



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EL EFECTO DE LA INFLAMACIÓN DOLOROSA
Y NO DOLOROSA EN UN MODELO DE
PREFERENCIA DE SITIO CONDICIONADO A
MORFINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JOSÉ ISRAEL LUNA MENDOZA

DIRECTORA DE TESIS:

DOCTORA CLAUDIA GÓMEZ ACEVEDO



CIUDAD DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DE JURADO

1. Datos del Alumno

Luna
Mendoza
José Israel
55 39 84 6957
Universidad Nacional Autónoma
de México
Facultad de Ciencias
Biología
310237101

2. Datos del Tutor

Dra.
Claudia
Gómez
Acevedo

3. Datos del Sinodal 1

Dr.
Marco Antonio
Sotomayor
Sobrino

4. Datos del Sinodal 2

Dra.
María del Carmen
Miñana
Solís

5. Datos del Sinodal 3

M. en C.
Luis
Alejandro
Méndez
Cuesta

6. Datos del Sinodal 4

Dr.
Jorge Antonio
García
Alvarez

7. Datos del trabajo escrito.

El efecto de la inflamación dolorosa
y no dolorosa en un modelo de
preferencia de sitio condicionado a
morfina
p 70
2019

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que siempre estuvo ahí para apoyarme desde que decidí que quería hacer ciencia. A mis padres porque me han dado todo lo que he podido necesitar y en ocasiones incluso más. Papá, me has inspirado toda mi vida a seguir adelante, por todo lo que has logrado eres la persona que más admiro. Mamá, jamás podré terminar de agradecerte todo lo que me has enseñado en estos 24 años de vida y todo lo que viene por delante. Omar, admiro la pasión y terquedad que tienes por todo lo que haces, eres una de las personas más inteligentes y divertidas que conozco. A los 3 muchas gracias, esto jamás hubiera sido posible sin ustedes.

A Elizabeth, que si bien llegaste en la recta final de este proceso tu compañía y apoyo se sienten como si hubieras estado desde el principio.

A mis amigos Bruno, Daniel, Andrés, Isaac, Lucio, Romi, Aaron, Hilda, Cele, Caro, Luz, Lupe, Juan y Neto por los que están y los que ya no, gracias por todo.

A mis primos que son como hermanos.

A la Dra. Claudia por aceptarme en su laboratorio y en su casa. Por su invaluable ayuda en dar mis primeros pasos en el mundo de la investigación, muchas gracias.

Al Dr. Marco por ofrecerme ser parte de su investigación de la cual se desprendió esta tesis y cuyo apoyo ha sido fundamental para poder terminarla, con su ejemplo me ha enseñado no solo a dar mis primeros pasos en la ciencia, sino también a ser un científico e individuo con valores.

A la Dra. Miñana, por su paciencia al revisar este trabajo, sobre todo por las pequeñas pláticas y apoyo en cada sesión.

A mis sinodales por revisar, corregir y aconsejarme en este trabajo, agradezco infinitamente su tiempo y dedicación.

A todas y cada una de las personas que de alguna manera han formado parte de este largo camino.

A hombros de gigantes.

CONTENIDO

RESUMEN

PALABRAS CLAVE

1. LOS OPIOIDES	11
1.1. Usos clínicos de los opioides	12
1.2. Receptores opioides	13
1.3. La morfina	15
1.3.1. Farmacología de la morfina	16
1.3.2. Mecanismo de acción de la morfina	18
1.4. Sistema de recompensa	19
1.4.1. Efectos de los opioides en el sistema de recompensa	21
1.5. Adicción	21
1.5.1. Fisiopatología de la adicción	23
1.5.2. Adicción a opioides	25
1.5.3. Adicción a opioides: Incidencia a nivel mundial	27
1.5.4. Adicción a opioides: Incidencia en México	28
1.6. Inflamación, dolor y su relación con el sistema de recompensa	29
1.6.1. Mecanismos Neuro inflamatorios	30
1.6.2. Citocinas e interleucinas	31
1.6.3. Dolor	31
1.7. Modelos de adicciones: Preferencia de Sitio Condicionado	32
2. JUSTIFICACIÓN	34
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	36
5. MÉTODO	37
5.1. Diseño experimental	38
Prueba Conductual	
5.2. Condicionamiento de sitio	39
5.3. Habitación	39
5.4. Prueba de preferencia pre-condicionamiento	39
5.5. Condicionamiento	40
5.6. Prueba de preferencia post-condicionamiento	41

5.7.	Intervención quirúrgica	41
5.8.	Grupos experimentales	42
5.9.	Administración de fármacos antiinflamatorios	44
Medición de PGE2 en suero de sangre periférica		
5.10.	Toma de muestra sanguínea retro orbital	45
5.11.	Grupos análisis sanguíneo de PGE2	46
5.12.	Análisis sanguíneo de PGE2 - ELISA	47
5.13.	Análisis estadístico	51
6.	RESULTADOS	52
7.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	57
8.	PERSPECTIVA A FUTURO	61
9.	GLOSARIO	62
10.	BIBLIOGRAFÍA	63

RESUMEN

Estudios recientes sobre el sistema inmune han demostrado que la respuesta inmune no se encuentra limitada únicamente a la preservación del organismo ante patógenos o daño, además, esta respuesta es capaz de interactuar y alterar la función de otros sistemas como lo es el nervioso en el cual modifica conductas y estado de ánimo.

En el presente trabajo se evaluaron los efectos de la interacción entre el sistema inmune y el sistema nervioso central (SNC) en la respuesta conductual generada por la activación del sistema de recompensa en un modelo de condicionamiento clásico a morfina. Para realizar este trabajo usamos un modelo animal llamado preferencia de sitio condicionado en el cual las ratas respondían a la morfina después de la inducción de procesos inflamatorios de tipo doloroso y no doloroso.

En la inducción de inflamación se administró carragenina intraplantar (250, 500 y 750 μ L al 1%) en grupos experimentales con y sin sección del nervio ciático derecho. La sección del nervio ciático se realizó para determinar si el estímulo doloroso es necesario para la modificación de la respuesta de recompensa, o esto puede ser logrado únicamente con un estímulo inflamatorio en este modelo. Adicionalmente, y con fines comparativos, utilizamos la administración intraperitoneal del bacilo de Calmette-Guerin (BCG) como inductor de la respuesta mediante una vía inflamatoria diferente.

Finalmente se cuantificó la concentración de prostaglandina E2 en sangre periférica con el objetivo de comprobar si existe relación entre el cambio conductual y el aumento de concentración de esta molécula.

Nuestros resultados mostraron que tanto el modelo de inflamación por carragenina como el mediado por BCG son capaces de inhibir la preferencia de sitio condicionada a la morfina. Además, observamos que la administración de un inhibidor de COX (ibuprofeno 50 mg/kg, i.p.) restaura la preferencia de sitio en el primer modelo, sin embargo, no afecta la respuesta a morfina en ratas con inflamación inducida por la administración de BCG.

PALABRAS CLAVE

Morfina, adicción, recompensa, inflamación.

1. LOS OPIOIDES

Usados desde tiempos antiguos por culturas como la egipcia, la griega y la arábica para el manejo de las enfermedades gastrointestinales por su efecto constipante. Los opioides son fármacos de origen natural y sintético actualmente empleados en el manejo de dolor crónico y severo, y en algunos casos para la inducción del sueño (Fisher & A. Roget, 2009).

De acuerdo con la OMS (WHO, 2018) se consideran opioides a todas aquellas sustancias psicoactivas derivadas de la Amapola real (*Papaver somniferum*) o de cualquiera de sus análogos sintéticos con efectos similares. Dentro de este grupo de fármacos encontramos a la morfina, la heroína, el tramadol, la oxycodona y la metadona. Estos medicamentos usados de manera correcta tienen la capacidad de provocar efectos analgésicos, euforizantes y de recompensa en el paciente. mediante la unión a receptores específicos distribuidos a lo largo del organismo con mayores concentraciones en el encéfalo y la médula espinal denominados como receptores tipo *mu*, *delta* y *kappa* (Gendron, Cahill, von Zastrow, Schiller, & Pineyro, 2016).

