disolvieron en SS. La completa disolución del antagonista MR2266 se consiguió añadiendo unas gotas de ácido ascórbico a la solución en la que se había diluido. El antagonista peptídico CTOP se preparó en agua bidestilada, previamente desgasificada. De la misma manera que los agonistas, se preparó una solución *stock* a partir de la cual se obtuvieron las dosis empleadas de cada fármaco (ver tablas 9 y 10).

Para realizar los diferentes tratamientos preinflamatorios se preparó capsaicina (CAP), a la concentración final de 25 mg.ml⁻¹ disuelta en SS, tween 80 y etanol, en una proporción 8:1:1, respectivamente. La solución de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) se preparó a la concentración de 75 mg.ml⁻¹ en 1% de ácido ascórbico. La ciclosporina A (Cs A) se disolvió en una mezcla que contenía por ml de SS 15.8 mg de etanol (96°, absoluto) y 39 mg de tween 80. Se ajustó el valor del pH final de la solución a 7.7. Por último, el compuesto 48/80 se disolvió en SS a la concentración final de 0.1 %.

Se prepararon soluciones *stock* de los diferentes antihistamínicos H₁: mepiramina a 10 mg.ml⁻¹, H₂: cimetidina 111mg.ml⁻¹ (calentada a 37°C), y H₃: tioperamida 10 mg.ml⁻¹, todos ellos diluidos en agua bidestilada. A partir de cada una de las anteriores soluciones se realizaron las diluciones idóneas hasta conseguir las dosis de cada uno de los fármacos antihistamínicos empleados en este estudio: 2.5, 50 y 3 mg.Kg⁻¹, respectivamente.

La solución de paraformaldehído empleada en la perfusión de los animales se preparó tal como se describe a continuación: 13 ml de Na₂HPO₄ 0.5 M + 6.86 ml NaH₂PO₄ 0.5 M + 8.17 g NaCl + 40 g paraformaldehído enrasando hasta 800 ml con SS heparinizada (un ml heparina en 100 ml⁻¹ de SS). La mezcla se calentó a 60°C en una campana de gases y se dejó enfriar lentamente ajustándose el pH a 7.4 con

NaOH 1 N, enrasando con SS heparinizada hasta llegar al volumen final de un litro. La solución se guardó a 4°C.

Para la administración de cada uno de los reactivos y fármacos se emplearon jeringas estériles desechables de un ml. El agente flogógeno carragenina se administró por vía subplantar (s.p.) en la extremidad posterior izquierda del animal. El colorante azul de Evans se administró por vía intravenosa (i.v.), en las venas caudales.

Los fármacos agonistas opioides se administraron por vía subcutánea (s.c.) en la base del cuello del animal, mientras que los antagonistas opioides se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) en la parte inferior derecha de la cavidad abdominal. Los anestésicos se administraron por vía intramuscular (i.m.).

CAP y el compuesto 48/80 se administraron por vía s.c., mientras que Cs A y 6-OHDA por vía i.p. Los antagonistas histaminérgicos H₁ y H₂ se inyectaron por vía s.c., mientras que el antagonista H₃ fue administrado por vía i.p.

3. Modelo de inflamación aguda periférica. Corroboración del modelo descrito por Winter *et al.*, (1962).

3.1. Valoración del edema.

Para cuantificar variaciones en el volumen se utilizó la técnica volumétrica de desplazamiento de fluido conocida como pletismografía (Lence, 1962), modificada por Damas y Remacle-Volon (1992), que emplean el pletismómetro Ugo Basile 7150 (figura 6). Durante los experimentos se realizaron dos medidas de volumen de la extremidad inflamada. La primera a tiempo cero, (V₀), utilizándose como valor basal y la segunda tres horas después de haber administrado CA (V₃), es decir, una vez finalizados los experimentos y antes de sacrificar los animales. Para cada tiempo y animal se efectuaron dos medidas de las que se calculó la media.

El incremento de volumen se obtuvo restando el volumen medido a las tres horas (V₃) del volumen medido a tiempo cero (V₀) y el resultado final se expresó como el porcentaje del edema calculado a partir de la siguiente relación:

$$\% \text{ EDEMA} = \left[\frac{V_3 - V_0}{V_0} \right] \times 100$$

Figura 6. Pletismómetro.



3.2. Valoración de la extravasación de plasma.

En condiciones de inflamación aguda, el estudio del paso de fluidos desde la circulación sanguínea hacia los espacios extravasculares se llevó a cabo utilizando como marcador proteico el azul de Evans. La capacidad de éste para unirse de manera estable a la albúmina plasmática permite su empleo en estudios de permeabilidad vascular, cuantificándose por espectrofotometría visible a 620 nm (Udaka *et al.*, 1970).

En la valoración del edema se disponía como valor basal el volumen inicial (V_0) de la pata antes de administrar CA. Para calcular el porcentaje de colorante extravasado resultaba también necesario disponer de un valor basal inicial. Para ello, se utilizó la pata contralateral a la inflamada.

Se utilizaron 16 animales, distribuidos en dos grupos (ocho ratas/grupo): el grupo control (animales a los que se les inyectó 0.05 ml de SS, por vía s.p., en la pata posterior izquierda) y el grupo inflamado (animales a los que se les inyectó 0.05 ml de la solución de CA, por la misma vía, en la pata posterior izquierda).

