



Sobrevivencia de ratones mediante administración del opioide delta SNC80: modelo de linfoma murino L5178Y-R

RICARDO GÓMEZ FLORES*, DIANA CABALLERO HERNÁNDEZ*, REYES TAMEZ GUERRA*,
PATRICIA TAMEZ GUERRA*, CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA*

Los compuestos opioides incluyen: opio, morfina, heroína, meperidina, metadona y propoxifeno. Todos éstos relajan el sistema nervioso central y tienen efectos narcóticos (alivio al dolor) similares, además inducen al sueño. La heroína es el opioide de abuso más común en Estados Unidos, sólo en ese país existe un estimado de 400,000 a 600,000 adictos a la heroína.^{1,2} La morfina y la heroína causan confusión mental, mareo y euforia. Algunas personas comienzan a usar estas drogas por prescripción para aliviar el dolor producido por enfermedades, pero gradualmente aumentan la dosis por decisión propia, induciendo en esa forma tolerancia a la droga. Es sabido que, con el tiempo, los usuarios de opioides que se inyectan la droga pueden desarrollar infecciones en las válvulas cardíacas, abscesos en la piel y congestión pulmonar. La infección puede conducir a hepatitis, tétanos, enfermedad hepática y a la transmisión del virus de la inmunodeficiencia adquirida. Además, virtualmente todas las drogas con potencial de abuso tienen acción central y muchas drogas de abuso tienen efectos inmunosupresores, lo que provoca la aparición de enfermedades infecciosas.^{3,8}

El papel que juegan los compuestos opioides en

el cáncer, sin embargo, no ha sido aún clarificado. Carpenter *et al.* han reportado que el tratamiento agudo de ratones con 50.0 mg/kg de morfina suprime en forma significativa la actividad de los linfocitos T citotóxicos,⁹ los cuales son las células clave en la respuesta inmune contra las células tumorales. Además, Zagon y McLaughlin, recientemente, demostraron que la exposición de las líneas celulares de cáncer humanas MIA PaCa-2 (adenocarcinoma pancreático), HT-29 (adenocarcinoma de colon) y CAL-27 (carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello) a D-Ala(2),MeFe(4), glicol(5)-encefalina (DAMGO), morfina o etorfina a la concentración de 10^6 M causaba un incremento significativo en la apoptosis y necrosis.¹⁰ Sin embargo, concluyeron que esta actividad citotóxica era débil y no lograron establecer una relación una dosis-efecto, lo cual apoyaba los reportes previos de carencia de actividad inhibitoria del crecimiento por estos compuestos.¹⁰ Adicionalmente, Kawase *et al.* reportaron que la codeinona (un derivado de la morfina) causaba citotoxicidad de las líneas celulares de tumores orales humanos HSC-2 y HSG, pero ni la codeinona

*Departamento de Microbiología e Inmunología, FCB-UANL, San Nicolás de los Garza, N.L., México.

ni la morfina fueron efectivas contra la línea celular de linfoma de células T L5178Y transfectada con el gen MDR1.¹¹ Previamente, Yeager y Colacchio demostraron que una dosis alta subcutánea de sulfato de morfina y una dosis baja de morfina intrarraquídea reducían el crecimiento postoperatorio de cáncer de colon metastático en ratas.¹² En contraste, la morfina ha sido reportada como un estimulador de la proliferación de células tumorales^{13,14} y estimulador de la angiogénesis en un modelo de injerto xenogénico de tumor de mama humano, ocasionando una mayor progresión tumoral.¹⁵

El presente estudio se llevó a cabo con el objeto de evaluar el efecto del opioide pro-inflamatorio SNC 80 sobre el crecimiento de células tumorales *in vitro* e *in vivo*. Se observó inhibición del crecimiento *in vitro* de las células L5178Y-R y un incremento significativo en la sobrevivencia y reducción del peso de tumores en ratones administrados con células del linfoma L5178Y-R, tratados con SNC 80.

