

## OPIOIDES SINTÉTICOS NO PEPTÍDICOS CON PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS Y ANTITUMORALES

Diana Caballero-Hernández, Reyes Tamez-Guerra, Cristina Rodríguez-Padilla, Patricia Tamez-Guerra, Richard J. Weber\* y Ricardo Gómez Flores

Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, (México); \*Department of Biomedical and Therapeutic Sciences, UIC College of Medicine, Peoria, ILL (USA)

**E-mail:** [rgomez60@hotmail.com](mailto:rgomez60@hotmail.com)



### Introducción

La drogadicción es un problema de salud pública que contribuye al desarrollo de enfermedades infecciosas como el SIDA, y el cáncer, en parte, debido al aumento en la susceptibilidad a las enfermedades de estos individuos. Se han demostrado efectos inmunosupresores indirectos de opioides a través del sistema nervioso central. En forma paradójica, se ha observado que los opioides pueden estimular, suprimir o no tener efecto alguno sobre diversos parámetros de función leucocitaria. Recientemente, se han reportado resultados sobre nuevos compuestos analgésicos selectivos para el receptor opioide delta, que inducen inmunopotenciación *in vitro* e *ex vivo* (administración periférica). Estos ligandos opioides podrían servir como agentes inmunoterapéuticos para incrementar el número de linfocitos periféricos, activar las funciones de los macrófagos, entre otros

aspectos; con uso potencial en el tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer.

La mayoría de los pacientes con cáncer se tratan con alguna combinación de cirugía, radiación, y quimioterapia. La radiación y la quimioterapia tienen la desventaja de destruir tejido sano, mientras se ataca el tejido tumoral, lo que conlleva a graves efectos secundarios. Existe mucha evidencia de que el sistema inmune de pacientes con cáncer es capaz de atacar sus células tumorales. De hecho, podría parecer que el cáncer es una falla de la vigilancia inmunológica. Los inmunoestimulantes son agentes inespecíficos que afinan las defensas inmunológicas del huésped. Ha habido algo de éxito al administrar agentes adyuvantes directamente en el tumor; sin embargo, la única sustancia antitumoral eficaz aún en uso es la preparación bacteriana que contiene *Mycobacterium bovis* (preparación BCG).

La terapia oral con levamisol, ha mostrado ayudar a algunos pacientes con cáncer de riñón. Otras sustancias utilizadas incluyen a la interleucina-2, que es un potente factor de crecimiento para linfocitos T, y el interferon-alfa.

El descubrimiento y desarrollo de sustancias modificadoras de las respuestas biológicas ha sido siempre de interés práctico; un grupo de sustancias con estas características son los opioides, los cuales han estado entre los agentes medicinales más importantes de diversas culturas. El término "opioide" se aplica de forma genérica para designar a un grupo de sustancias naturales y sus derivados semisintéticos y sintéticos, que tienen la capacidad para aliviar el dolor, pero con el riesgo potencial para provocar dependencia física.

Adicionalmente, estos compuestos pueden alterar las funciones inmunológicas mediante su unión a receptores de opioides en células del sistema inmune (1), o en forma indirecta al activar receptores de opioides en el sistema nervioso central (2,3). Los linfocitos, células asesinas naturales y macrófagos son muy sensibles a la acción opioide; los agonistas opioides se pueden unir a receptores opioides del tipo  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  sobre la superficie de dichas células, y por consecuencia, alterar sus funciones inmunológicas y de esta forma incrementar la susceptibilidad de los organismos a enfermedades infecciosas y cáncer (4-8).

Existe también un aspecto prometedor en la actividad inmunoreguladora de estos compuestos. Si bien algunos opioides son inmunosupresores también se ha observado que otros tienen la capacidad de estimular la respuesta inmune de los individuos, sin embargo, los opioides disponibles actualmente son peptídicos y presentan algunas desventajas que incluyen su rápida degradación y su bajo potencial para cruzar la barrera hematoencefálica, lo cual limita sus aplicaciones clínicas (9). Por el contrario, los agonistas opioides no peptídicos han demostrado superar las principales desventajas de los opioides peptídicos ya que son altamente selectivos, potentes, y resistentes a la proteólisis. Además, se ha demostrado su utilidad como analgésicos no inmunosupresores (10). Recientemente, se han reportado resultados sobre nuevos opioides no peptídicos del tipo  $\mu$  y  $\delta$  los cuales inducen proliferación de linfocitos T y activan a los macrófagos de rata *in vitro* y *ex vivo* (11,12).

Los agonistas opioides no peptídicos podrían servir como agentes inmunoterapéuticos de uso potencial en el tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer. Además, el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales los opioides producen efectos directos en el sistema inmunológico, podría permitir el descubrimiento, diseño y síntesis de nuevos opioides que tengan no sólo propiedades analgésicas, sino capacidades inmunomoduladoras específicas (13,14).