La duración del experimento fue de tres horas desde la administración de SS o CA. Quince minutos antes de finalizar el experimento se administró azul de Evans (60 mg.kg⁻¹), por vía i.v., y 15 minutos después de inyectar el colorante se procedió al sacrificio de los animales por decapitación, previamente anestesiados con una mezcla de ketamina y xilacina (100 y 10 mg.kg⁻¹, respectivamente). Las dos extremidades posteriores, se seccionaron a nivel de la articulación tibiotarsal y cada una de ellas se dividió en cinco partes, que se incubaron en cuatro ml de formamida, a 65°C, durante tres horas, en un baño termostataado. Posteriormente, se recogió la fracción líquida de cada muestra, se filtró utilizando membranas de acetato de celulosa Corning, de 0.20 µm (Ø de poro), se centrifugó a 1000 r.p.m. durante dos minutos para eliminar los restos de piel, pelos etc., y, finalmente, se valoró por espectrofotometría visible a 620 nm.

Tabla 4. Protocolo experimental.

Tiempo	0h	2h 45 min	3h
T R A T A M I E N T O	CA 0.5 mg s.p. o SS s.p.	Azul de Evans i.v.	Cuantificación del edema Ketamina + xilacina 100 + 10 mg.kg ⁻¹ i.m. Sacrificio por decapitación Valoración de la extravasación plasmática

h: horas; min: minutos; CA: carragenina; SS: solución salina; s.p. : vía subplantar; i.v. : vía intravenosa; i.m.: vía intramuscular

A partir de una curva de calibración del colorante azul de Evans, en un rango de concentraciones entre 0.625 – 20 µg.ml⁻¹, se realizaron dos medidas de absorbancia para cada muestra, calculándose la media de éstas. Dichos valores se expresaron como µg del colorante azul de Evans/g de la extremidad. El porcentaje de extravasación de plasma (% EP) se calculó a partir de la siguiente expresión :

$$\frac{(\mu\text{g AdE pata inflamada/g pata}) - (\mu\text{g AdE pata contralateral/g pata})}{(\mu\text{g colorante pata contralateral/g pata})} \times 100$$

AdE= colorante azul de Evans
pata contralateral = pata no inflamada

A partir del %EP se calculó el porcentaje de inhibición de la extravasación plasmática (% IEP) de la siguiente manera:

$$\% \text{ IEP} = \frac{(\% \text{ EP grupo CONTROL}) - (\% \text{ EP grupo INFLAMADO})}{(\% \text{ EP grupo CONTROL})} \times 100$$

% IEP = porcentaje de inhibición de extravasación plasmática

% EP = porcentaje de extravasación plasmática

grupo CONTROL = animales a los que se les inyectó SS por vía s.p.

grupo INFLAMADO = animales a los que se les inyectó CA por vía s.p.

3.3. Evolución en el tiempo de la inflamación aguda periférica.

Con objeto de confirmar que la inflamación inducida por CA en las condiciones ambientales y técnicas de nuestro laboratorio seguía el modelo descrito por Winter *et al.* (1962) se realizó el seguimiento del incremento del volumen, así como de la extravasación plasmática, en la extremidad inflamada durante un periodo de siete horas. Para ello se utilizaron 144 ratas, distribuidas en dos grupos (72 animales/grupo): el grupo control (animales a los que se les administró 0.05 ml de SS, por vía s.p., en la extremidad posterior izquierda) y el grupo inflamado (animales a los se les indujo la inflamación aguda periférica con una inyección de 0.05 ml de la solución de CA al 1%, por vía s.p., en la extremidad posterior izquierda).

En diferentes intervalos de tiempo y tras la administración de CA a tiempo cero, se valoraron, en una muestra de seis animales, los incrementos de volumen y de la extravasación de plasma, tal y como se describe en los apartados anteriores

3.1 y 3.2. Los intervalos de tiempo fueron: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 y 150 minutos, tres, cuatro, cinco y siete horas, desde el inicio del experimento.

4. Validación de las técnicas analíticas cuantitativas del edema y de la extravasación de plasma.

Se consideró imprescindible validar las técnicas de pletismografía y espectrofotometría visible empleadas en la valoración del edema y de la extravasación de plasma, respectivamente, verificándose la fiabilidad de las mismas.

Para ello se emplearon dos parámetros: la **repetibilidad** y la **reproducibilidad**. El primero nos permitió conocer la precisión del método o del modelo analítico utilizado bajo las mismas condiciones (mismo experimentador, laboratorio, aparatos, etc.), conociéndose la variación *intradía*. El segundo parámetro evaluado nos indicó la precisión del método aplicado en condiciones diferentes (días distintos) conociéndose la variación *interdía*. Estos ensayos se realizaron en tres días, empleando un total de 30 animales, distribuidos en grupos de 10 animales por día. Así pues, el ensayo de repetibilidad se realizó el primer día, administrando CA a cada animal de los 10 que formaban el grupo, valorándose tanto el edema como la extravasación plasmática, al finalizar el experimento. El protocolo experimental se describe en la tabla 4. El ensayo de reproducibilidad se realizó del mismo modo que el de repetibilidad pero durante tres días. Los animales empleados el primer día para realizar el ensayo de repetibilidad fueron los mismos que los correspondientes al primer día en el ensayo de reproducibilidad. Tanto los animales como el experimentador fueron distintos en cada uno de los días. Los resultados de los estudios de precisión se expresaron como el porcentaje del coeficiente de variación (% CV) y se calcularon a partir de la siguiente expresión:

$$\% \text{ COEFICIENTE DE VARIACIÓN} = (\text{Desviación estándar} / \text{media}) \times 100$$

5. Experimentos realizados con agonistas y antagonistas opioides.

5.1. Efecto de los agonistas opioides (μ , δ y κ) sobre el edema y la extravasación de plasma en la inflamación aguda periférica.