Material y métodos

Reactivos, medio de cultivo y líneas celulares

La solución de penicilina-estreptomina, L-glutamina, solución ficoll-hipaque, solución tripsina-EDTA, y medio RPMI 1640 se obtuvieron de Life Technologies (Grand Island, NY). Suero fetal bovino (SFB), dodecil sulfato de sodio (SDS), N, N-dimetilformamida (DMF), Buffer salino de fosfatos (PBS) y bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio MTT se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El buffer de extracción se preparó disolviendo SDS a 20% (peso/volumen) a 37°C, en una solución de DMF a 50% en agua desmineralizada, el pH se ajustó a 4.7.

Drogas

El opioide sintético (+)-4-((alfa R) 9-alfa-((2S, 5R)-4-alil-2, 5-dimetilalil-1-piperacilil)-3-metoxibenzil)-N, N-dietil-benzamida, SNC 80, fue proporcionado por Kenner C. Rice. Se preparó una solución stock de SNC 80 con dimetilsulfóxido al 10% y HCl 0.1 N al 5%.

Línea celular tumoral

La línea celular tumoral L5178Y-R (linfoma inducido químicamente en ratones DBA/2) fue adquirida de The American Type Culture Collection (Rockville, MD), y se mantuvo en frascos de cultivo con medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, L-glutamina 1%, y solución de penicilina-estreptomina a 5% (referido como medio RPMI 1640 completo) a 37°C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y aire. La densidad celular se mantuvo entre 10⁵ y 10⁶ células/ml.

Preparación de cultivos celulares

Para determinar el efecto *in vitro* directo del SNC 80 sobre el crecimiento tumoral *in vitro*, se colectaron los cultivos celulares y las suspensiones obtenidas se lavaron tres veces en RPMI 1640, se resuspendieron y ajustaron a 5 x 10⁴ células/ml con medio RPMI completo. Cien microlitros de las suspensiones celulares se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano (Becton Dickinson, Cockeysville, MD), los cuales contenían cultivos triplicados (100 ml) de RPMI completo (control no estimulado) u opioides a varias concentraciones. Después de incubar por 44 h a 37°C con 5% de CO₂ se añadió MTT (0.5 mg/ml, concentración final), los cultivos se incubaron por 4 h adicionales. A continuación, los cultivos celulares se incubaron por 16 h con buffer de extracción (100 ml) al término de las cuales se determinaron las densidades ópticas resultantes de la disolución de los cristales de formaban en un lector de microplacas (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT) a 540 nm.¹⁶ El porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ citotoxicidad} = 100 - \frac{A_{540} \text{ en células tratadas con opioide}}{A_{540} \text{ en células no tratadas}} \times 100$$

Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* por el SNC 80

Con base en los hallazgos sobre los efectos de este

opioide contra el crecimiento de células tumorales, se estableció la hipótesis de que éstos podían tener efectos *in situ* contra el crecimiento de tumores. Se utilizó el modelo murino del linfoma L5178Y-R para probar la actividad antitumoral del SNC 80 (se ha reportado que este opioide posee efectos inmunopotenciadores).^{17, 18} El linfoma se inoculó en los ratones mediante la inyección i.p. de 0.2 ml de una suspensión de células tumorales L5178Y-R (5×10^6 células/ratón) en ratones hembras Balb/c de 4 a 6 semanas de edad. Trece días después de la inoculación se colectó el líquido ascítico de la cavidad peritoneal de los ratones (previamente sacrificados por dislocación cervical). Después de esto, la suspensión ascítica se colocó en tubos de 50 ml con 10 ml de PBS. La suspensión celular se lavó dos veces en PBS, por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min, y se ajustó a 2×10^7 células/ml en medio RPMI completo. Posteriormente, ratones hembras Balb/c de dos meses de edad recibieron una administración subcutánea (muslo de la extremidad inferior derecha) de la suspensión de células del linfoma. Después de siete días de la inoculación del tumor, los ratones a los cuales se les administró el linfoma L5178Y-R se trataron intratumoralmente con nueve dosis de SNC 80, a concentraciones de 2 y 4 mg/kg (preparación fresca) en un volumen de 0.2 ml. Los grupos de control fueron: ratones con tumor no tratados con opioides (no tratados), ratones con tumor tratados con el vehículo (una solución que contenía dimetilsulfóxido a 10% y HCl 0.1 N a 5%), ratones normales sin tratamiento (control sin tratar, con/sin tumor) y ratones tratados con SNC 80 (4 mg/kg) con/sin tumor.