De esta manera, la diversidad de la farmacopea de opioides provee una fuente de nuevos compuestos con potencial inmunoterapéutico, así como de herramientas farmacológicas para la investigación de los mecanismos por los cuales el sistema inmune se controla y regula en forma natural a través de sistemas opiatérgicos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial inmunomodulador y antitumoral de un grupo de compuestos opioides sintéticos del tipo *mu* y *delta*

## **Materiales y Métodos**

**Animales de experimentación:** Se emplearon ratas macho Sprague Dawley (200-220 g), de 6 a 8 semanas de edad, las cuales se obtuvieron en Harlan México S.A. Se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos y de estrés a 24 °C, bajo un ciclo luz-oscuridad (fase lumínica, 06:00-18:00 horas), y se les proporcionó agua purificada y alimento (Purina, México) *ad libitum*.

**Líneas celulares:** Las líneas celulares empleadas, L-5178Y-R (linfoma murino DBA/2), U937 (clona CRL 1593; linfoma humano histiocítico tipo monocito), H-9 (clona HTB-176, linfoma humano de células T), Jurkat (clona E6-1 TIB-152; leucemia aguda humana de células T), L929 (clona CCL1; fibrosarcoma murino de tejido conectivo) y J774A-1 (línea tumoral murina monocito/macrófago) fueron adquiridas en American Type Culture Collection (Rockville, MD).

**Compuestos opioides evaluados:** Los compuestos opioides: (+)-4-((alfa R)9-alfa-((2S, 5R)-4-alil-2, 5-dimetil-1-piperazinil)-3-metoxibenzil)-N, N-dietil-benzamida, **SNC80**(+); opioides derivados del naltrindol: fenoxinaltrindola (**9332**); y 6'-Hidroxinaltrindola, (**9333**); y los compuestos derivados del bencilideno-naltrexona: el 6,7-5'.6'-Piridomorfinano ciabi-4'-fenil, (**9334**); y 6, 7-2',3'-quinolinomorfinano, (**9336**); fueron proporcionados por el Dr. K.C. Rice del Laboratorio de Química Medicinal en Bethesda, MD.

**Determinación de la respuesta proliferativa in vitro de linfocitos de rata:** Se determinó la proliferación de linfocitos de timo de rata, mediante una técnica colorimétrica que se basa en la reducción de la sal de tetrazolio MTT, como se ha reportado anteriormente (15).

**Evaluación de las funciones de macrófagos de rata:** Los animales se sacrificaron con CO<sub>2</sub> e inmediatamente se procedió a colectar las células residentes en la cavidad peritoneal con medio RPMI 1640 frío. Las suspensiones celulares se lavaron una vez con este medio, se resuspendieron y ajustaron en medio AIM-V a una a una densidad de 2x10<sup>6</sup> células/ml. Alícuotas de 100µl/pozo de ésta suspensión celular se incubaron durante 2 horas en placas de 96 pozos con fondo plano (Becton Dickinson, Cockeysville, MD). Las células no adherentes se removieron, y las células adherentes (aproximadamente 70% de las células sembradas o casi 1.4 x 10<sup>6</sup> células/ml) se incubaron durante la noche en 100 µl/pozo de medio AIM-V en la presencia o ausencia de los opioides evaluados.

**a.- Producción de óxido nítrico por macrófagos:** Se empleó la acumulación de nitritos en el sobrenadante de los cultivos de macrófagos como un indicador de la producción de óxido nítrico por células residentes o activadas, y se determinó como se ha descrito previamente (16)

**b.- Producción de TNF- $\alpha$  por macrófagos:** Se prepararon cultivos de macrófagos residentes de rata, y

se incubaron durante una noche (aproximadamente 16 h) en la presencia o ausencia de opioides en concentraciones de  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$  y  $10^{-7}$  M. Al día siguiente los cultivos se lavaron para eliminar los opioides, y los macrófagos se activaron con LPS (20 ng/ml). Los cultivos incubaron a 37°C durante 5 horas, al final de lo cual se colectaron 150 µl/pozo de sobrenadantes de los cultivos y se almacenaron a -72°C para su posterior análisis. Se empleó una prueba de ELISA comercial (BIOSOURCE International) para la cuantificación de TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes de los cultivos.

**c.- Fagocitosis de la levadura *Candida albicans* por macrófagos:** Se determinó el efecto de opioides sobre la fagocitosis de *Candida albicans*, cepa ATCC 32354, en una proporción de levaduras-macrófagos de 4:1, como anteriormente se ha descrito (17).