Todos los agonistas utilizados en este estudio (morfina, fentanilo, PL017, DPDPE, SNC 80 y U-50,488H) se administraron por vía s.c., dos horas y 30 minutos después de inducir la inflamación con CA. De esta manera, y en base a la bibliografía, podríamos evaluar los efectos antiinflamatorios de dichos fármacos cuando sus concentraciones plasmáticas alcanzaran aproximadamente su valor máximo.

El número total de animales utilizados en estos experimentos fue de 424, distribuidos en grupos de 8 animales por dosis. El número de dosis fue distinto para cada fármaco empleado. En la tabla 5 se muestra el protocolo experimental seguido para el estudio del efecto antiinflamatorio opioide. Las dosis empleadas de cada fármaco se relacionan en la tabla 6.

Tabla 5. Protocolo experimental.

Tiempo	0h	2h 30min	2h 45min	3h
T R A T A M I E N T O	CA 0.5 mg s.p.	SS s.c. o Agonistas s.c.	Azul de Evans i.v.	Cuantificación del edema Ketamina + xilacina 100 + 10 mg.kg ⁻¹ i.m. Sacrificio por decapitación Valoración de la extravasación plasmática

h: horas; min: minutos; CA: carragenina; SS: solución salina; s.p. : vía subplantar ; s.c. : vía subcutánea ; i.v. : vía intravenosa; i.m.: vía intramuscular

Tabla 6. Dosis de los fármacos empleados.

Agonistas μ	Dosis (mg.kg⁻¹)
Morfina	0.15 – 0.3 – 0.5 – 0.7 – 1 – 3 – 10 – 15 – 20 – 30
Fentanilo	0.01 – 0.015 – 0.05 – 0.1 – 0.2- 0.5 – 0.7
PL017	0.05 – 0.1 – 0.5 – 1 – 1.5 – 3

Agonistas δ	Dosis (mg.kg⁻¹)
DPDPE	0.01 – 0.05 – 0.1 – 0.3 – 0.5 - 1 – 1.5 – 3
SNC 80	0.1 – 0.5 – 1 – 1.5 - 3 – 5 – 10 – 15 – 30

Agonista κ	Dosis (mg.kg⁻¹)
U-50,488H	0.1 – 0.3 – 0.5 – 1 – 5 – 10 – 30 – 50

5.2. Reversión de los efectos de los agonistas opioides durante la inflamación aguda periférica mediante antagonistas opioides.

Con el fin de establecer la naturaleza opioide de los efectos observados se realizaron una serie de experimentos con antagonistas opioides, tanto específicos como no específicos. Para conocer el comportamiento de los antagonistas durante el proceso inflamatorio en ausencia de agonistas se realizó un primer experimento, en el que se empleó un total de 60 animales, distribuidos en seis grupos: tres grupos control (animales a los que se les administró SS en un volumen de 0.5 ml, por vía i.p., 10 animales/grupo) y tres grupos tratados (animales a los que se les administraron los antagonistas naloxona, 1 mg.kg⁻¹ (Nx); naltrindol, 3 mg.kg⁻¹ (NTI) y MR2266, 3 mg.kg⁻¹ (Mr), en un volumen de 0.5 ml, por vía i.p., 10 animales /grupo).

Tabla 7. Protocolo experimental.

Tiempo	0 h	2h 15min	2h 45min	3h
T R A T A M I E N T O	CA 0.5 mg s.p.	SS i.p. o Antagonistas i.p.	Azul de Evans i.v.	Cuantificación del edema Ketamina + xilacina 100 + 10 mg.kg ⁻¹ i.m. Sacrificio por decapitación Valoración de la extravasación plasmática

h: horas; min: minutos; CA: carragenina; s.p. : vía subplantar ; i.p. : vía intraperitoneal; i.v. : vía intravenosa

Para corroborar la naturaleza opioide del efecto inhibitor sobre la extravasación de plasma inducido por los agonistas empleados en este estudio se realizó el siguiente experimento: con un total de 128 animales se estudió la reversión por antagonistas opioides del efecto antiexudativo que mostraban los agonistas opioides sobre la inflamación.

Se empleó clorhidrato de naloxona (Nx) para revertir los efectos inducidos por los agonistas μ morfina (MS) y fentanilo (FN). Como antagonista δ se utilizó naltrindol (NTI) para revertir los efectos de DPDPE (DP) y SNC 80 (SN) y MR2266 (Mr) como antagonista κ para la reversión del agonista U-50,488H (U50). Se emplearon 10 animales para cada uno de los grupos: antagonista y antagonista/agonista, y seis animales para cada uno de los grupos SS, SS /agonista.

Las dosis de antagonistas utilizadas fueron de 1 mg.kg⁻¹ para Nx y 3 mg.kg⁻¹ para cada uno de los antagonistas δ (NTI) y κ (MR2266), dosis empleadas en base a estudios previos. Las dosis de los agonista μ y δ empleadas fueron sus respectivas DE₈₀, mientras que para U-50,488H (U50), agonista κ que no mantuvo una relación dosis-dependiente para la extravasación plasmática, se consideró oportuno administrar la dosis de 5 mg.kg⁻¹ que quedaba entre 0.5 y 10 mg.kg⁻¹, con las que se conseguían los mismos porcentajes de inhibición de la extravasación plasmática.

Los antagonistas se administraron por vía i.p., 15 minutos antes de la inyección del correspondiente agonista. El grupo control recibió el mismo volumen de SS y por la misma vía de administración que los agonistas. En las tablas 8 y 9 se resume el protocolo experimental que se siguió y las dosis empleadas.