En México los medicamentos opioides se encuentran dentro de los principales fármacos para el tratamiento de dolor peri o postoperatorio, dolor por trauma grave así como para pacientes bajo condiciones de dolor ocasionado por cáncer no maligno (Guevara-López *et al.*, 2007; Reyes Chiquete, Guillen Núñez, Alcázar Olan, & Arias Santiago, 2006).

En los últimos veinte años el esquema de administración de opioides ha sido modificado drásticamente, desde el plan de administración de corta duración al tratamiento de larga duración, razón por la cual la dosis diaria por paciente ha aumentado considerablemente con el fin de potenciar su efecto (Gomes, *et al.*, 2011).

El aumento en el uso de fármacos opioides se ha convertido en un problema médico y de salud pública significativo. En estudios recientes se ha demostrado que el incremento en

la administración de medicamentos de origen opioide está directamente relacionado con el aumento en el número de muertes ocasionadas por sobredosis de estos fármacos. Así como en la combinación con otras drogas como el alcohol y otros sedantes, incrementó el número de casos en un 85% entre los años 1999 y 2006 sólo en los Estados Unidos (Warner, Chen, & Makuc, 2009, Dunn *et al.*, 2010).

Así mismo, el aumento en la accesibilidad a fármacos de origen opioide y su consecuente incremento en el esquema de administración pueden inducir que el paciente desarrolle tolerancia a dichos fármacos. Esta es una de las mayores desventajas que presentan estos medicamentos dado que al perder el efecto analgésico aumenta el riesgo de que el paciente sufra sobredosis con el fin de obtener el efecto deseado (Trang *et al.*, 2015).

Tan solo en los Estados Unidos de las 28 647 muertes provocadas por sobredosis de fármacos de abuso el 61% está relacionada con algún tipo de medicamento de tipo opioide, siendo los fármacos para el manejo del dolor los más comunes en este tipo de decesos sólo igualados por las muertes causadas por sobredosis de heroína (Rudd, Aleshire, Zibbell, & Matthew Gladden, 2016). Dentro de los efectos negativos de la administración continua de estos fármacos es el desarrollo de hiperalgesia mediada por opioides (Trang *et al.*, 2015).

1.1. USOS CLÍNICOS DE LOS OPIOIDES

Los medicamentos de prescripción para el alivio del dolor son administrados con la intención de mejorar la calidad de vida de pacientes con dolor crónico causado por diversas enfermedades (Alexander, 2016) Dentro de los más efectivos actualmente usados son aquellos de origen opioide (Dowell, Haegerich, & Chou, 2016), razón por la cual en México y EU son los principales fármacos administrados a pacientes en cuidados paliativos (Secretaría de Salud de Mexico, 2010) y con dolor crónico no maligno (Dowell *et al.*, 2016). La prevalencia del dolor crónico a nivel mundial es del 26 al 29% por lo que se sugiere que en México al año 2010 (Harstall & Ospina, 2003) al menos 20 millones de individuos son afectados por dolor crónico (Guevara-López *et al.*, 2007).

Los opioides son clasificados de acuerdo a su potencia como al efecto de tipo agonista o antagonista que puedan desempeñar en el receptor opioide (OR), (Pathan & Williams,

2012). Se dividen en dos grupos principales: opioides “débiles” para el control de dolor medio a moderado y opioides “ fuertes” para el control del dolor de moderado a severo (World Health Organisation, 1996). Dentro de este último grupo se encuentra a la morfina, el opioide más comúnmente empleado en el manejo del dolor crónico asociado o no a metástasis (Klein & Greenfield, 1999; Wang *et al.*, 2018, Glare & Walsh, 2002).

1.2. RECEPTORES OPIOIDES

Ubicados en el Sistema Nervioso Central (SNC) y el Sistema Nervioso Periférico (SNP). En el SNC estos receptores se encuentran altamente concentrados en las regiones subcorticales del encéfalo como lo son el tálamo, el *locus cerúleo* (LC), el núcleo accumbens (NAc) y la amígdala (Oroszi & Goldman, 2004).

Los receptores opioides (ROs) son codificados por el gen OPRM1 localizado en el cromosoma 6q24-q25, y son miembros de la familia de los receptores acoplados a proteínas G. Los ROs son mediadores fundamentales en el funcionamiento de la mayoría de las hormonas y neurotransmisores. También se caracterizan por poseer siete dominios transmembranales, el segmento terminal N extracelular y el segmento intracelular C terminal.

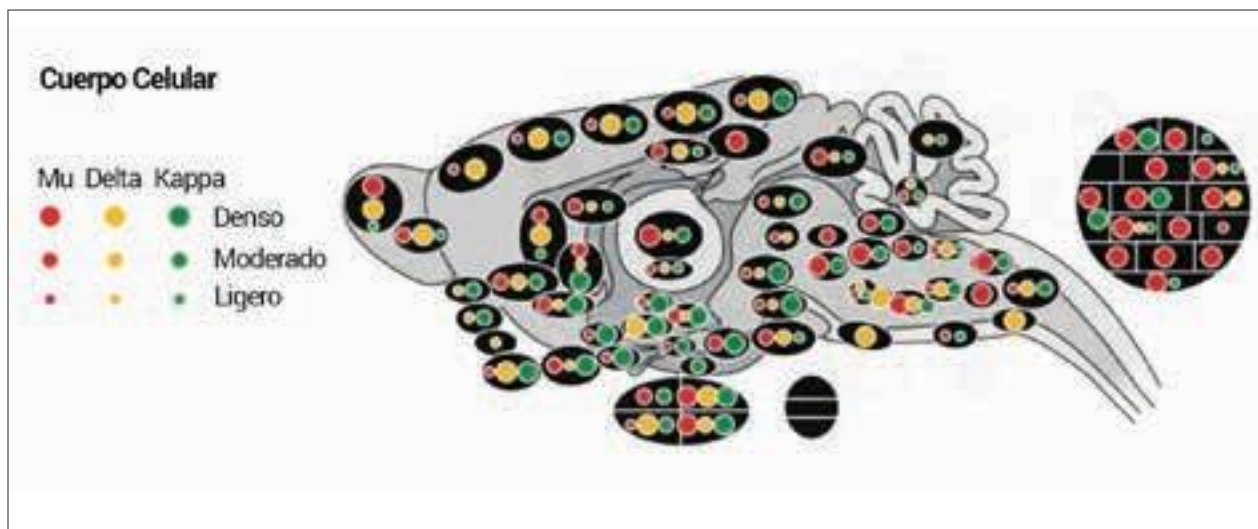


IMAGEN 1.1 Distribución de los receptores a opioides en el cerebro de ratona, tomada de Le Merrer, Becker, Befort, & Kieffer, 2009.

La existencia de estos sitios de unión a opioides fue reconocida en el año de 1973, (Le Merrer, Becker, Befort, & Kieffer, 2009). Estas uniones son reconocidas posteriormente como receptores a opioides (ROs) de los cuales existen 3 tipos principales: los receptores tipo mu (μ), delta (δ) y kappa (κ) (Gendron *et al.*, 2016). Las concentraciones de los receptores a opioides en cada área cerebral varían de manera sustancial. En el caso del receptor tipo μ se encuentra mayormente expresado en la amígdala, el tálamo y el mesencéfalo. El receptor tipo κ tiene mayores concentraciones en el prosencéfalo, incluidos el claustró y la corteza endopiriforme, el tubérculo olfatorio, el cuerpo estriado (putamen y núcleo accumbens), el área preóptica, el hipotálamo y la hipófisis. La concentración de los receptores de tipo δ es mayor en el tracto olfatorio, el neo córtex, en algunas regiones de la amígdala y especialmente en el cuerpo estriado (Le Merrer *et al.*, 2009).