**Determinación de la respuesta proliferativa de células mononucleares humanas:** Para obtener células mononucleares de sangre periférica (CMSP), se empleó sangre completa obtenida de donadores sanos, las CMSP se aislaron mediante gradiente de centrifugación por Ficoll-Hypaque (3000 r.p.m. durante 20 minutos). La interfase que contiene las CMSP se colectó y lavó dos veces en medio RPMI 1640 a 1600 r.p.m. por 5 minutos. Se realizó un conteo total de la suspensión final ya lavada, y se ajustó a  $10^6$  cels/ml para la prueba de proliferación. Alícuotas de esta suspensión celular (100 µl/pozo) se depositaron en placas de 96 pozos de fondo plano (Becton Dickinson) las cuales contenían cultivos por triplicado (100 µl/pozo) de medio AIM-V, como control no estimulado, o bien cultivos por triplicado de fitohemaglutinina 20 µg/ml (PHA), para estimular la proliferación de CMSP, en la presencia o ausencia de opioides en un rango de concentraciones de  $10^{-11}$ - $10^{-5}$ . Después de incubar por 44 horas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire, se añadió el MTT a una concentración final de 0.5 mg/ml, y los cultivos se incubaron por cuatro horas adicionales. Se añadieron 100 µl de buffer para lisis celular a cada pozo, y se incubaron durante toda la noche. Al terminar esta incubación, se leyeron las densidades ópticas a 540nm en un lector de microplacas.

**Evaluación de las funciones de monocitos humanos:** Por el método ya descrito, se obtuvieron CMSP, se ajustaron a una densidad de  $2.5 \times 10^6$  células/ml y se sembraron 100µl/pozo en una placa de 96 pozos de fondo plano y se incubaron por 2 horas a 37 °C. Las células no adherentes se removieron, y las células adherentes (aproximadamente 10% de las células sembradas) se incubaron durante la noche en 100 µl/pozo de medio AIM-V en la presencia o ausencia de los opioides en concentraciones de  $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$  y  $10^{-6}$  M. La producción de TNF- $\alpha$  se determinó mediante un ELISA.

**Determinación de la proliferación in vitro de células tumorales:** Los cultivos, mantenimiento y utilización de células tumorales se realizaron como previamente se ha descrito (18). El efecto de opioides, en un rango de concentraciones de  $10^{-5}$ M a  $10^{-11}$  M, sobre el crecimiento de las líneas tumorales se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (19).

**Análisis estadístico:** Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron al menos tres veces con resultados similares. Se emplearon las pruebas Kolmogorov Smirnov y ANOVA de una vía para evaluar el nivel de significancia de la diferencia entre la media de los grupos experimentales (control y tratamientos), y la prueba *t* de Dunnet para determinar la significancia de la diferencia entre el grupo control y el tratamiento opioide.

## **Resultados**

### **Efecto de opioides sintéticos, no peptídicos, sobre la proliferación in vitro de linfocitos de rata Sprague Dawley:**

La proliferación de linfocitos de timo de rata residentes y activados (Con A) tuvo un incremento significativo en los cultivos tratados con el opioide **9336** y en forma contraria disminuyó en los tratados con el opioide **9332**.

Los compuestos **SNC80**, **9332** y **9334** fueron capaces de estimular la proliferación de linfocitos activados, pero no la de residentes. El compuesto **9333** tuvo efecto únicamente en la concentración  $10^{-6}$  M, con un incremento de la proliferación. El opioide **9334** actuó en el rango de concentraciones  $10^{-10}$ – $10^{-5}$  M y causó incrementos, con la mayor estimulación en la concentración  $10^{-7}$  M (Ver Tabla 1).

**Tabla 1. Efecto de opioides sintéticos, no peptídicos, sobre las funciones de leucocitos de humano y rata.**

| OPIOIDE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | FUNCIÓN INMUNE                              | RESIDENTES | ACTIVADOS |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------|-----------|
| <b>SNC80</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Proliferación de linfocitos de timo de rata | <◇>        | ▲▲▲▲      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Producción de óxido nítrico por macrófagos  | <◇>        | ▼         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Producción de TNF- $\alpha$ por monocitos   | ▲▲         | <◇>       |
| <b>9332</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Proliferación de linfocitos de timo de rata | ▼▼▼        | ▼▼▼/▲▲ *  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Producción de óxido nítrico por macrófagos  | ▼▼▼        | ▼▼        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Proliferación de CMSP                       | ▼▼▼        | ▼▼        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Producción de TNF- $\alpha$ por monocitos   | ▼▼         | <◇>       |
| <b>9333</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Proliferación de linfocitos de timo de rata | <◇>        | ▲▲        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Producción de TNF- $\alpha$ por monocitos   | ▼▼         | ▼         |
| <b>9334</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Proliferación de linfocitos de timo de rata | <◇>        | ▲▲        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Producción de óxido nítrico por macrófagos  | <◇>        | ▼         |
| <b>9336</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Proliferación de linfocitos de timo de rata | ▲▲         | ▲▲▲       |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Proliferación de CMSP                       | ▲▲         | ▲▲        |
| <p>Los resultados se expresan como la tendencia observada en los grupos experimentales al compararlos con los grupos control (no tratados con opioides) en base a índices de actividad (los índices de función inmune representan la relación entre la actividad medida (proliferación, producción de TNF-<math>\alpha</math>, etc.) entre el grupo tratado con el opioide y el grupo control sin tratar); un índice igual a 1 equivale a no tener efecto de tratamiento, un índice mayor de 1 equivale a una estimulación en la función inmune, mientras que un índice menor de 1 equivale a una inhibición de la misma. Las diferencias observadas son estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba t de Dunnet (datos no mostrados). Para detalles de los procedimientos seguidos ver Sección de Material y Métodos.</p> <p>* Actividad dependiente de la concentración de opioide.</p> <p>TNF-<math>\alpha</math>, factor de necrosis tumoral alfa; CMSP, células mononucleares de sangre periférica</p> <p>▲ Estimulación, ▼ Inhibición, &lt;◇&gt; Sin cambio</p> |                                             |            |           |