Tabla 8. Protocolo experimental.

Tiempo	0h	2h 15min	2h 30min	2h 45 min	3h
T R A T A M I E N T O	CA 0.5 mg s.p.	SS i.p. o Antagonistas i.p.	Agonistas s.c.	Azul de Evans i.v.	Cuantificación del edema Ketamina + xilacina 100 + 10 mg.kg ⁻¹ i.m. Sacrificio por decapitación Valoración de la extravasación plasmática

h: horas; min: minutos; CA: carragenina; SS: solución salina; s.p. : vía subplantar ; i.p. : vía intraperitoneal; s.c. : vía subcutánea; i.v. : vía intravenosa; i.m.: vía intramuscular

Tabla 9. Dosis empleadas tanto de antagonistas como de agonistas.

Antagonista + agonista μ	Dosis (mg.kg⁻¹)
Nx + MS Nx + FN	1 + 1.924 1 + 0.180
Antagonista + agonista δ	Dosis (mg.kg⁻¹)
NTI + DP NTI + SN	3 + 0.364 3 + 5.032
Antagonista + agonista κ	Dosis (mg.kg⁻¹)
Mr + U50	3 + 5

Nx (Clorhidrato de naloxona); MS (morfina); FN (fentanilo); NTI (naltrindol); DP (DPDPE); SN (SNC 80); Mr (MR2266); U50 (U-50488H)

5.3. Determinación del componente periférico implicado en el efecto de los opioides sobre el edema y la extravasación plasmática.

El efecto periférico de los opioides sobre el edema y la extravasación de plasma se evaluó realizando tres tipos de experimentos: el primero consistió en emplear un agonista opioide de acción exclusivamente periférica como es el péptido PL017, del que se calcularon los porcentajes de edema, extravasación plasmática y los porcentajes de inhibición de esta última. Para ello se utilizaron 56 animales. El protocolo experimental fue el mismo que el descrito en la tabla 5.

La segunda serie de experimentos consistió en administrar diferentes antagonistas opioides de acción periférica como el metiloduro de naloxona (NxMet), antagonista opioide no selectivo, a la dosis de 1 mg.kg⁻¹ y el CTOP, antagonista μ selectivo, a la dosis de 1 mg.kg⁻¹. En cada uno de los experimentos se emplearon un total de 112 y 48 animales, respectivamente. El protocolo experimental que se siguió fue el mismo que el descrito en la tabla 8. Los antagonistas se administraron, por vía i.p., 15 minutos antes de inyectar los agonistas μ (morfina, fentanilo y PL017) y los agonistas δ (DPDPE y SNC 80). Las dosis de agonistas administradas fueron sus correspondientes DE₈₀ (ver tabla 10) . En las tres series de experimentos se empleó un grupo control (n= 6), cuyos animales recibieron el mismo volumen de SS, por la misma vía de administración que los agonistas. El número de animales utilizados en cada grupo de tratamiento fue de 10.

Tabla 10. Dosis de antagonistas y agonistas opioides empleadas en el estudio de la reversión periférica de los efectos inhibidores de los fármacos opioides sobre la extravasación de plasma durante la inflamación aguda.

Antagonista + agonista μ	Dosis (mg.kg⁻¹)
Nx Met + MS	1 + 1.92
Nx Met + FN	1 + 0.18
Nx Met + PL	1 + 0.36
NxMet + DP	1 + 0.36
NxMet + SN	1 + 5.03
Antagonista + agonista μ	Dosis (mg.kg⁻¹)
CTOP + MS	1 + 1.92
CTOP + PL	1 + 0.36

NxM (Metiloduro de naloxona); MS (morfina); FN (fentanilo); PL (PL017); DP (DPDPE); SN (SNC 80); CTOP (CTOP)

5.4. Evaluación del lugar de acción de los opioides durante la inflamación aguda periférica.

Se realizaron diversos experimentos con el objetivo de eliminar cada uno de los distintos componentes anatómicos que juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria. Para ello se llevaron a cabo tratamientos específicos, previos a la inflamación, que indujeron de manera selectiva: a) degeneración de las terminaciones aferentes sensoriales periféricas, b) degeneración de las terminaciones postganglionares simpáticas, c) disminución del componente celular inmunitario, y d) depleción de histamina.

A) Tratamiento con capsaicina (Lynn, 1990).

La capsaicina (CAP), sustancia contenida en el grano de la pimienta "chile", produce picor y quemazón intensos por su acción sobre receptores específicos situados en las membranas de las neuronas sensoriales periféricas. Al activar dichos receptores se provoca la apertura de un canal iónico no selectivo que permite la entrada de Ca^{2+} y Na^+ , y la salida de K^+ , con la consiguiente despolarización de la neurona. La acción mantenida de la CAP termina por desensibilizar la fibra aferente y la administración crónica de dosis altas de esta sustancia lleva a lesionar y degenerar las neuronas sensibles a la neurotoxina, disminuyendo el porcentaje de unidades nociceptivas periféricas polimodales C. Teniendo en cuenta que dichas terminaciones nerviosas también participan en el control de la vasodilatación y la extravasación de plasma podemos pensar que este tratamiento modificará los mecanismos fisiológicos que controlan dichos parámetros durante inflamación.