La determinación de la sobrevivencia (a) y peso del tumor (b) (el peso del tumor fue estimado mediante la medición del ancho (A) y largo (B) del tumor, usando la siguiente ecuación: peso (mg) = A (mm) X B² (mm)/2), se realizó los días 0 (siete días posadministración del tumor), y a los días 4 (día 11 posadministración del tumor), 7 (día 14 posadministración del tumor), 11 (día 18 posadministración del tumor), día 14 (día 21 posadministración del tumor), 17 (día 24 posadministración del tumor), 21 (día 28 posadministración del tumor), 24 (día 31 posadministración del tumor), y 28 (día 35

posadministración del tumor) del inicio del tratamiento con el opioide, el cual fue administrado usando este esquema de tratamiento hasta alcanzar nueve administraciones. La media del índice de peso tumoral se calculó de la siguiente manera: media del peso tumoral final (mg) (éste representa el último registro antes de la muerte del animal)/media del peso tumoral inicial (mg), de quince ratones (cinco ratones por grupo experimental en tres experimentos independientes).

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm SEM de la respuesta de tres repeticiones por tratamiento (estudio *in vitro*) o cinco ratones por grupo experimental (seis grupos según se detalló previamente) de tres experimentos independientes. El nivel de significancia se evaluó mediante la prueba t de Dunnet.

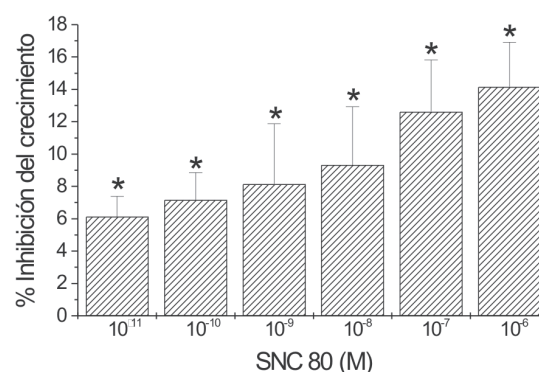


Fig. 1. Inhibición del crecimiento de células tumorales por el SNC 80. Cultivos de la línea celular L5178Y-R en fase de crecimiento exponencial se incubaron durante 48h en la presencia o ausencia de varias concentraciones de SNC 80 (10^{-11} M a 10^{-6} M), según se detalló en "Material y métodos". Después de 44h de incubación se añadió MTT a los pozos, y los cultivos se incubaron por 4h adicionales. El porcentaje de citotoxicidad se determinó mediante la lectura de las densidades ópticas a 540 nm, según se describió previamente en el texto. Los datos representan la media \pm de triplicados de tres experimentos independientes. *, $p < 0.05$ comparado con el control sin tratamiento. Los valores de densidades ópticas observados en el control sin tratamiento fueron de 0.402 ± 0.008 para la línea celular tumoral L5178Y-R.

Resultados

Efecto del SNC 80 sobre la proliferación de L5178Y-R

Hemos evaluado el efecto de SNC 80 sobre la proliferación *in vitro* de la línea celular tumoral L5178Y-R. Observamos que el SNC 80 en el rango de concentraciones de 10^{-11} M a 10^{-6} M inhibe en forma marginal, pero significativa ($p < 0.05$), el crecimiento de la línea celular tumoral L5178Y-R (hasta 14% de inhibición del crecimiento), en comparación con el control no tratado con SNC 80 (figura 1).

Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* por el SNC 80

La administración intratumoral *in vivo* del SNC 80 (2-4 mg/kg) causó un 40% de supervivencia de ratones a los 35 días posadministración del tumor, y continuaban vivos 50 días después de la inoculación del tumor (figura 2a), mientras que se observó una mortalidad del 100% en ratones con el tumor L5178Y-R no tratados con el opioide (sin tratamiento) y ratones con el tumor L5178Y-R tratados con el vehículo (figura 2a). Adicionalmente se observó una supervivencia de 100% en ratones normales no inoculados con células tumorales, sin tratamiento y tratados con el SNC 80 (figura 2a). Además, el SNC 80 a concentraciones de 2 y 4 mg/kg causó una reducción significativa ($p < 0.05$) de 60% y 73% en la media del índice de peso tumoral, respectivamente, en comparación con los ratones control con el linfoma sin tratar con el SNC 80 (figura 2b); el índice de la media del tumor en los animales control para el vehículo no fueron significativamente diferentes de su grupo control (no se muestran los datos).

Discusión

La actividad antitumoral de opioides es un área prometedora de estudio. Además de su papel en la modulación de la respuesta inmune antitumoral del huésped, hay evidencia de que los opioides pueden actuar directamente sobre receptores en la superficie de las células tumorales para activar vías celular

res que lleven a la inhibición del crecimiento tumoral o que causen citotoxicidad. El sistema opioide endógeno influye en el crecimiento y desarrollo tumoral al modular la respuesta inmune antitumoral del hospedero;^{5,8,19} un claro ejemplo de esto es la observación de que la morfina, α -endorfina, met-enkefalina, leu-enkefalina, dinorfina-A y β -endorfina aumentan la actividad de los macrófagos contra el crecimiento tumoral.²⁰⁻²² Los opioides también pueden actuar directamente contra las células tumorales para causar citotoxicidad o para inhibir la proliferación.²³ Esta posibilidad involucra la presencia de receptores opioides en la superficie de las cé-

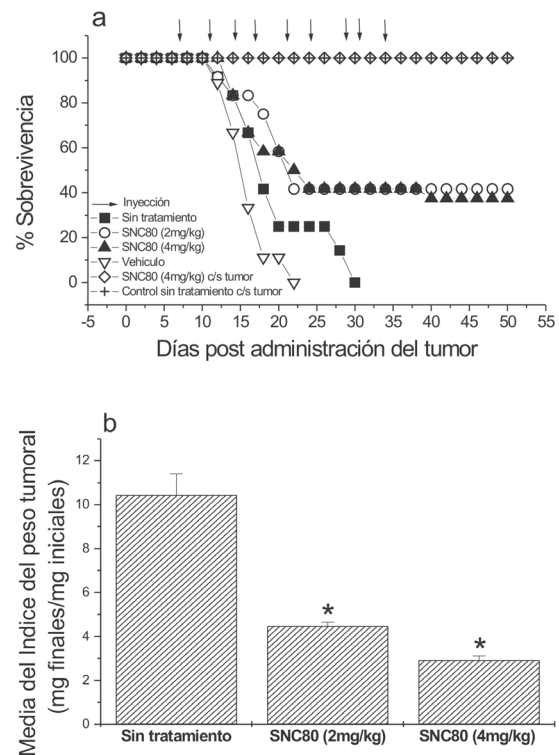


Fig. 2. Aumento en la supervivencia de ratones y reducción de masa tumoral por el SNC 80. Ratones hembra Balb/c de dos meses recibieron la administración subcutánea (muslo de la extremidad inferior derecha) de 0.2 ml de una suspensión 2×10^7 de células L5178Y-R. Siete días después de la inoculación del tumor, los ratones portadores de linfoma L5178Y-R fueron tratados vía intratumoral con SNC 80. Las determinación de supervivencia (a) y peso del tumor (b) se llevaron a cabo los días, 4, 7, 11, 14, 17, 21, 24, y 28 (día 35 posadministración del tumor), según se explicó anteriormente. El SNC 80 se administró de acuerdo a este esquema de tratamiento. *, $p < 0.05$ al comparar con la respuesta observada en los ratones portadores del linfoma L5178Y que no fueron tratados con SNC 80.