La activación de la proteína G por medio de la unión de un péptido opioide al RO provoca que tanto la subunidad α , como la $\beta\gamma$ interactúen con diferentes sistemas celulares inhibiendo la adenil ciclasa y canales de calcio dependientes de voltaje. Así mismo provoca la reactivación de canales de potasio (K^+) y de la fosfolipasa CB (PLCB) (Waldhoer, Bartlett, & Whistler, 2004) lo que finalmente induce la reducción de la excitabilidad de la membrana celular produciendo una menor liberación de neurotransmisores como el glutamato y la sustancia P (Henriksen & Willoch, 2008, Almaraz, Manenschijn, Pena, & Viana, 2014).

El proceso de activación de los receptores opioides es capaz de provocar diversos efectos en la conducta del individuo como la euforia, ansiedad y de manera más importante analgesia, siendo el receptor tipo μ el principalmente involucrado en este último efecto. Razón por la cual estos receptores se han convertido en el principal objetivo de diversos fármacos analgésicos derivados de productos opiáceos (Peciña, Love, Stohler, Goldman, & Zubieta, 2015, Streicher & Bilsky, 2017, Gendron *et al.*, 2016).

A pesar de que la mayoría de los efectos benéficos y nocivos de los medicamentos opioides son mediados por los receptores tipo μ existe evidencia de que tanto los receptores tipo δ como κ generan una respuesta analgésica casi igual de efectiva a la generada por la activación de receptores μ (Kieffer & Gavériaux-Ruff, 2002).

Se ha observado en pacientes bajo el régimen de administración a largo plazo de medicamentos opioides el desarrollo de tolerancia y dependencia (World Health Organisation, 1996). Este proceso es mediado por 3 diferentes mecanismos principalmente la fosforilación del

receptor que produce la desensibilización de los mismos por medio del desacoplamiento de las proteínas G y la internalización o secuestro de los ROs lo que reduce la concentración de dichos receptores funcionales en la membrana celular. Junto con el mecanismo de internalización de ROs también se presenta la activación del proceso de inhibición de la síntesis de nuevos receptores opioides (Keith *et al.*, 1998, Varga *et al.*, 2003) estos dos últimos mecanismos están implicados directamente en la reducción de la concentración de receptores en la membrana celular de las neuronas e interneuronas (Droney *et al.*, 2008).

El desarrollo de tolerancia a estos fármacos causa que el efecto analgésico del mismo sea cada vez menor por lo que se vuelve necesario aumentar la dosis.

Sin embargo, la administración continua de opioides no causa sólo la disminución del efecto analgésico sino también el establecimiento del dolor mediado por opioides, hiperalgesia, alodinia y en algunos pacientes la dependencia psicológica a estos medicamentos lo que limita seriamente sus aplicaciones médicas a largo plazo (Peciña *et al.*, 2015).

1.3. LA MORFINA



IMAGEN 1.2 Estructura química de la morfina tomada de Christrup, 1997.

Nombrada en referencia al dios griego del sueño Morfeo por F. Serturmer quien la aisló a partir de la planta *Papaver somniferum* a principios de 1805 (Aragón-Poce *et al.*, 2002). Es un potente fármaco analgésico empleado de manera común en procedimientos quirúrgicos, postoperatorios y en pacientes con dolor tanto agudo como crónico, desde mediados del siglo XIX a la actualidad (Ochiai *et al.*, 2016, van Ree, Gerrits, & Vanderschuren, 1999). Este potente agonista opioide se une a diferentes receptores opioides específicos (Delta, mu y kappa) lo que resulta en diferentes respuestas cerebrales como lo son la analgesia, ansiolisis, euforia, sedación, depresión respiratoria y en el caso del sistema gastrointestinal, contracción del músculo liso (Drugbank, 2005).

La morfina es un pentámero alcaloide formada de 5 anillos condensados, lo que le confiere su estructura biológicamente inactiva. Sin embargo, los grupos funcionales de esta molécula como lo son el C3 fenólico, el alcohol secundario C6 y la amina terciaria formada por el átomo de nitrógeno (N) vuelven químicamente reactiva a esta molécula.

La morfina cuenta con dos grupos OH- hidrofílicos que le confiere la mediana hidrosolubilidad y la baja liposolubilidad (Christrup, 1997). Esta molécula es principalmente metabolizada en el hígado, sin embargo existe evidencia de que también sufre modificaciones metabólicas tanto en el encéfalo como en los riñones aunque en muy bajas cantidades (Wahlström, Winblad, Bixo, & Rane, 1988).

1.3.1. Farmacología de la morfina

En el hígado el fármaco sufre el proceso de glucuronidación que resultará en dos metabolitos principales: la morfina-3-glucurónido (M3G) que no presenta ningún tipo de actividad analgésica y de poca a nada actividad excitatoria y la morfina-6-glucurónido (M6G) que junto con la morfina permite el desarrollo de la respuesta analgésica y de recompensa. Este proceso metabólico es mediado por las enzimas del citocromo P450 así como por las enzimas UGT2B7 y UGT1A1 mientras que la primera se encuentra mayormente involucrada en la síntesis de M6G y la segunda presenta un papel menor en la catálisis la M3G (Smith, 2009).

El resultado de este proceso metabólico tiene repercusiones directas en la vida media de este fármaco, ya la morfina presenta unión a proteínas plasmáticas de entre el 45% y 50%, mientras que los productos metabólicos de la misma presentan un porcentaje de unión a proteínas plasmáticas de alrededor del 30% lo que provoca que una vida media corta de entre 1.8 a 3.4 horas dependiendo de la dosis, posteriormente el fármaco es excretado a través de la orina (Christrup, 1997). Es por esto que si se opta por la vía de administración subcutánea será necesaria que su administración sea llevada a cabo cada 4 horas con el fin de mantener el efecto analgésico (Guevara-lópez *et al.*, 2007).

La absorción de este medicamento varía de acuerdo al método de administración, siendo el más común la administración oral; en esta, la biodisponibilidad del fármaco

es del 30 al 40%. El efecto analgésico de una sola dosis es bastante reducido, sin embargo, con la administración continua se puede alcanzar el efecto deseado (Glare & Walsh, 2002).