Primero se estudió, el efecto del tratamiento con CAP sobre el edema y la extravasación en condiciones de inflamación aguda inducida por CA. Para ello se emplearon 20 animales, distribuidos en dos grupos: el grupo SS (animales control, tratados con solución salina) y el grupo CAP (animales tratados con capsaicina). La inyección de ambas soluciones se realizó por vía s.c., en la zona costal. Los animales estaban bajo anestesia general por acción de una mezcla administrada por vía intramuscular (i.m.) de ketamina y xilacina a las dosis de 100 mg.kg^{-1} y 10 mg.kg^{-1} respectivamente. Se administraron tres dosis de CAP: 30, 50 y 70 mg.kg^{-1} separadas cada una de ellas por un período de 24 horas. Finalizado el tratamiento

con CAP se procedió a inducir la inflamación aguda, administrando CA, por vía s.p., y a valorar tanto el edema como la extravasación plasmática, una vez finalizado el experimento.

Se consideró oportuno comprobar la eficacia del tratamiento con CAP al que se sometieron los animales. Para ello se utilizó el test de hiperalgesia mecánica de Randall-Selitto y la técnica de fluorescencia por inmunohistoquímica. Se emplearon 12 animales, distribuidos en dos grupos de seis animales cada uno de ellos: grupo control (animales a los que se les administró solución salina) y grupo CAP (animales tratados con capsaicina).

Valoración de la eficacia del tratamiento con CAP:

- **Test de Randall-Selitto:** Se engloba dentro de los tests de nocicepción por estímulo mecánico, siendo muy útil para evaluar la hiperalgesia mecánica estando el animal despierto. El test cuantifica la sensibilidad nociceptiva de la pata después de la administración local de un agente inflamatorio. El equipo utilizado fue el analgesímetro UGO BASILE.

En nuestro experimento se valoró la presión necesaria para que el animal retirara la pata, PPT (paw pressure threshold), evitando de esta manera el estímulo nocivo. Se realizaron dos medidas: una en condiciones basales a tiempo cero (P_0), y otra a las tres horas después de administrar CA por vía s.p., (P_3). Para ello, se sujetó el animal por la piel del cuello con una mano de manera suave y con la otra, se situó la pata posterior izquierda (control o inflamada) sobre una pequeña plataforma sobre la cual incide una estructura cónica roma. La activación del aparato con un pedal conduce a la aplicación de una presión uniformemente creciente sobre la pata del animal. Como respuesta que refleja el umbral nociceptivo se aceptó el intento de retirada de la pata, en cuyo momento se detuvo la prueba y se anotó la presión tolerada por el animal expresada en gramos (g). Se realizaron dos ensayos por animal calculándose la media de la presión tolerada. Para evitar lesiones tisulares la presión máxima (presión límite de corte) debe limitarse al doble del valor umbral en condiciones basales. El valor de PPT se

expresó como la diferencia entre los valores obtenidos a las tres horas y a tiempo cero ($P_3 - P_0$).

- **Inmunohistoquímica:** Se emplearon cinco animales tratados con solución salina (SS) y cinco tratados con capsaicina (CAP). Todos ellos, previa anestesia general se perfundieron por vía intracardíaca, a nivel intraventricular, con una solución de paraformaldehído. Se extrajeron muestras histológicas de las almohadillas plantares que se sumergieron en medio de Zamboni. Posteriormente, se criopreservaron en una solución de tampón fosfato 0.1 M (PBS, pH=7.4) con 20% de sacarosa. Las muestras se conservaron en esta solución a 4°C hasta su utilización. Mediante un criotomo de congelación, se realizaron secciones transversales de 60 μm de grosor que se recogieron en placas excavadas y se bañaron en una solución de PBS que contenía 0.3% Triton-X-100 (Fluka) y 1% de suero fetal bovino (ICN), durante una hora a 4°C en agitación constante. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios, diluïdos en la misma solución anterior durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Los anticuerpos policlonales primarios utilizados fueron: conejo anti- PGP 9.5 (Protein Gene Peptide 9.5) a la dilución 1:1000 (Ultraclone) y conejo anti-CGRP (Calcitonin gene-Related Peptide) (Amersham) diluïdo 1:1000. Ambos anticuerpos fueron diluïdos en tampón fosfato (pH= 7.4). Después de realizar tres lavados con PBS-Triton, las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C, en agitación constante, con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con cianina 3.18 a la dilución de 1:200 (Jackson Immunoresearch). Tras tres lavados con PBS-Triton-FCS, las secciones se montaron en portaobjetos pre-gelatinizados, se deshidrataron en baños de etanol (96°, absoluto), se aclararon con metilsalicilato y el cubreobjetos se montó con DPX (Fluka). La inmunoreactividad a PGP 9.5 y a CGRP se visualizó mediante un microscopio Olympus BX-40 equipado con epifluorescencia.

Para la valoración de los efectos de los agonistas opioides sobre la extravasación y el edema en animales tratados con CAP se realizaron los siguientes experimentos con un total de 64 animales distribuïdos en tres grupos: grupo control, grupo morfina (MS), grupo fentanilo y grupo DPDPE. En la tabla 11 se resume el protocolo experimental. Cada uno de ellos se dividió en dos subgrupos: grupo SS (animales a los que se les administró solución salina, n=seis) y grupo CAP (animales a

Material y Métodos

los que se les administró capsaicina, n=10). Con los animales anestesiados, por vía i.m., con la mezcla de ketamina y xilacina a las dosis de 100 y 10 mg.kg⁻¹, respectivamente, se administraron dosis crecientes de CAP, 30, 50 y 70 mg.kg⁻¹, por vía s.c., en el tronco del animal, separadas cada una de ellas por un periodo de 24 horas.