### Efecto de opioides sintéticos, no peptídicos, sobre las funciones de macrófagos de rata Sprague Dawley.

La producción de óxido nítrico por macrófagos de rata fue inhibida por los opioides **SNC80**, **9332** y **9334**. El **SNC80** en forma significativa suprimió la producción de óxido nítrico por macrófagos residentes a las concentraciones  $10^{-9}$  y  $10^{-6}$  M. El **9334** actúa a la concentración  $10^{-9}$  M, también sobre macrófagos residentes, mientras que el opioide **9332**,  $10^{-5}$  M afecta la producción de óxido nítrico por macrófagos residentes y activados. Tanto la producción de TNF- $\alpha$ , como la fagocitosis de *Candida albicans* por macrófagos de rata residentes y activado (LPS) no sufrieron alteraciones a consecuencia del tratamiento con los opioides evaluados en este estudio.

### Efecto de opioides sintéticos, no peptídicos, en la respuesta de células mononucleares humanas.

La proliferación *in vitro* de células mononucleares humanas fue afectada por el tratamiento con los opioides **9332** y **9336**, mientras que no se observó actividad significativa sobre este parámetro debido al tratamiento con los opioides **SNC80**, **9333** y **9334**. Por su parte se observaron alteraciones en la producción de TNF- $\alpha$  por monocitos en los cultivos tratados con los opioides **SNC80**, **9332** y **9333**, pero no por los opioides **9334** y **9336** (Ver Tabla 1).

### Efecto de opioides sintéticos, no peptídicos sobre el crecimiento tumoral in vitro:

Evaluamos el efecto de opioides sintéticos no peptídicos sobre la proliferación *in vitro* de líneas celulares de origen humano y murino. Fueron empleadas seis líneas celulares, cinco de ellas de estirpe inmune y

una fibroblastoide. Los resultados obtenidos muestran una actividad diferencial de opioides que parece depender del tipo celular y de la concentración de opioide (Ver Tabla 2). El **SNC80** presento actividad inhibitoria de la proliferación de las líneas L5178Y, Jurkat, U937, J774A.1, y L929. El compuesto **9332** tiene la capacidad de inhibir la proliferación de todas las líneas celulares evaluadas, L5178Y, Jurkat, H9, U937, J774A.1 y L929. En forma alterna, este compuesto tiene también la capacidad de estimular la proliferación de la línea L5178Y, la dirección del efecto es dependiente de la concentración del opioide. El efecto inhibitorio fue observado en la concentración  $10^{-5}$  M. La acción estimuladora de la proliferación de L5178Y fue observada en el rango de concentraciones  $10^{-11}$ – $10^{-7}$  M. El opioide **9333** tuvo un efecto estimulador de la proliferación de las líneas celulares L5178Y, U937, J774A.1 y L929. El compuesto **9334** mostró actividad diferencial dependiendo de la línea celular evaluada, inhibió la proliferación de la línea Jurkat, mientras que estimulo la de la línea L929. El opioide **9336** estimulo la proliferación de las líneas L5178Y y L929.