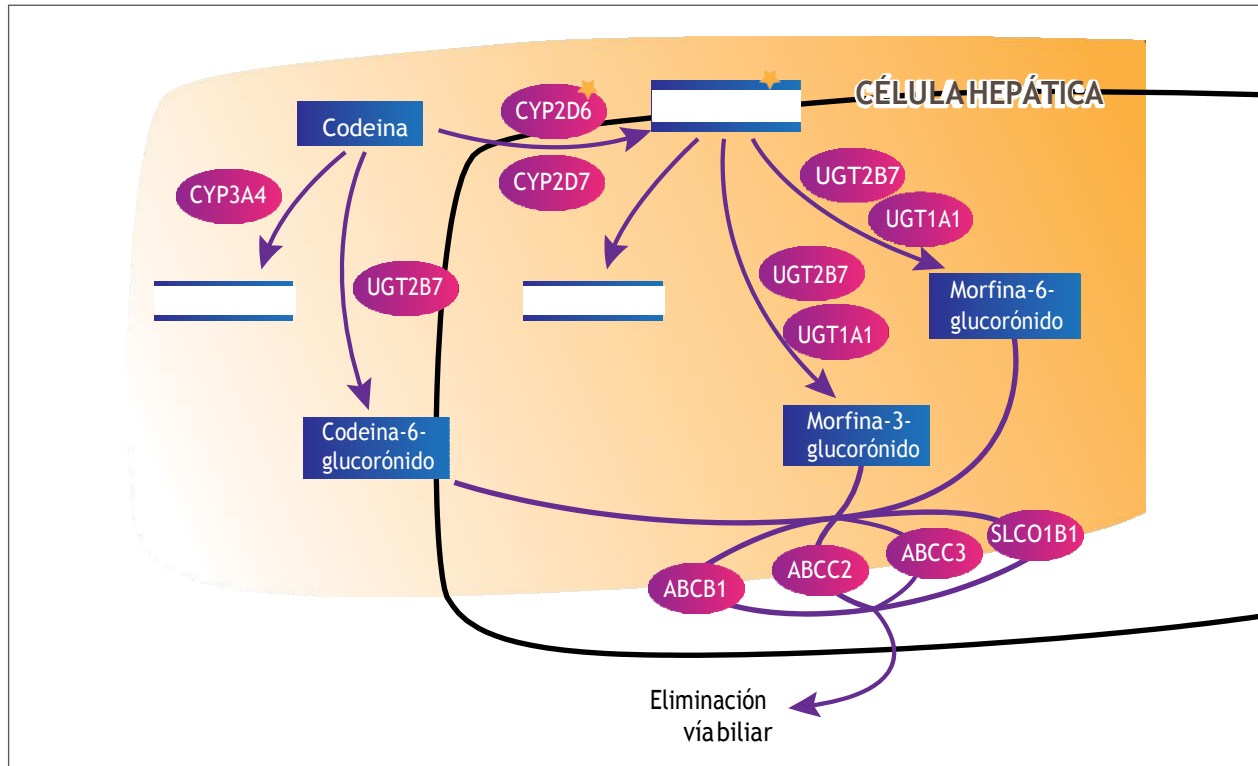


IMAGEN 1.3 Ruta metabólica de la morfina dentro de un hepatocito. Imagen modificada de Thorn *et al.*, 2009

En la administración sublingual de morfina, la biodisponibilidad del fármaco será sólo del 12% (Gong & Middleton, 1992). En contraste, la inhalación del mismo fármaco por medio de la nebulización la biodisponibilidad de la misma asciende hasta 63% (Dershwitz *et al.*, 2000).

Otra característica de los fármacos opioides y especialmente de la morfina y sus metabolitos es su distribución y capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). Se ha demostrado que la morfina presenta una amplia vida media cuando se encuentra en tejido cerebral debido a su redistribución dentro de dicho tejido (Bouw, Gårdmark, & Hammarlund-Udenaes, 2000). Así mismo se ha encontrado evidencia de que el metabolito M6G también es sintetizado directamente en el SNC y le confiere mayor índice de permeabilidad en comparación con el M6G sintetizado en el hígado (De Gregori *et al.*, 2012).

1.3.2. Mecanismo de acción de la morfina

Como se trató en el capítulo anterior en humanos la morfina es mayormente metabolizada por el hígado en dos metabolitos principales: el M3G y el M6G siendo el primero encontrado en mayores concentraciones debido a que del 90% de la morfina que es metabolizada el 50% es conjugada en este metabolito mientras que el segundo corresponde a aproximadamente el 15% de la concentración total (Yeh, Gorodetzky, & Krebs, 1977). Dichos metabolitos presentan diferentes rangos de permeabilidad al atravesar la barrera hematoencefálica. Sin embargo se ha demostrado que estas moléculas presentan elevada afinidad por los receptores opioides, en especial por los de tipo μ , teniendo una mayor afinidad por estos el metabolito M6G que aun presentándose en menores concentraciones produce el efecto analgésico mucho mayor debido a que a diferencia del M3G este tiene mayor probabilidad acumularse en el sistema nervioso central (SNC) al igual que una mayor afinidad por los receptores tipo μ muy similar a la de la morfina (Thorn, Klein, & Altman, 2009). Lo anterior también está relacionado con el desarrollo de tolerancia y desensibilización de los receptores de tipo μ a la morfina (Christrup, 1997; Shimomura *et al.*, 1971). A pesar de los posibles efectos perjudiciales del M6G su eficiencia analgésica supera incluso a la de la morfina debido a la inducción de la depresión respiratoria es mucho menor al provocado por el fármaco parental (De Gregori *et al.*, 2012).

Uno de los mecanismos más aceptados de los fármacos opioides en la generación de recompensa es el de la unión de M3G y M6G a los receptores tipo μ de las interneuronas ubicadas en la sección del mesencéfalo. Esto induce la disociación de las proteínas G acopladas a dichos receptores en las subunidades $G\alpha$ y la $G\beta\gamma$, estas eventualmente producirían la inhibición de la 3'5' adenilil ciclase (cAMP) por su interacción con diferentes canales iónicos como los canales de K^+ , Ca^{2+} , (Herlitze *et al.*, 1996).

La regulación de los canales iónicos en respuesta generará la disminución en la secreción de GABA en dirección a las neuronas Dopaminérgicas del mesencéfalo lo que incrementa la liberación de dopamina en la zona más exterior del NAc, así como en la corteza prefrontal (Di Chiara & Bassareo, 2007; Hnasko, Sotak, & Palmiter, 2005).

1.4. SISTEMA DE RECOMPENSA

Este sistema consiste en extensas vías neuronales que median la conducta de recompensa, como el placer y la motivación. Así mismo sirve para promover que el comportamiento del organismo se dirija hacia conductas que normalmente son beneficiosas y promueven la supervivencia del individuo como por ejemplo el apetito, la sed, la reproducción, así como el evitar estímulos dañinos. El sistema de recompensa es capaz promover el aumento de la frecuencia de determinadas conductas al provocar sensaciones positivas como el placer y la recompensa, que, cuando se encuentran asociadas al aprendizaje a través de la experiencia pueden funcionar como promotor de la repetición de dichas conductas. Este proceso también se puede denominar como refuerzo positivo (Naranjo, Tremblay, & Busto, 2001; Salamone, Correa, Farrar, & Mingote, 2007).