Pasadas 24 horas desde la última dosis de CAP se provocó la inflamación aguda con 0.5 mg de CA por vía s.p. Se administraron los agonistas opioides morfina, fentanilo y DPDPE, por vía s.c., a las dos horas y 30 minutos después de CA. Las dosis empleadas de agonistas fueron sus respectivas DE₈₀, en un volumen de 0.5 ml de solución. Pasados 15 minutos, se inyectó azul de Evans, por vía i.v., y 15 minutos más tarde se procedió a valorar el edema y a sacrificar los animales, previamente anestesiados, para cuantificar finalmente la extravasación de plasma.

Tabla 11. Protocolo experimental.

-96h (4 días)	0h	2h 30 min	2h 45 min	3h
Control (SS) i.p. o CAP 30, 50, 70 mg.kg ⁻¹ / animal / día i.p	CA 0.5 mg s.p.	Morfina (MS) DE ₈₀ s.c. o Fentanilo (FN) DE ₈₀ s.c. o DPDPE (DP) DE ₈₀ s.c.	Azul de Evans i.v.	Cuantificación del edema Ketamina + xilacina 100+10 mg.kg ⁻¹ i.m. Sacrificio por decapitación Valoración de la extravasación plasmática

h: horas; min: minutos; SS: solución salina; CA: carragenina; DE₈₀: dosis con la que se consigue el 80% de efecto antiexudativo; i.p.: vía intraperitoneal; s.p.: vía subplantar; s.c.: vía subcutánea; i.v.: vía intravenosa; i.m.: vía intramuscular

B) Tratamiento con 6-hidroxidopamina (Levine *et al.*, 1986).

El compuesto 6-hidroxidopamina (6-OHDA) actúa sobre las terminaciones postganglionares simpáticas induciendo en primer lugar una depleción de los neurotransmisores que en ellas se almacenan y posteriormente una lesión que destruye la terminación distal. No pasa la BHE por lo que su administración parenteral sólo lesiona las terminaciones noradrenérgicas periféricas. La regeneración de las fibras puede tardar semanas una vez se ha suprimido el tratamiento.

Inicialmente, se valoró el efecto del tratamiento con 6-OHDA sobre la extravasación y el edema en animales inflamados. Para ello se emplearon 20 animales, distribuidos en dos grupos de 10 animales cada uno de ellos: el grupo SS (grupo control, animales tratados con solución salina) y el grupo 6-OHDA (animales tratados con 6-hidroxidopamina). El tratamiento duró tres días y consistió en administrar a los animales, por vía i.p., una solución 6-OHDA de 75 mg.kg⁻¹ por día.

En los siguientes experimentos se emplearon 64 animales, distribuidos en cuatro grupos: grupo control, grupo morfina (MS), grupo fentanilo (FN) y grupo DPDPE (DP). Cada uno de ellos se dividió en dos subgrupos: grupo SS (animales a los que se les administró solución salina, n=seis) y grupo 6-OHDA (animales a los que se les administró 6-OHDA, n=10). Pasadas 24 horas desde la última dosis de 6-OHDA se indujo la inflamación aguda con 0.5 mg de CA por vía s.p. Se administraron los agonistas opioides morfina, fentanilo y DPDPE, por vía s.c., a las dos horas y 30 minutos después de CA. Las dosis empleadas de agonistas fueron sus correspondientes DE₈₀, en un volumen de 0.5 ml de solución. Pasados 15 minutos, se inyectó azul de Evans, por vía i.v., y 15 minutos más tarde se procedió a valorar el edema y al sacrificio de los animales, previamente anestesiados, para cuantificar la extravasación de plasma (ver tabla 12).

Tabla 12. Protocolo experimental.

-96h (4 días)	0h	2h 30 min	2h 45 min	3h
Control (SS) i.p. o 6-OHDA 75 mg.kg ⁻¹ animal /día i.p	CA 0.5 mg s.p.	Morfina (MS) DE ₈₀ s.c. o Fentanilo (FN) DE ₈₀ s.c. o DPDPE (DP) DE ₈₀ s.c.	Azul de Evans i.v.	Cuantificación del edema Ketamina + xilacina 100+10 mg.kg ⁻¹ i.m. Sacrificio por decapitación Valoración de la extravasación plasmática

h: horas; min: minutos; SS: solución salina; CA: carragenina; DE₈₀: dosis con la que se consigue el 80% de efecto antiexudativo; i.p.: vía intraperitoneal; s.p.: vía subplantar; s.c.: vía subcutánea; i.v.: vía intravenosa; i.m.: vía intramuscular

C) Tratamiento con ciclosporina A (Stein *et al.*, 1990).

Para el estudio de inmunosupresión con ciclosporina A (Cs A) se utilizó un total de 64 animales divididos en cuatro grupos: grupo control, grupo morfina (MS), grupo DPDPE (DP), grupo U-50,488H (U50). Cada uno de éstos se dividió en dos subgrupos: grupo SS (animales tratados con solución salina, n=seis) y grupo CsA (animales tratados con ciclosporina A, n=10). El tratamiento con Cs A consistió en administrar, durante cinco días, por vía i.p., 3 mg de CsA en un volumen de 0.5 ml por día. Pasadas 24 horas desde la última dosis de CsA se procedió a inducir la inflamación aguda con 0.5 mg de CA por vía s.p. En este experimento se administraron los agonistas opioides morfina, DPDPE, o U-50,488, por vía s.c., a las dos horas y 30 minutos después de CA. Las dosis empleadas fueron sus respectivas DE₈₀, en un volumen de 0.5 ml de solución. Pasados 15 minutos, se inyectó el colorante, por vía i.v., y 15 minutos más tarde se procedió a valorar el edema. A continuación se sacrificaron los animales, previamente anestesiados, para cuantificar la extravasación de plasma (ver tabla 13).

Tabla 13. Protocolo experimental.