| Tabla 2. Efecto de opioides sintéticos, no peptídicos, sobre la proliferación in vitro de líneas tumorales.                                                                                                                         |       |      |      |      |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------|------|------|------|
| Opioide                                                                                                                                                                                                                             | SNC80 | 9332 | 9333 | 9334 | 9336 |
| Línea celular                                                                                                                                                                                                                       |       |      |      |      |      |
| L5178Y                                                                                                                                                                                                                              | ▼     | ▼▼/▲ | ▲▲   | ◁▷   | ▲▲   |
| Jurkat                                                                                                                                                                                                                              | ▼     | ▼    | ◁▷   | ▼    | ◁▷   |
| H9                                                                                                                                                                                                                                  | ▼     | ▼    | ◁▷   | ◁▷   | ◁▷   |
| U937                                                                                                                                                                                                                                | ▼     | ▼    | ▲    | ◁▷   | ◁▷   |
| J774A.1                                                                                                                                                                                                                             | ▼     | ▼▼   | ▲    | ◁▷   | ◁▷   |
| L929                                                                                                                                                                                                                                | ▼     | ▼▼   | ▲▲   | ▲▲   | ▲▲   |
| Los resultados se expresan como la tendencia observada en los grupos experimentales al compararlos con los grupos control (no tratados con opioides. Para detalles de los procedimientos seguidos verSección de Material y Métodos. |       |      |      |      |      |
| ▲ Estimulación, ▼ Inhibición, ◁▷ Sin cambio                                                                                                                                                                                         |       |      |      |      |      |

### Discusión y Conclusiones

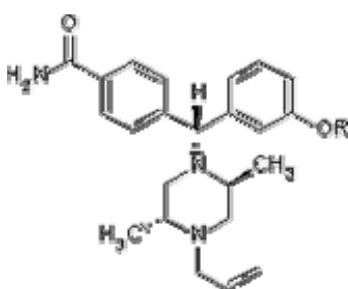
Se ha demostrado que la drogadicción es un problema de salud pública que contribuye a una mayor susceptibilidad a infecciones, principalmente debido a la interacción entre el sistema nervioso e inmune, que puede ocasionar inmunosupresión. El papel de opioides en cáncer, sin embargo, no ha sido elucidado. Carpenter y colaboradores, (1995) reportó que el tratamiento agudo de ratones con 50.0 mg/kg de morfina suprimió en forma significativa la actividad de los linfocitos T citotóxicos (20) que son las células clave contra las células tumorales. Además, Zagon y McLaughlin (2003) demostraron que el tratamiento de las líneas tumorales humanas MIA PaCa-2 (adenocarcinoma pancreático), HT-29 (adenocarcinoma de colon), y CAL-27 (carcinoma de células escamosas de cuello y cabeza) con la encefalina DAMGO, morfina, o etorfina incrementaron en forma significativa la apoptosis y necrosis celulares (21). Màs aún, Kawase y colaboradores (2002) reportaron que la codeinona (un derivado de la morfina) causó citotoxicidad en las líneas tumorales orales humanas HSC-2 y HSG, pero ni codeinona o morfina fueron efectivas contra el linfoma murino de células T L5178 resistente a múltiples drogas (22). En contraste, se ha demostrado que la morfina puede estimular el crecimiento tumoral (23).Sin embargo, no se han elucidado aún los mecanismos por los cuales los opioides pueden influir en el desarrollo del cáncer (24).

Los compuestos opioides constituyen un importante grupo de modificadores de respuestas biológicas. Hasta el momento se ha descrito su actividad antinociceptiva (25), de modular la función inmune(26-30) de mimetizar el estrés y afectar las vías neuroendocrinas (31), de inhibir o modular el crecimiento y desarrollo tumoral (32,33,34). Por todo esto se puede considerar a los opioides como un grupo de compuestos de gran utilidad para la investigación y desarrollo farmacológico, que tienen capacidad adyuvante en la terapia de pacientes con compromiso inmunológico.

En la actualidad, el diseño de opioides tiene diversos objetivos de acuerdo al campo de estudio; en inmunoterapia, el objetivo es el de desarrollar compuestos opioides capaces de modular la respuesta inmune de pacientes inmunocomprometidos, para este efecto es necesario llevar a cabo pruebas que

determinen el efecto de estos opioides sobre parámetros representativos de la respuesta inmune. El objetivo de este trabajo fue el de evaluar los efectos de una serie de compuestos opioides sintéticos sobre la respuesta de linfocitos y macrófagos murinos y humanos, además se realizaron pruebas *in vitro* para determinar si alguno de estos compuestos posee propiedades antitumorales. Ambos objetivos nos han permitido obtener un perfil de la actividad biológica de estos opioides para así determinar su potencial utilidad clínica.

De los compuestos opioides evaluados el **SNC80** es por sus antecedentes y por los resultados obtenidos en este trabajo, el más prometedor (Ver Figura 1). Los estudios farmacológicos realizados muestran que el **SNC80** tiene actividad analgésica con potencial terapéutico (35,36,37), además este compuesto posee además la capacidad de estimular la respuesta inmune *in vitro* y *ex-vivo* en ratas (38,39). En el presente estudio tuvimos la oportunidad de ampliar estas observaciones y aportar información inédita de sus efectos sobre leucocitos humanos, los resultados mostraron que a pesar de que el **SNC80** fue capaz de activar la proliferación de linfocitos de rata, este opioide no alteró la proliferación de linfocitos humanos. Este punto es importante dado que no necesariamente se busca un compuesto que afecte las funciones leucocitarias, y en este caso el **SNC80** es un analgésico muy potente que podría ser utilizado en la clínica sin esperar cambios en las funciones inmunológicas del paciente como en el caso de la morfina (40,41,42).