lulas tumorales, lo que sugiere que los opioides alcaloides exógenos y los opioides sintéticos no peptídicos pueden tener también propiedades anti-tumorales. En el presente estudio, observamos que el SNC 80 inhibe a las células del linfoma L5178Y-R *in vitro* (figura 1).

Se han observado alteraciones en el crecimiento de células tumorales causadas por la morfina, ya que se ha demostrado que ésta inhibe el crecimiento de las células Namalva del linfoma B y linfocitos transformados por el virus Epstein-Barr, mientras que estimula la proliferación de las células mieloides K562 y el linfoma de células T Jurkat.¹⁴ La presencia y tipo de receptores opioides en estas células puede ser un factor importante en tal respuesta.¹ Se ha demostrado la presencia de receptores opioides en las líneas celulares Jurkat (24), U937 (25), L929 (26) y J774 (27); sin embargo, no hay evidencia de la presencia de dichos receptores en las células L5178Y-R.

Con fundamento en nuestros hallazgos de la inhibición *in vitro* del crecimiento celular y en los reportes de las propiedades pro-inflamatorias del SNC 80^{17,28,29} llevamos a cabo su evaluación en un modelo murino para desarrollo de tumores. Observamos que el SNC 80 disminuye hasta 60% la muerte de ratones Balb/c, con el linfoma L5178Y-R (figura 2a), y reduce en forma significativa ($p < 0.05$) el peso tumoral (hasta un 73% de reducción) en estos animales (figura 2b).

La actividad antitumoral *in vivo* del SNC 80 puede ser mediada en forma directa o indirectamente al estimular el proceso de inflamación. Además de sus potentes propiedades analgésicas en diversos modelos animales de antinocicepción aguda,^{30,31} se ha demostrado que el SNC 80 carece de efectos inmunosupresivos y es capaz de potenciar la función inmune en la rata.^{18,32} El SNC 80 es capaz de inducir el reclutamiento y activación de macrófagos (con producción de factor de necrosis tumoral alfa [TNF- α] y óxido nítrico) y linfocitos en los sitios de tumor.^{17,18,28,29} Se ha reportado previamente que la administración intravenosa de SNC 80 estaba asociada con la activación *ex vivo* de la producción de TNF- α (incremento de hasta 100%) y óxido nítrico (hasta 67%) por macrófagos peritoneales, la cual fue potenciada por la inyección i.v. de concanavalina

A.¹⁷ También observamos que el pretratamiento de células mononucleares de sangre periférica humana con SNC 80 durante 16h incrementaba, significativamente, la producción de TNF- α por macrófagos residentes y activados con LPS, e incrementaba también las señales de mRNA de TNF- α e IL-8 en comparación con un control no estimulado (observaciones no publicadas). El TNF- α es conocido por causar inflamación de los tejidos, muerte de células tumorales, y efectos secundarios tóxicos como reducción del peso corporal.^{33,34} Por otro lado, la activación de linfocitos por el SNC 80²⁹ puede ocasionar la liberación de citocinas como el interferón-gama e IL-2 que están involucradas en los procesos pro-inflamatorios.³⁵ La activación de las citocinas inflamatorias y la expresión de genes de citocinas por acción del SNC 80 sobre las funciones de leucocitos pueden estar asociadas con su capacidad para regular el desarrollo de ciertos tipos de cáncer.³⁶

El SNC 80 puede servir como un agente inmunoterapéutico no sólo al incrementar la cantidad de linfocitos T activados y modular las funciones de macrófagos, sino al matar directamente las células tumorales. Son necesarios estudios posteriores para elucidar el mecanismo molecular de acción opioide en la modulación del crecimiento tumoral, y su papel en la terapia tumoral.