- 144h (6 días)	0h	2h 30 min	2h 45 min	3h
Control (SS) i.p ○ Cs A 3mg/animal /día i.p	CA 0.5mg s.p.	Morfina (MS) DE ₈₀ , s.c. ○ DPDPE (DP) DE ₈₀ , s.c. ○ U-50,488H (U50) DE ₈₀ , s.c.	Azul de Evans i.v.	Cuantificación del edema Ketamina + xilacina 100+10 mg.kg ⁻¹ i.m. Sacrificio por decapitación Valoración de la extravasación plasmática

h: horas; min: minutos; CsA: ciclosporina A; CA: carragenina; DE₈₀: dosis con la que se consigue el 80% de efecto antiexudativo; i.p.: vía intraperitoneal; s.p.: vía subplantar; s.c.: vía subcutánea; i.v.: vía intravenosa

D) Tratamiento con 48/80 (Banks *et al.*, 1990).

La administración sistémica del compuesto sintético 48/80 induce la depleción de histamina desde los mastocitos tisulares y, probablemente también desde los basófilos, por un rápido incremento bifásico del Ca²⁺ intracelular en presencia de Ca²⁺ y K⁺ (Takei *et al.*, 1989).

Inicialmente se estudió el efecto del tratamiento con el compuesto 48/80 en condiciones de inflamación. Para ello, se emplearon 20 animales, distribuidos en dos grupos (10 animales/grupo): grupo SS (grupo control, animales a los que se les administró solución salina) y grupo 48/80 (animales tratados con el compuesto depletor 48/80).

Seguidamente, se realizó la evaluación de los efectos de los distintos agonistas opioides en animales tratados con el compuesto 48/80, previamente a la inflamación. Se empleó un total de 64 animales, distribuidos en diferentes grupos de tratamiento: grupo control, grupo morfina (MS), grupo fentanilo (FN) y grupo DPDPE

Material y Métodos

(DP). Cada uno de ellos se dividió en dos subgrupos: grupo SS (animales a los que se les administró solución salina, n=seis) y grupo 48/80 (animales tratados con el compuesto depletor 48/80, n=10).

El tratamiento consistió en administrar a los animales una dosis de 0.6 mg.kg⁻¹ del compuesto 48/80, por vía i.p., dos veces al día, durante tres días y 1.2 mg.kg⁻¹ el cuarto día, también dos veces. El intervalo de tiempo entre dosis fue de 12 horas. 24 horas después de la última administración del compuesto 48/80 se indujo la inflamación aguda con CA y pasadas dos horas y 30 minutos se administraron los agonistas opioides morfina, fentanilo o DPDPE a sus correspondientes DE₈₀, en un volumen de 0.5 ml, por vía s.c., (ver tabla 14).

Tabla 14. Protocolo experimental.

-120h (5 días)	0h	2h 30 min	2h 45min	3h
Control (SS) i.p. o 48/80 0.6 mg.kg ⁻¹ / animal/día cada 12 horas tres primeros días 1.2 mg.kg ⁻¹ /animal/día cada 12 horas cuarto día i.p	CA 0.5 mg s.p.	Morfina (MS) DE ₈₀ s.c. o Fentanilo (FN) DE ₈₀ s.c. o DPDPE (DP) DE ₈₀ s.c.	Azul de Evans i.v.	Cuantificación del edema Ketamina+xilacina 100+10 mg.kg ⁻¹ i.m. Sacrificio por decapitación Valoración de la extravasación plasmática

h: horas; min: minutos; SS: solución salina; CA: carragenina; DE₈₀: dosis con la que se consigue el 80% de efecto antiexudativo; i.p.: vía intraperitoneal; s.p.: vía subplantar; s.c.: vía subcutánea; i.v.: vía intravenosa; i.m.: vía intramuscular

D.1. Tratamiento con los antihistamínicos mepiramina y cimetidina (Banks *et al.*, 1990).

Para bloquear los receptores histaminérgicos y comprobar el papel que éstos desempeñan durante la respuesta inflamatoria aguda se realizaron dos experimentos con un total de 64 animales, que se distribuyeron en varios grupos de

tratamiento: grupo control, grupo morfina (MS), grupo fentanilo (FN) y grupo DPDPE (DP). Cada uno de ellos se dividió en dos subgrupos: grupo SS (animales a los que se les administró solución salina, n=seis) y grupo M+C (animales a los que se les administró la mezcla de antagonistas histaminérgicos mepiramina, M, y cimetidina, C, sin previo vaciado de los mastocitos, n=10).

Cuarenta y cinco minutos antes de inducir la inflamación con CA se administró la mezcla de antagonistas histaminérgicos, mepiramina y cimetidina, a las dosis de 2.5 y 50 mg.kg⁻¹, respectivamente. A las dos horas y 30 minutos de inyectar los 0.5 mg de CA, por vía s.p., se administraron los agonistas anteriormente nombrados, por vía s.c., a sus correspondientes DE₈₀ (ver tabla 15).

Tabla 15. Protocolo experimental.

-45 min	0 min	2h 30min	2h 45min	3h
control (SS) s.c. o Mepiramina (M) 2.5 mg.Kg ⁻¹ + cimetidina (C) 50 mg.Kg ⁻¹ s.c	CA 0.5mg s.p.	Morfina (MS) DE ₈₀ s.c. o Fentanilo (FN) DE ₈₀ s.c. o DPDPE (DP) DE ₈₀ s.c.	Azul de Evans i.v.	Cuantificación del edema Ketamina+xilacina 100+10 mg.kg ⁻¹ i.m. Sacrificio por decapitación Valoración de la extravasación plasmática

h: horas; min: minutos; SS: solución salina; CA: carragenina; DE₈₀: dosis con la que se consigue el 80% de efecto antiexudativo; s.c.: vía subcutánea; s.p. : vía subplantar; i.v.: vía intravenosa; i.m.: vía intramuscular

D.2. Tratamiento con los antagonistas histaminérgicos específicos para los subtipos H₁, H₂ y H₃: mepiramina, cimetidina y tioperamida, respectivamente.