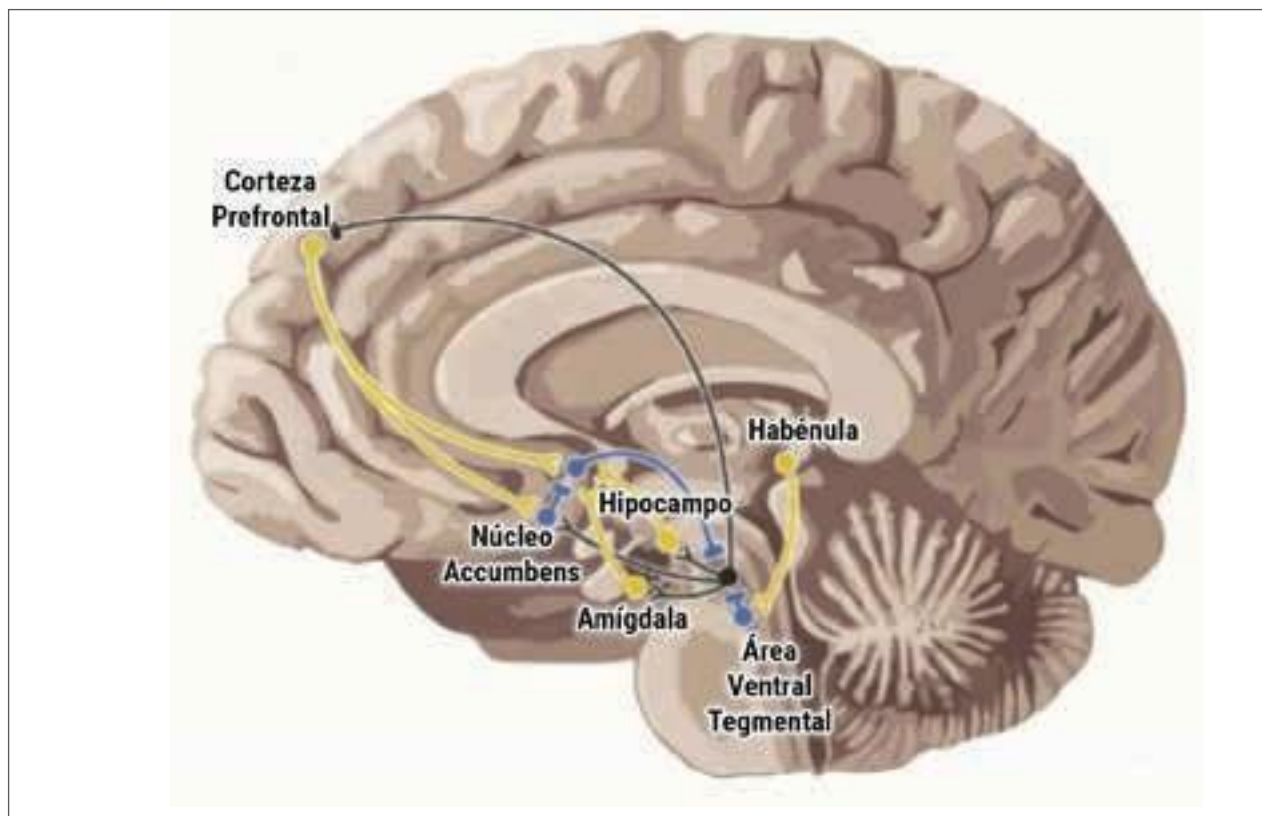


IMAGEN 1.4 Esquema del sistema de recompensa simplificado en humanos. Líneas negras indican sinapsis aferentes dopaminérgicas, líneas azules indican proyecciones GABAérgicas desde el NAC a neuronas dopaminérgicas; Líneas amarillas indican proyecciones aferentes glutamatergicas de la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala hacia el NAC. Imagen modificada de Swardfager y Rosenblat, 2016.

Para el desarrollo de las conductas anteriormente descritas el sistema de recompensa necesita de la secreción de diferentes neurotransmisores. Entre los cuales destaca la dopamina. Este neurotransmisor está involucrado en muchos más procesos neuronales como la motivación y el control del movimiento, así como en numerosas patologías como la enfermedad de Parkinson la esquizofrenia y la depresión. Además es el más comúnmente citado cuando se quiere hablar del proceso de recompensa dada su importancia en el establecimiento de sensaciones positivas (Salamone *et al.*, 2007).

En el sistema de recompensa la Dopamina (DA) actúa naturalmente por medio de la interacción con receptores acoplados a proteínas G que una vez activadas inician la cascada de activación neuronal que desemboca en el reforzamiento de una conducta específica por el establecimiento de la recompensa (Cooper, Robison, & Mazei-Robison, 2017; Salamone *et al.*, 2007; Sesack, Carr, Omelchenko, & Pinto, 2003).

El sistema de recompensa está constituido por diversas estructuras cerebrales, los principales componentes de este circuito son el Área Ventral Tegmental (VTA) ubicándose en dicha zona una gran concentración de células dopaminérgicas. El NAc, el tubérculo olfatorio, la amígdala, la corteza insular y frontal, así como la conexión dopaminérgica entre el VTA y el prosencéfalo. Este circuito hace uso de diversos neurotransmisores para interactuar entre sí como lo son el GABA, el glutamato y la serotonina (Koob & Le Moal, 2001). Sin embargo, uno de los principales componentes para la activación del sistema de recompensa es el neurotransmisor dopamina. Diversos estudios han indicado el sistema dopaminérgico proyectado desde el VTA hacia el NAc y otras secciones de la corteza frontal y límbica es el principal sustrato de recompensa y refuerzo tanto de estímulos de recompensa y aversión naturales como de los fármacos de abuso (Hyman & Malenka, 2001).

Como se mencionó anteriormente la activación del sistema de recompensa esta mediada por la aparición de un estímulo de naturaleza gratificante o nociva, ya sea este anticipado o no, en caso de que se presentara un estímulo de esta naturaleza las neuronas dopaminérgicas ubicadas en el VTA son activadas, y en el caso del estímulo sea repetido de manera constante, la activación de dichas neuronas puede ser modificada en orden de anticipar el estímulo. A su vez esto promueve el establecimiento de aprendizaje, en el caso de que el estímulo sobre el sistema de recompensa sea de naturaleza nociva las mismas neuronas pueden ser inhibidas en su activación; lo que establece, al igual que en presencia

de un estímulo gratificante, anticipación y posteriormente el proceso y establecimiento de aprendizaje y memoria (Morales & Margolis, 2017). Sin embargo, el funcionamiento de este sistema puede ser alterado por la presencia de fármacos de abuso como aquellos de origen opioide.

1.4.1. Efectos de los opioides en el sistema de recompensa

La dopamina y el VTA son esenciales para la activación de la respuesta de recompensa y refuerzo, así mismo, son de vital importancia para mediar las cualidades de reforzamiento de los fármacos de origen opioide. La interacción de la morfina y sus respectivos péptidos opioides con los receptores de tipo μ promueve el disparo de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra que a su vez refuerza la conducta de recompensa (Bloom, 1988).

La interacción de la morfina con otras secciones del sistema de recompensa provoca la inhibición de liberación del neurotransmisor GABA por medio de la interrupción de la secreción de Óxido Nítrico (NO) por parte de la neurona receptora, inhibiendo de esta manera la cascada de señalización que finalizará en la secreción del inhibidor, este efecto puede ser observado a partir de las primeras dos horas a partir de la administración del fármaco y tiene una duración de hasta 5 días. Este mecanismo de interacción de los opioides con el sistema de recompensa es parte fundamental para el establecimiento de la adicción a estos fármacos (Nugent, Niehaus, & Kauer, 2009; Nugent, Penick, & Kauer, 2007).

1.5. ADICCIÓN

La adicción o dependencia psicológica es definida como la enfermedad neurobiológica crónica influida por factores genéticos, psicosociales y ambientales en la que están involucrados la conducta de recompensa, motivación y memoria (Smith, 2012). Este proceso biológico puede ser simplificado a términos de un agente biológico (Fármaco de abuso) que actúa sobre determinado sustrato biológico (SNC) durante un periodo definido de tiempo (Nestler & Aghajanian, 1997).

Esta afección ha sido determinada como un desorden impulsivo compulsivo que funciona en un ciclo de 3 estados por los que pasa el afectado: la anticipación, intoxicación reflejada por la activación del sistema dopaminérgico y opioide, la abstinencia o efecto negativo relacionado con el decremento en la función de los sistema antes mencionados así como la mayor activación de sistemas relacionados con el estrés como lo es el aumento en la secreción de factor liberador de corticotropina (CRF) (Koob & Le Moal, 2001, 2008).

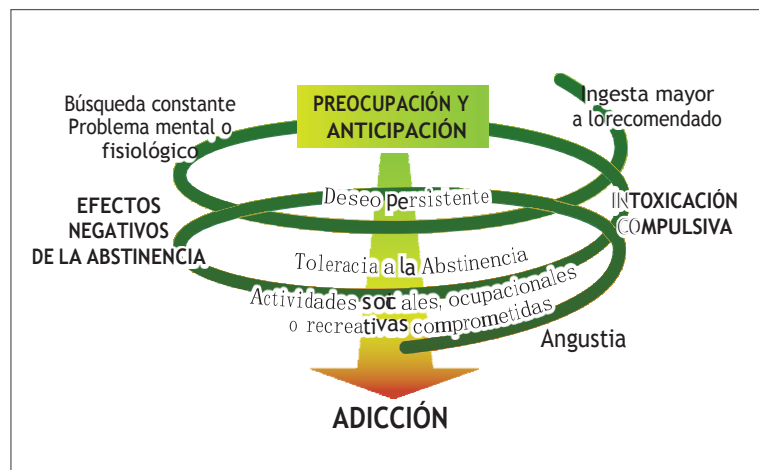


IMAGEN 1.4 Diagrama descriptivo del ciclo de la adicción desde la perspectiva psiquiátrica tomado de Koob, 2001.