Resumen

Los compuestos opioides representan la forma fundamental para alivio del dolor. Sin embargo, el abuso de opioides puede causar inmunosupresión y cáncer. Recientemente se han publicado los resultados obtenidos con nuevos opioides sintéticos selectivos para receptores opioides *mu* y delta, los cuales inducen inmunopotenciación de las funciones de macrófagos y células T *in vitro* e *in vivo*. En este trabajo se investigaron los efectos del agonista opioide selectivo para receptor delta y potente analgésico (+)-4-((alfa R)9-alfa-((2S, 5R)-4-alil-2, 5-dimetil-1-piperazinil)-3-metoxibenzil)-N, N-dietil-benzamida (SNC 80) sobre el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* usando el modelo murino L5178Y-R. El SNC 80 inhibió en forma marginal (hasta 14%) pero significativa ($p < 0.05$) el crecimiento *in vitro* de células

tumorales L5178Y-R. Sin embargo, la administración *in vivo* por vía intratumoral del SNC 80 (2 y 4 mg/kg) redujo hasta 60% la muerte de ratones Balb/c portadores del tumor L5178Y-R, el SNC 80. Además, redujo en forma significativa ($p < 0.05$) el peso de los tumores (hasta 73%) en estos animales. Los hallazgos de este estudio sugieren la evaluación del compuesto opioide SNC 80 en estudios clínicos y preclínicos.*

Palabras clave: SNC 80, Opioides no-peptídicos, Agonista opioide δ , Células tumorales murinas, Linfoma L5178Y-R, Modelo de tumor en ratones.

Abstract

Opioids represent a major source of relief for pain. However, opioid abuse may cause immunosuppression and cancer. We have recently reported results on novel non-peptidic delta- and mu-selective opioids that induced immunopotentialization of T cell and macrophage functions *in vitro* and *ex vivo*. In the present study, we investigated the effects of the delta-opioid receptor agonist and potent analgesic (+)-4-((alpha R)-alpha-((2S, 5R)-4-allyl-2, 5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl)-N, N-diethyl-benzamide (SNC 80) on *in vitro* and *in vivo* tumor cell growth using the L5178Y-R murine model. We observed that SNC 80 marginally, but significantly ($p < 0.05$), inhibited (up to 14%) *in vitro* growth of L5178Y-R tumor cells. However, *in vivo* intratumor administration of SNC 80 (2 and 4 mg/kg) reduced up to 60% of deaths in L5178Y-R tumor-bearing Balb/c mice, and significantly ($p < 0.05$) reduced tumor weights (up to 73% reduction) in these animals. This study may support evaluation of SNC 80 in preclinical and clinical studies.

Agradecimientos

Este estudio contó con los apoyos I-32914-N y CN-285-00 (Paicyt) del Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología de México y de la Universidad Autónoma de Nuevo León, respectivamente, para RGF.

Keywords: SN80, Non-peptidic opioids, δ opioid agonist, Murine tumoral cells, L5178Y-R Lymphoma, Tumor model in rats