En vista de los resultados anteriores se realizó otro experimento con la finalidad de llegar a conocer cuál de los dos subtipos de receptores

Material y Métodos

histaminérgicos, H₁ y H₂, tenía más importancia en la modulación del efecto inhibidor de los agonistas μ . Se consideró oportuno incluir el antagonista H₃, tioperamida, por su interesante función fisiológica antiexudativa descrita en bibliografía muy reciente.

Para ello, se empleó un total de 72 animales, distribuidos en tres grupos de 24 animales cada uno de ellos: grupo M (mepiramina), grupo C (cimetidina), grupo T (tioperamida). Cada grupo de antagonistas se dividió en tres subgrupos: un grupo control (animales a los que se les administró el antagonista sólo), y dos grupos de tratamiento (a los que se les administró cada uno de los antagonistas seguido de uno de los dos agonistas, morfina o fentanilo). Las dosis administradas de mepiramina, cimetidina y tioperamida fueron de 2.5, 50 y 3 mg.kg⁻¹, respectivamente. Mepiramina y cimetidina se inyectaron por vía s.c., mientras que tioperamida por vía i.p. En cuanto a los agonistas, se administraron sus correspondientes DE₈₀ (ver tabla 16).

Tabla 16. Protocolo experimental.

-45 min	0 min	2h 30 min	2h 45min	3h
Control (SS) s.c. ○	CA (0.5 mg) s.p.	Morfina (MS) DE ₈₀ s.c.	Azul de Evans i.v.	Cuantificación del edema
Mepiramina (M) 2.5 mg.Kg ⁻¹ s.c. ○		○		Ketamina + xilacina 100+10 mg.kg ⁻¹ i.m.
cimetidina (C) 50 mg.Kg ⁻¹ s.c. ○		Fentanilo (FN) DE ₈₀ s.c.		Sacrificio por decapitación
tioperamida (T) 3 mg.kg ⁻¹ i.p.				Valoración de la extravasación plasmática

h: horas; min: minutos; SS: solución salina; CA: carragenina; DE₈₀: dosis con la que se consigue el 80% de efecto antiexudativo; s.c.: vía subcutánea; i.p.: vía intraperitoneal; s.p.: vía subplantar; i.v.: vía intravenosa; i.m.: vía intramuscular.

D.3. Administración de naltrindol (antagonista opioide δ_2 -selectivo) con morfina o fentanilo en animales no tratados con el compuesto 48/80.

Para realizar este experimento se siguió el protocolo experimental descrito en la tabla 7. Se utilizaron 42 animales distribuidos en seis grupos: grupo control (animales a los que se les administró solución salina, SS, n=4), grupo naltrindol (animales tratados con el antagonista δ_2 -selectivo, NTI, n=10), grupos morfina (MS) y fentanilo (FN) (animales tratados sólo con morfina o fentanilo, n=4/grupo), grupo naltrindol + morfina (NTI/MS, n=10) y grupo naltrindol + fentanilo (NTI/FN, n=10). Los agonistas se administraron a sus correspondientes DE_{80} .

6. Estadística.

Primero se estudió la normalidad de los resultados numéricos experimentales, obtenidos en cada uno de los experimentos, mediante los tests de Kolmogorov-Smirnov (contraste con la distribución normal) y de Levene (homogeneidad de varianzas).

Los diferentes grupos de animales tratados con cada uno de los fármacos opioides y a distintas dosis se compararon con sus respectivos grupos control, mediante el test *t* de Student (para muestras independientes). La comparación entre múltiples grupos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA de un factor), seguido del test C de Dunnett (asumiendo la no igualdad entre varianzas). Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0.05$ (en cada uno de los experimentos se especifica el tipo de análisis estadístico utilizado).

Para el cálculo de las dosis a las que se conseguían niveles del 20, 50 y 80% de efecto inhibitor de extravasación plasmática (DE_{20} , DE_{50} , DE_{80}) se utilizaron los datos numéricos experimentales correspondientes a la pendiente ascendente de las curvas bifásicas obtenidas para los agonistas morfina (MS), fentanilo (FN), PL017 (PL), DPDPE (DP) y SNC 80 (SN), ajustándolos a regresiones lineales simples.

Los cálculos estadísticos así como las estimaciones lineales se realizaron utilizando el software informático SPSS 9.0.

A continuación, se exponen los resultados obtenidos al estudiar los efectos inducidos por agonistas opioides sobre el edema y la extravasación plasmática, utilizando el modelo de inflamación aguda periférica en rata, descrito por Winter *et al.* (1962), en diferentes condiciones experimentales. Mediante el test de Kolmogorov-Smirnov ($P > 0.05$) se demostró que los resultados seguían una distribución normal. Sin embargo, el test de Levene indicó que no había homogeneidad de varianzas ($P < 0.05$). Por esta razón, el estudio comparativo entre pares de grupos (test *t* de Student) y la comparación múltiple (ANOVA de un factor) del edema y la extravasación de plasma se realizó asumiendo la no igualdad de varianzas, empleándose como test *post hoc* el test C de Dunnett. Todos estos cálculos se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS 9.0.