Esta enfermedad se caracteriza por la incapacidad de mantener la abstinencia de manera consistente, el deseo por el objeto/sustancia adictiva, sin importar las consecuencias negativas que esta conducta acarrea consigo como el deterioro de las relaciones interpersonales. Igualmente se desarrolla una respuesta emocional disfuncional (disforia, ansiedad e irritabilidad) cuando no puede acceder al fármaco, al igual que otras enfermedades crónicas la adicción presenta ciclos tanto de remisión como de recaída (Statement, 2011).

Los fármacos adictivos son considerados tanto gratificantes (dado que son interpretados por el cerebro como un estímulo positivo) como reforzadores (las conductas relacionadas con la toma y uso de estos fármacos suele repetirse) (Hyman & Malenka, 2001). Estas sustancias pueden ser identificadas por su capacidad de inducir la liberación de dopamina en el sistema de recompensa, por lo que el consumo repetitivo de alguna sustancia de este tipo puede resultar en modificaciones sinápticas y moleculares relacionadas de manera directa con el proceso de aprendizaje (Berke & Hyman, 2000) lo que provoca que controlar el consumo del fármaco adictivo en cuestión sea más difícil de manejar por el paciente, debido a que desarrolla dependencia al mismo.

Las alteraciones del correcto funcionamiento de los circuitos neuronales previamente mencionados resultarán en el desarrollo de adicción al fármaco de abuso empleado, lo que a su vez conllevará el establecimiento de conductas como tolerancia, desensibilización y dependencia al fármaco. En el caso de la dependencia. La interrupción de la toma del mismo provocará la aparición de síntomas de abstinencia, de orden tanto fisiológico como psicológico, dentro de estos síntomas se puede presentar disforia, malestar generalizado, irritabilidad y modificación en los patrones de sueño (Koob & Le Moal, 2008).

1.5.1. Fisiopatología de la adicción

El desarrollo de la dependencia por cualquier droga de abuso aun bajo diferentes mecanismos de acción está fuertemente ligado con la generación de diversas modificaciones estructurales y moleculares en el SNC dentro de las cuales la principal es el incremento en la secreción de dopamina en la vía dopaminérgica mesolímbica,

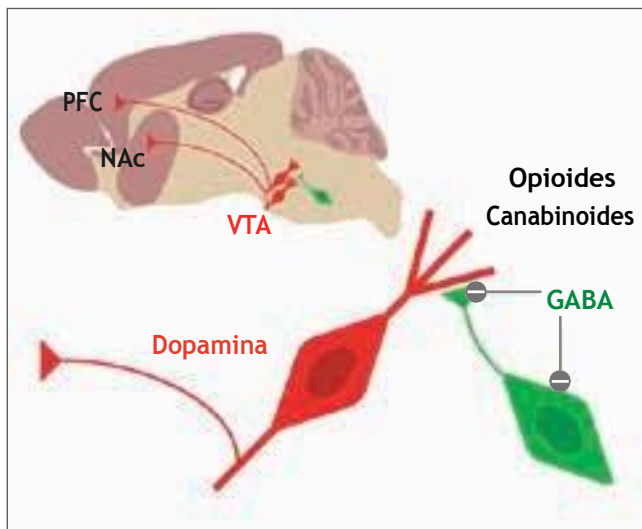


IMAGEN 1.5 Esquema de la interacción entre fármacos de abuso y el sistema mesolímbico, en el caso específico de los opioides se observa su actividad inhibitoria en las interneuronas GABAérgicas. Tomada de Lüscher 2011.

especialmente en el NAc (Di Chiara & Imperato, 1988). Así como modificaciones moleculares en neuronas dopaminérgicas presentes en el VTA que a su vez promoverá la aparición de conductas compulsivas de búsqueda y autoadministración del fármaco en cuestión (Nugent, Niehaus, & Kauer, 2009).

Como se mencionó anteriormente las modificaciones en la sinapsis de las neuronas del sistema de recompensa son causadas por la alteración de sistemas normales en el circuito de la recompensa por parte del uso continuo del fármaco de abuso como es el caso de la transmisión excitatoria. En él se presenta la modificación en la proporción

entre receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA). Los primeros receptores para el neurotransmisor Glutamato y los segundos para GABA, lo que induce el aumento de AMPA y la reducción en NMDA causando así una menor regulación del impulso excitatorio (Lüscher, & Malenka, 2011). Este aumento en la intensidad de las sinapsis

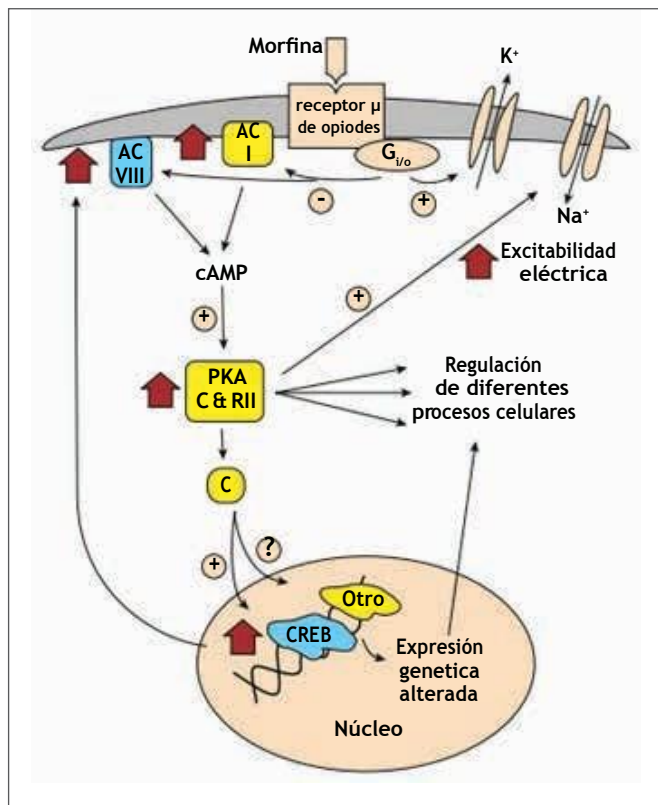


IMAGEN 1.6. interacción de fármacos de origen opioide (morfina) con el LC tomada de Nestler & Aghajanian, 1997.

excitatorias fue relacionado de manera inicial con el consumo de cocaína. Sin embargo, se ha demostrado que el uso de otros fármacos como lo son la morfina, la nicotina, el etanol y los benzodiazepinas también exhiben este efecto aunque sean mediados por diferentes mecanismos de acción (Saal, Dong, Bonci, & Malenka, 2003).

Una de las modificaciones moleculares a causa del abuso de fármacos mejor estudiada es la regulación positiva de la expresión de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) causado por el abuso de opioides. En este proceso la exposición aguda a opioides bloquea la expresión de cAMP en diversas neuronas. Sin embargo, si el paciente es administrado con opioides de manera continua esta exposición crónica provocará la activación de sistemas compensatorios de