**Figura 1. El SNC80 es el derivado O-metilado del compuesto (+)-BW373U86, el SNC80 tiene una selectividad 500 veces mayor por los receptores *delta* vs *mu*, la cual es similar a la de la mayoría de los agonistas peptídicos selectivos *delta*.**

Se observó también que el **SNC80** posee propiedades antitumorales *in vitro*. El **SNC80** inhibió el crecimiento *in vitro* de cinco líneas celulares, L5178Y, Jurkat, U937, J774A.1 y L929, y su efecto abarcó un amplio rango de concentraciones, las cuales se encuentran principalmente entre  $10^{-9}$  y  $10^{-6}$  M. Los índices de inhibición son marginales en todos los casos, en un rango que va del 10 al 22% de inhibición. Estas observaciones adquieren mayor relevancia gracias a experimentos recientes desarrollados en nuestro laboratorio donde se ha demostrado, con un modelo *in vivo*, que el **SNC80** incrementa la sobrevivencia de ratones Balb/c luego de una administración letal del linfoblastoma L5178Y-R, así como también disminuye el peso y volumen del tumor (datos no publicados). Es importante recalcar el comportamiento selectivo de este compuesto, ya que estimula la proliferación de células normales e inhibe la proliferación de células transformadas, esto es muy evidente en el caso de la línea L5178Y, el cual es un linfoma murino con una alta tasa de proliferación.

Los mecanismos detrás de esta actividad del **SNC80** no han sido elucidados aún, sin embargo para este tipo de actividad se han realizado diversas propuestas, por ejemplo, se ha sugerido que esta inhibición selectiva podría tener su origen en las diferencias metabólicas observadas entre células normales y transformadas, una de ellas la tasa de incorporación del compuesto a la célula (43). Otra explicación probable es que la activación de ciertos receptores en células normales y tumorales puede conducir a vías intracelulares divergentes que producen estimulación, inhibición o muerte. Respecto a esto, se ha demostrado que las células normales son resistentes a la apoptosis inducida por el ligando inductor de apoptosis asociado al factor de necrosis tumoral (TRAIL) el cual ha sido relacionado con la expresión de dos receptores TRAIL (44). Además, se ha reportado que la proteína inflamatoria 1-alfa de macrófagos es capaz de proteger células normales, pero no a las células de una leucemia crónica mieloide, de los efectos citotóxicos de la droga citosina arabinosa sobre el ciclo celular (45). Los opioides pueden ser solo tóxicos para las células tumorales ya que estas células, en comparación con las células normales, probablemente carezcan de un sistema de protección similar a los descritos arriba contra la muerte inducida por opioides.

Los agonistas opioides no peptídicos no poseen las desventajas de los opioides peptídicos y derivados de alcaloides, no se degradan, pueden atravesar la barrera hematoencefalica, no producen dependencia, no

son inmunosupresores, algunos de estos compuestos son capaces de estimular las respuestas inmunes y/o tener actividad antitumoral. Pueden servir como agentes terapéuticos con uso potencial en el tratamiento de enfermedades infecciosas, incluyendo al SIDA, y cáncer. Además el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales los opioides producen sus efectos en el sistema inmune, así como el estudio de la relación estructura-función, pueden ayudar al descubrimiento, diseño y síntesis de nuevos opioides con propiedades inmunomoduladoras y antitumorales específicas. Así, la diversidad de fármacos opioides proporciona a su vez nuevos compuestos con potencial terapéutico, también pueden ser herramientas farmacológicas para la investigación de como el sistema inmune es controlado y regulado en forma natural a través de mecanismos opiotérgicos.

## **Resumen**

El diseño y síntesis de opioides no peptídicos con un perfil farmacológico específico representa un prometedor campo de estudio, así como una fuente de nuevos compuestos con potencial aplicación terapéutica. En este trabajo hemos evaluado una serie de opioides sintéticos no peptídicos por sus propiedades inmunoreguladoras y antitumorales. Los resultados de este estudio apoyan la noción según la cual los opioides sintéticos, en la misma forma que los naturales, poseen propiedades bioreguladoras de importancia. Mas aun, las observaciones obtenidas con el agonista opioide SNC 80, sugieren para este compuesto un gran potencial clínico como analgésico no inmunosupresor, y/o agente antitumoral.

*Palabras clave: SNC80, antiproliferativo, immunoestimulante, proinflamatorio*

## **Abstract**

The design and synthesis of non-peptidic opioids with an specific pharmacological profile represents a promising field of study and a suitable source for new compounds with potential therapeutic application. In this work, we have evaluated a serie of non-peptidic synthetic opioids for their immunoregulatory and antitumoral properties. The results of this study support the notion that synthetic opioids, as those of natural origin, possess regulatory properties of biological relevance. Furthermore, the results obtained with the opioid agonist SNC 80, suggest that this opioid has clinical potential as a non immunosupresive analgesic drug and/or antitumoral agent.