Referencias

1. Brown R. Heroin dependence. *Wis Med J* 103: 20-26, 2004.
2. Wright D., Gfroerer J, Epstein J.: The use of external data sources and ratio estimation to improve estimates of hardcore drug use from the NHSDA. *NIDA Res Monogr* 167: 477-97, 1997.
3. Stein C. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Anesth Analg* 76: 182-91, 1993.
4. Weber RJ, Pert A: The periaqueductal gray matter mediates opiate-induced immunosuppression. *Science* 245: 188-90, 1989.
5. Gómez-Flores R., Weber R. Opioids, opioid receptors, and the immune system. In: *Cytokines-stress and immunity* (Plotnikoff NP, Faith RE, Murgo A. J., Good RA, eds.). Boca Raton, CRC Press. 1999, pp. 281-314.
6. Rogers T. J., Taub DD, Eisenstein T. K., Geller E. B., Adler MW: Immunomodulatory activity of kappa-, mu-, and delta-selective opioid compounds. *NIDA Res Monogr* 105: 82-88, 1991.
7. House RV, Thomas P. T., Kozak JT, Bhargava HN: Suppression of immune function by non-peptidic delta OR antagonists. *Neurosci Lett* 198: 119-22, 1995.
8. Shavit Y., Terman G. W., Martin F. A., Lewis J. W., Liebeskind J. C., et al: Stress, opioid peptides, the immune system, and cancer. *J Immunol* 135: 834s-837s, 1985.
9. Carpenter G. W., Garza H. H. Jr, Gebhardt B. M., Carr D. J. Chronic morphine treatment suppresses CTL-mediated cytotoxicity, granulation, and cAMP responses to alloantigen. *Brain Behav Immun* 8: 185-203, 1994.
10. Zagon I. S., McLaughlin P. J.: Opioids and the apoptotic pathway in human cancer cells. *Neuropeptides* 37: 79-88, 2003.
11. Kawase M., Sakagami H., Furuya K., Kikuchi H., Nishikawa H., Motohashi N., Morimoto Y., Varga A., Molnar J. Cell death-inducing activity of opiates in human oral tumor cell lines. *Anticancer Res* 22: 211-14, 2002.
12. Yeager M. P., Colacchio T. A. Effect of morphine

- on growth of metastatic colon cancer in vivo. *Arch Surg* 126: 454-56, 1991.
13. Bonn D. Morphine stimulates tumour growth. *Lancet Oncology* 3: 520, 2002.
 14. Sergeeva M. G., Grishina Z. V., Varfolomoyev S. D. Morphine effect on proliferation of normal and tumor cells of immune origin. *Immunol Lett* 36: 215-18, 1993.
 15. Gupta K. Kshirsagar S., Chang L., Schwartz R., Law P. Y. et al. Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth. *Cancer Res* 62: 4491-98, 2002.
 16. Gómez-Flores R. Rodríguez-Padilla C., Mehta R. T., Galán-Wong L., Mendoza-Gamboa E., Tamez-Guerra R. Nitric oxide and TNF- α production by murine peritoneal macrophages activated with a novel 20-kDa protein isolated from *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* parasporal bodies. *J Immunol* 158: 3796-99, 1997.
 17. Gómez-Flores R. Weber R. J. Increased nitric oxide and TNF- α production by rat macrophages following in vitro stimulation and intravenous administration of SNC 80. *Life Sci* 68: 2675-84, 2001.
 18. Nowak J. E., Gómez-Flores R., Calderón S. N., Rice K. C., Weber R. J. Rat NK cell, T cell, and macrophage functions following intracerebroventricular injection of SNC 80. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286:931-37.
 19. Conti A. Oncology in neuroimmunomodulation. What progress has been made? *Ann NY Acad Sci* 917: 68-83, 2000.
 20. Pacifici R., Di Carlo S., Bacosi A., Zuccaro P. Macrophage functions in drugs of abuse-treated mice. *Int J Immunopharmacol* 15: 711-16, 1993.
 21. Cameron D. J. Effect of neuropeptides on macrophage mediated cytotoxicity in normal donors and cancer patients. *Jap J Exp Med* 57: 31-39, 1987.
 22. Hagi K., Uno K., Inaba K., Muramatsu S. Augmenting effect of opioid peptides on murine macrophage activation. *J Neuroimmunol* 50: 71-76, 1994.
 23. Murgo A. J., Faith R. E., Plotnikoff N. P. 1999. Neuropeptides, cytokines, and cancer, interrelationships. In: (Plotnikoff NP, Faith RE, Murgo A. J., Good R. A., eds.). *Cytokines-Stress and Immunity*. Boca Raton, CRC Press. 1999, pp. 133-160.
 24. Suzuki S., Chuang L. F., Doi RH, Bidlack JM, Chuang RY: Kappa-opioid receptors on lymphocytes of a human lymphocytic cell line: morphine-induced up-regulation as evidenced by competitive RT-PCR and indirect immunofluorescence. *International Immunopharmacology* 1: 1733-42, 2001.
 25. Buchner R. R., Vogen S. M., Fischer W., Thoman M. L., Sanderson S. D., et al: Anti-human kappa opioid receptor antibodies: characterization of site-directed neutralizing antibodies specific for a peptide kappa R(33-52) derived from the predicted amino terminal region of the human kappa receptor. *J Immunol* 158: 1670-80, 1997.
 26. Blishchenko E. Y., Mernenko O. A., Mirkina II, Satpaev D. K., Ivanov V. S. et al: Tumor cell cytotoxicity mediated by valorphin, an opioid-like fragment of hemoglobin beta-chain. *Peptides* 18: 79-85, 1997.
 27. Iuvone T., Capasso A., D'Acquisto F, Carnuccio R: Opioids inhibit the induction of nitric oxide synthase in J774 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 975-80, 1995.
 28. Ordaz-Sánchez I., Weber R. J., Rice K. C., Zhang X., Rodríguez-Padilla C. et al: Chemotaxis of human and rat leukocytes by the delta-selective non-peptidic opioid SNC 80. *Rev Latinoamer Microbiol* 45: 14-23, 2003.
 29. Caballero-Hernández D., Weber R. J., Hicks M. E., Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C, Tamez-Guerra P., Rice K. C., Ananthan S., Gómez-Flores R., 2005. Potentiation of rat lymphocyte proliferation by novel non-peptidic synthetic opioids. *Int Immunopharmacol* 5: 1271-8, 2005.
 30. Calderon S. N., Rice K. C., Rothman R. B., Porreca F., Flippen-Anderson JL, Kayakiri H. et al: Probes for narcotic receptor mediated phenomena. 23. Synthesis, opioid receptor binding, and bioassay of the highly selective delta