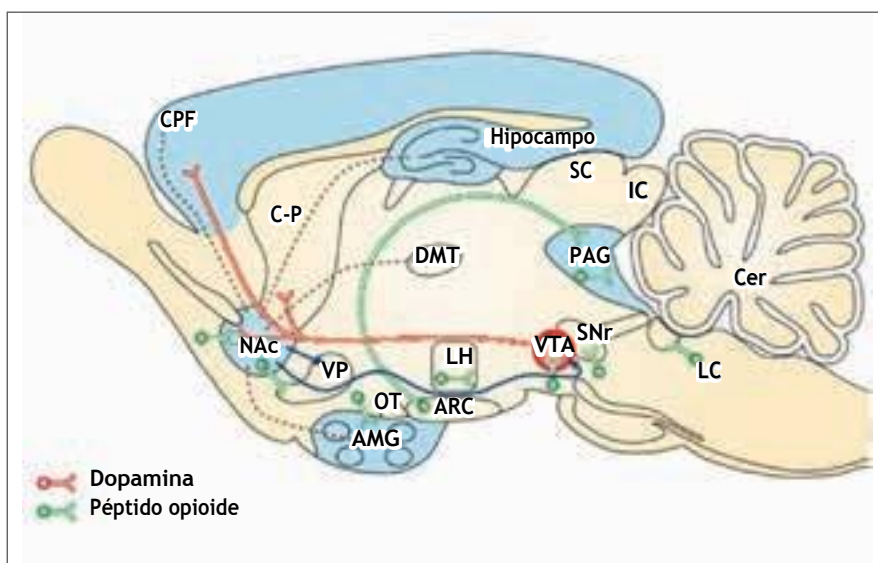


IMAGEN 1.7. Circuitos clave del sistema de recompensa en la adicción. Líneas punteadas indican aferencia del NAC, líneas azules indican eferencia al NAC en cerebro de ratón. Tomada de Nestler, 2001.

cAMP, ya que ocurre la sobre expresión de las adenil ciclasas tipo I y VIII que a su vez promueven la actividad de proteína quinasa A, lo que aumenta la fosforilación de diversas moléculas, como el CREB (*cAMP response element-binding* en inglés) que causa modificaciones fenotípicas en las neuronas afectadas. En el caso específico de las neuronas del LC esta compensación de cAMP está ligada al incremento en el índice de disparo de la neurona, mediado por canales catiónicos no selectivos. Este aumento en el disparo de impulsos contribuye al establecimiento de la dependencia y tolerancia al fármaco opioide, una vez retirada la administración del opioide, estas modificaciones son consideradas irreversibles (Nestler & Aghajanian, 1997).

En el NAc este mismo mecanismo está relacionado con la atenuación del circuito de recompensa, junto con el aumento de la expresión de cAMP. Este proceso es mediado también por la sobre expresión de la dinorfina. En condiciones normales esta molécula tiene como función el decremento de dopamina liberada en el NAc por medio de su interacción con los RO tipo κ . Sin embargo, la exposición a opioides produce la sobre expresión de esta molécula lo que aumenta la recaptura de dopamina libre y en consecuencia la aparición de síntomas del síndrome de abstinencia como la disforia al ser detenida la administración del fármaco (Nestler, 2001).

Otro mecanismo asociado con el aumento en la síntesis de cAMP es la secreción de prostaglandinas y su interacción con el subgrupo de los receptores de la familia de receptores acoplados a proteínas G denominado como receptores de prostaglandinas (EPRs). La activación del EPR tipo dos por la unión con prostaglandina E2 provoca el aumento de la síntesis de cAMP, especialmente en las terminales presinápticas de las células neuronales (Narumiya, Sugimoto, & Ushikubi, 1999).

1.5.2. Adicción a opioides

Los opioides son considerados como la droga clásica de abuso, dentro de las conductas clásicas presentadas por los usuarios de estos fármacos podemos encontrar la autoadministración intravenosa, parietal y respiratoria. El uso indebido de estos fármacos se encuentra directamente relacionado al desarrollo de tolerancia, incremento en la dosis autoadministrada, disforia y al detener el consumo del fármaco el desarrollo de síndrome de abstinencia.

Así mismo el abuso de estos fármacos, en especial de morfina en años recientes ha provocado el aumento en la mortalidad causada por sobredosis, principalmente en América, el este de Europa y África del sur (Nielsen *et al.*, 2016).

La administración continua de medicamentos de origen opioide trae consigo efectos negativos para el paciente como lo son la desensibilización que impide al paciente poder desarrollar la respuesta analgésica, la depresión respiratoria que limita el uso de estos fármacos en pacientes con desórdenes respiratorios como la apnea del sueño y obstrucción pulmonar crónica. Además de ser de las principales causas de muerte en pacientes con sobredosis de estos fármacos (Zhang, Xu, Zhang, & Liang, 2007) y la dependencia psicológica o adicción a estos fármacos. Este último efecto se ve reflejado al ser detenida la administración del medicamento y dado que el sistema opioide endógeno es parte principal en el control y regulación del estado de ánimo y bienestar es justo asumir que la modificación de este sistema por parte de la administración de medicamentos opioides es una causa principal del desarrollo de la adicción (Contet, Kieffer, & Befort, 2004).

Se ha demostrado en ratas que aquellos individuos adictos a morfina o derivados presentan alteraciones conductuales importantes como la preferencia por el fármaco sobre la interacción social (Tomek, Stegmann, & Olive, 2018).

Otro efecto negativo ligado a la administración crónica de los medicamentos de origen opioide es la generación de sensaciones dolorosas anormalmente intensas, caracterizadas por la aparición de dolor ante estímulos no dolorosos (alodinia) y la respuesta exagerada a estímulos dolorosos (hiperlagesia). Estos síntomas se hacen presentes tras repetidos periodos de abstinencia al fármaco (Vanderah, Ossipov, Lai, Malan, & Porreca, 2001).

La dependencia a los fármacos de origen opioide se caracteriza por la continua búsqueda y administración de los mismos en dosis cada vez mayores con el fin de prevenir el desarrollo de los síntomas de abstinencia. Sin embargo se ha encontrado que existen casos de pacientes que aun superada la dependencia física presentan dependencia emocional a los mismos, por lo que se considera que existen diferentes áreas del SNC involucradas en el desarrollo y el mantenimiento de la conducta de adicción y dependencia (Morales & Margolis, 2017; Nestler, 1996).

A pesar de que el mecanismo del desarrollo de tolerancia a fármacos opioides permanece sin una definición precisa se encuentra relacionado con la internalización y la disminución en la síntesis de RO's tipo μ así como el aumento en la expresión de diversas moléculas como el cAMP en estructuras del sistema de recompensa (Varga *et al.*, 2003; Waldhoer *et al.*, 2004).

1.5.3. Adicción a opioides: Incidencia a nivel mundial

Como fue mencionado al inicio de este trabajo, el esquema de uso de los opioides ha cambiado drásticamente en la última década aumentando considerablemente su uso para el manejo del dolor desde moderado a crónico, esto a su vez ha contribuido al aumento de muertes causadas por sobredosis de estos fármacos (Dunn *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2011; Warner *et al.*, 2009).

Durante el año 2013 el uso de fármacos de origen opioide estuvo involucrado en la muerte de 16,235 individuos sólo en los E.U. cifra que sobrepasó ese año a las muertes ocasionadas por el consumo de cualquier otra droga lícita o ilícita del mismo país (Alexander, 2016). En el año 2014 se encontró que el número de pacientes de ambos sexos hospitalizados por intoxicación por opioides llegó a los 53,000 individuos, mientras que las muertes ocasionadas por la sobredosis de dichos fármacos alcanzó la cifra de 33,091 pacientes de los cuales 15,281 estaban bajo el esquema de uso de opioides de prescripción (Services & Control, 2017). En este mismo año se reportó que de cada cuatro casos de sobredosis por fármacos de prescripción uno era de pacientes bajo un régimen de uso de medicamentos de origen opioide. En este mismo trabajo se encontró que pacientes bajo regímenes de administración de larga duración de fármacos opiáceos tienen mayor probabilidad de sufrir una sobredosis involuntaria en comparación con pacientes que reciben tratamientos de corta duración (Miller *et al.*, 2015).

Así mismo se reportó en el año 2015 que los medicamentos opioides son una de las principales causas de muerte en el Reino Unido estando implicados en el 26.7% de los casos de muerte ocasionados por sobredosis (Corkery *et al.*, 2013). Con un vertiginoso aumento del 107% entre los años 2012 y 2015 (Middleton, McGrail, & Stringer, 2016).