*Keywords: SNC80, antiproliferative, immunostimulating, pro-inflammatory*

## **Referencias**

1. Sharp, B.M., W.F. Keane, H.J. Suh, G. Gekker, D. Tsukayama and P.K. Peterson. 1985. Opioid peptides rapidly stimulate superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and macrophages. *Endocrinology* Vol. 117: 793-795.
2. Shavit Y., G.W. Terman, F.A. Martin, J.W. Lewis, J.C. Liebeskind and R.P. Gale, R.P. 1985. Stress, opioid peptides, the immune system, and cancer. *J. Immunol.* Vol. 135: 2.
3. Weber, R.J. and A. Pert. 1989. The periaqueductal gray matter mediates opiate-induced immunosuppression. *Science* Vol. 245: 188-190.
4. Roy, S. and H.H. Loh. 1996. Effects of opioids on the immune system. *Neurochem. Res.* Vol. 21: 1375.
5. Guan, L., R. Townsend, T.K. Eisenstein, M.W. Adler and T.J. Rogers. 1995. The cellular basis for opioid-induced immunosuppression. *Adv. Exp. Med. Biol.* Vol. 373: 57-64.
6. Tubaro, E., G. Borelli, C. Croce, G. Cavallo and C. Santiangeli. 1983. Effect of morphine on resistance to infection. *J. Infect. Dis.* Vol. 148: 656-666.
7. Watson, R.R., R.H. Prabhala, H.R. Darban, M.D. Yahya and T.L. Smith. 1988. Changes in lymphocyte and macrophage subsets due to morphine and ethanol treatment during a retrovirus infection causing murine AIDS. *Life Sci* Vol. 43: v-xi.
8. Yeager, M.P. and T.A. Colacchio. 1991. Effect of morphine on growth of metastatic colon cancer in vivo. *Arch. Surg.* Vol. 126: 454-456.

9. Hambrook, J.M., B.A. Morgan, M.J. Rance and C.F. Smith. 1976. Mode of deactivation of the enkephalins by rat and human plasma and rat brain homogenates. *Nature*. Vol. 262 No. 5571: 782-3.
10. Nowak, J.E., R. Gomez-Flores, S.N. Calderon, K.C. Rice and R.J. Weber 1998. Rat natural killer cell, T cell and macrophage functions after intracerebroventricular injection of SNC 80. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Vol. 286: 931-937.
11. Gomez-Flores, R., K.C. Rice, X. Zhang and R.J. Weber. 2001. Increased tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production by rat macrophages following *in vitro* stimulation and intravenous administration of the delta-opioid agonist SNC80. *Life Sci.* Vol. 68 No. 24: 2675-84.
12. Riley, M.E., S. Ananthan and R.J. Weber. 1998. Novel Non-peptidic opioid compounds with immunopotentiating effects. *Adv. Exp. Med. Biol.* Vol. 437: 183-187.
13. Gómez-Flores, R. and R.J. Weber. 1999. Inhibition of interleukin-2 production and downregulation of IL-2 and transferrin receptors on rat splenic lymphocytes following PAG morphine administration: a role in natural killer and T cell supresion. *J. Interferon Cytokine Res.* Vol. 19: 625-30.
14. Gómez-Flores, R. and R.J. Weber. 2000. Differential effects of buprenorphine and morphine on immune and neuroendocrine functions following acute administration in the rat mesencephalon periaqueductal gray *Immunopharmacology* Vol. 48 No. 2: 145-56.
15. Franco-Molina, M., R. Gomez-Flores, P. Tamez-Guerra, R. Tamez-Guerra, L. Castillo-Leon and C. Rodríguez-Padilla. 2003. *In vitro* Immunopotentiating Properties and Tumor Cell Toxicity Induced by *Lophophora williamsii* (Peyote) Cactus Methanolic Extract. *Phytother. Res.* Vol. 17 No. 9: 1076-81.
16. Gomez-Flores, R. *et. al., Op.cit.*
17. Gómez-Flores, R. and R.J. Weber. 2000, *Op.cit.*
18. Franco-Molina, M., *et. al., Op.cit.*
19. *Idem.*
20. Carpenter, G.W., L. Breeden and D.J. Carr. 1995. Acute exposure to morphine suppresses cytotoxic T-lymphocyte activity. *Int. J. Immunopharmacol.* Vol. 17 No. 12: 1001-6.
21. Zagon, I.S. and P.J. McLaughlin. 2003. Opioids and the apoptotic pathway in human cancer cells. *Neuropeptides* Vol. 37 No. 2: 79-88.
22. Kawase, M., H. Sakagami, K. Furuya, H. Kikuchi, H. Nishikawa, N. Motohashi, Y. Morimoto, A. Varga and J. Molnar. 2002. Cell death-inducing activity of opiates in human oral tumor cell lines. *Anticancer Res.* Vol. 22 No. 1A: 211-4.
23. Bonn, D. 2002. Morphine stimulates tumour growth. *Lancet Oncol.* Vol. 3 No. 9: 520.
24. Kajdaniuk, D., B. Marek, B. Buntner and K. Zwirska-Korczala. 2000. Do enkephalins and other endogenous opioids participate in regulation of cancer growth?. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* Vol. 54 No. 5: 597-608.
25. Dickenson, A.H. 1997. Plasticity: implication for opioid and other pharmacological interventions in specific pain states. *Behav. Brain Sci.* Vol. 20:392-403.
26. Nowak, J.E. *et al., Op. cit.*
27. Gómez-Flores, R. and R.J. Weber. 1999, *Op. cit.*
28. Gómez-Flores, R. and R.J. Weber. 2000, *Op.cit.*