- agonist(+)-4-[(alphaR)-alpha-((2S,5R)-4-Allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC 80) and related novel nonpeptide delta opioid receptor ligands. *J Med Chem* 40: 695-704, 1997.
31. Negus S. S., Gatch M. B., Mello NK, Zhang X., Rice K. Behavioral effects of the delta-selective opioid agonist SNC 80 and related compounds in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 362-375, 1998.
32. Hicks M. E., Gómez-Flores R., Wang C., Mosberg H, Weber RJ: Differential effects of the novel non-peptidic opioid 4-tyrosylamido-6-benzyl-1,2,3,4 tetrahydroquinoline (CGPM-9) on in vitro T lymphocyte and macrophage functions. *Life Sci* 68: 2685-94, 2001.
33. Klimp A. H., de Vries E. G., Scherphof G. L., Daemen T: A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev. Oncol/Hematol* 44: 143-61, 2002.
34. Kamada H, Tsutsumi Y, Yamamoto Y, Kihira T, Kaneda Y. et al: Antitumor activity of tumor necrosis factor-alpha conjugated with polyvinylpyrrolidone on solid tumors in mice. *Cancer Res* 60: 6416-20, 2000.
35. Gately M. K., Brunda M. J. The potential of interleukin-12 for use in cancer therapy. *Jap J Cancer Chemother* 23: 961-71, 1996.
36. Gough M. J., Melcher A. A., Ahmed A., Crittenden M. R., Riddle D. S., Linardakis E. et al. Macrophages orchestrate the immune response to tumor cell death. *Cancer Res* 61: 7240-7, 2001.

Recibido: 15 de abril de 2007

Aceptado: 15 de mayo de 2007