29. McCarthy, L., M. Wetze, J.K. Sliker, T.K. Eisenstein and T.J. Rogers. 2001. Opioid, opioids receptors and the immune response. *Drug Alcohol Depend.* Vol. 62 No. 2: 111-123.
30. Carr, D.J., R.T. Radulescu, B.R. deCosta, K.C. Rice and J.E. Blalock. 1990. Differential effect of opioids on immunoglobulin production by lymphocytes isolated from Peyer's patches and spleen. *Life Sci.* Vol. 47 No. 12: 1059-69.
31. Dantzer, R. and K.W. Kelley. 1989. Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sci.* Vol. 1995: 2008
32. Maneckjee, R., R. Biswas and B.K. Vonderhaar. 1990. Binding of opioids to human MCF-7 breast cancer cells and their effects on growth. *Cancer Res.* Vol. 50: 2234-2238
33. Maneckjee, R. and J.D. Minna. 1990. Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol. 87: 3294-3300.
34. Panagiotou, S., E. Bakogeorgou, E. Papakonstanti, A. Hatzoglou, F. Wallet, C. Dussert, C. Stournaras, P.M. Martin and E. 1999. Opioid agonists modify breast cancer cell proliferation by blocking cells to the G2/M phase of the cycle: involvement of cytoskeletal elements. *J. Cell. Biochem.* Vol. 73 No. 2: 204-11.
35. Calderon, S.N., R.B. Rothman, F. Porreca, J.L. Flippen-Anderson, R.W. McNutt, H. Xu, L.E. Smith, E.J. Bilsky, P. Davis and K.C. Rice. 1994. Probes for narcotic receptor mediated phenomena. 19. Synthesis of (+) (+)-4-((alpha R)9-alpha-((2S, 5R)-4-allyl-2, 5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl)-N, N-diethyl-benzamide (SNC80): A highly selective, nonpeptide d opioid receptor. *J. Med. Chem.* Vol. 37: 2125-2128.
36. Bilsky, E.J., S.N. Calderon T. Wang, R.N. Bernstein, P. Davis, V.J. Hruby, R.W. McNutt, R.B. Rothman, K. Rice and F. Porreca. 1995. SNC80, a selective, nonpeptidic and systemically active opioid delta agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Vol. 273: 359-66.
37. Negus, S.S., M.B. Gatch, N.K. Mello, X. Zhang and K. Rice. 1998. Behavioral effects of the delta-selective opioid agonist SNC80 and related compounds in rhesus monkey. *J. Pharm. Exp. Ther.* Vol. 286: 362-375.
38. Nowak, J.E. *et al.*, *Op. cit.*
39. Gomez-Flores, R. *et. al.*, *Op.cit*
40. Weber, R.J. and A. Pert, *Op.cit.*
41. Gómez-Flores, R. and R.J. Weber. 1999, *Op. cit.*
42. Gómez-Flores, R. and R.J. Weber. 2000, *Op.cit.*
43. Hohenwarter, O., K. Strutzenberger, H. Katinger, A. Liepins and J.W. Nowicky. 1992. Selective inhibition of *in vitro* cell growth by the anti-tumour drug ukrain. *Drugs Exp. Clin. Res.* Vol. 18: Suppl (1-4).
44. Zhang, X.D, T. Nguyen, W.D. Thomas, J.E. Sanders and P. Hersey. 2000. Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types. *FEBS Lett.* Vol. 482: 193-199.
45. Durig J., N.G. Testa, B.I. Lord, C. Kasper, J. Chang, N. Telford, T.M. Dexter and C.M. Heyworth. 1999. Characterization of the differential response of normal and CML haemopoietic progenitor cells to macrophage inflammatory protein-1alpha. *Leukemia* Vol. 13: 2012-2022