De acuerdo al *European Monitoring Centre For Drugs and Drug Addiction* en la Unión Europea (EMCDDA) en el año 2015 existían 1.3 millones de individuos catalogados como usuarios de opiáceos de alto riesgo así como el aumento en el número de víctimas, que, de acuerdo con la EMCDDA representan un incremento del 6% con respecto al año anterior afectando principalmente a individuos de 35 a 39 años (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2017).

1.5.4. Adicción a opioides: Incidencia en México

Al igual que en otros países, en México los fármacos de origen opioide son parte vital para el tratamiento de pacientes con dolor moderado, agudo o crónico. Incluso para el manejo del dolor en pacientes infantiles, la terapia farmacológica formada por la administración de fármaco referente opioide + paracetamol + AINEs es una de las usadas (López-Guzmán, *et al.*, 2013).

De igual manera en un estudio realizado en 2006 (Reyes Chiquete *et al.*, 2006) se encontró que de la muestra de 952 pacientes hospitalizados en cuidados oncológicos el 40% de ellos fueron tratados con algún medicamento opioide para el manejo del dolor por cáncer.

De acuerdo con la encuesta nacional de adicciones del 2002 se encontró que los fármacos de origen opioide se encuentran entre los fármacos vendidos ilegalmente sin receta médica más usados, principalmente en las zonas urbanas de la sección norte del país, el uso de estos fármacos abarca grandes sectores de la población tanto jóvenes como adultos. En este mismo trabajo se indicó que la mayoría de los usuarios de estos fármacos los obtienen de manera ilícita en primer lugar a través de los mismos médicos y en segundo lugar por medio de conocidos o familiares (CONADIC, 2012).

En los últimos años en México y el consumo de medicamentos de origen opioide se ha convertido en un verdadero problema de salud debido a que se estima que cerca del 37% de los consumidores de estos fármacos a nivel mundial se encuentran en esta región, con una prevalencia del 1.9% entre la población que va de los 15 a los 64 años (Villatoro-Velázquez *et al.*, 2012).

Sin embargo, no existen datos del número de muerte ocasionadas por la sobredosis de morfina u otros fármacos de origen opioide.

1.6. INFLAMACIÓN, DOLOR Y SU RELACIÓN CON EL SISTEMA DE RECOMPENSA

Existe evidencia de que la activación de la respuesta inmune ante procesos tanto de infección como autoinmunes presenta interacciones con procesos neuro-endocrinos, neurales y de comportamiento (Swardfager *et al.* 2016). Así mismo se ha demostrado que la respuesta inflamatoria caracterizada por la presencia de citocinas pro-inflamatorias como la interleucina-1 α (IL-1 α), Interleucina1-B (IL-1B), la Interleucina -6 (IL-6), y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) está relacionada con el desarrollo y la perpetuación de conductas depresivas, de igual manera se ha demostrado en primates no humanos que la exposición a estímulos pro-inflamatorios como las interleucinas propician la aparición de estados de ánimo negativos como tristeza, ansiedad y anhedonia a estímulos previamente gratificantes (Eisenberger *et al.*, 2010; Felger *et al.*, 2016; Yirmiya, 1996).

Estas alteraciones en la función del sistema de recompensa como lo es la disminución en la secreción de dopamina inducida por citocinas en homínidos humanos bajo regímenes de administración de factores pro inflamatorios, se observaron en experimentos realizados con macaco Rhesus (*Macaca mulatta*). La administración crónica de Interferón α (INF- α) llevó a estos individuos a presentar la conducta de “acurrucamiento” o “amontonamiento” ligada a síntomas depresivos en estos primates, así como a la reducción de metabolitos de la dopamina como el ácido homovanílico (Capuron *et al.*, 2015); por otro lado se ha encontrado que pacientes con depresión exhiben un aumento en las concentraciones de citocinas pro-inflamatorias en sangre periférica (Felger *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente la respuesta inflamatoria causada por un proceso de infección también tiene efectos en la conducta y estado de ánimo del paciente. Se ha demostrado con múltiples modelos en los que al sujeto experimental se le administra algún polisacárido de origen bacterianos o la directa inoculación de microorganismos como es el caso del uso del Bacilo de Calmette-Guerin (BCG) lo que lleva a la activación del sistema inmune resultado en el estado de inflamación sistémica (Swardfager, Rosenblat, Benlamri, & McIntyre, 2016).

Dentro de la respuesta inflamatoria también existen otras moléculas liberadas en respuesta a estímulos inflamatorios como las prostaglandinas que pueden alterar el funcionamiento del sistema de recompensa, como la prostaglandina E2. Estas moléculas han sido relacionadas con la generación de conductas depresivas, modificación del estado de ánimo y alteraciones negativas en la memoria, estas últimas observadas en experimentos con ratones en las que debían realizar tareas específicas como encontrar la plataforma en el laberinto acuático de Morris (Hein & O'Banion, 2009).

Al igual que la inflamación, el dolor también desempeña un papel importante en la alteración del sistema de recompensa. Se ha demostrado que la presencia de dolor crónico influye en el decremento en la secreción y concentraciones de Dopamina en el NAc por medio de la activación de la microglía en el VTA por medio de la alteración de la activación de neuronas GABAérgicas localizadas en esta estructura (Taylor *et al.*, 2015).

1.6.1. Mecanismos Neuro inflamatorios

La neuroinflamación puede ser definida como la infiltración de células del sistema inmune en el tejido del SNC o SNP en respuesta al daño. La activación de estas células lleva a la liberación de moléculas pro-inflamatorias en el tejido del área afectada lo que llevará al aumento de la cascada inflamatoria aún sin la presencia de más células inmunes o de infección crónica (DeLeo & Yezierski, 2001).

Cuando existe activación por parte de las células gliales a causa de la infiltración de un patógeno o daño tisular estas secretan diferentes moléculas proinflamatorias en el SNC como las citocinas, de igual manera estimula la síntesis de prostaglandinas proinflamatorias por parte del tejido endotelial. En el caso del aumento de la secreción de la Interleucina 1 (IL- 1) provocará una mayor activación de las células gliales. El aumento de permeabilidad de la Barrera Hematoencefálica (BHE) propicia la infiltración de más células inmunes, esto a su vez provoca la estimulación de las células endoteliales en el sistema vascular cerebral lo que desemboca en la secreción de prostaglandinas potenciando así la respuesta inflamatoria (Hein & O'Banion, 2009).

1.6.2. Citocinas e interleucinas

Las citocinas son proteínas no estructurales cuyo peso molecular varía de 8kDa a 40kDa. Involucradas principalmente en la respuesta del individuo a patógenos o daño tisular, así mismo su expresión es específica a estos eventos (Dinarello, 2000).

Las citocinas son clasificadas de acuerdo a su actividad biológica, dado que existen dos grupos principales: las citocinas proinflamatorias y las anti-inflamatorias. Dentro de este primer grupo podemos encontrar a la IL-1, la Interleucina-2 (IL-2), a la IL-6, la Interleucina-7 (IL-7), el IFN- γ y el TNF- α . En el grupo de las citocinas antiinflamatorias encontramos a la Interleucina-4 (IL-4), a la Interleucina-10 (IL-10), la Interleucina-13 (IL-13) y al Factor Transformador de Crecimiento β (TGF β). Ambos grupos son necesarios para mediar la respuesta inflamatoria en las regiones afectadas ya sea por daño tisular o por infección de patógenos así como para la correcta cicatrización del tejido (Oliveira, Kimiko Sakata, Machado Issy, Roberto Gerola, & Salomão, 2011).

1.6.3. Dolor

El dolor está definido como una experiencia desagradable sensorial y emocional asociada a daño tisular real o potencial y descrito en términos del mismo daño (Loeser *et al.*, 2011).

En el caso de la relación entre el uso de los medicamentos de origen opioide y el manejo del dolor estos fármacos son administrados principalmente a pacientes que sufren de dolor crónico que de acuerdo a la *International Association for the Study of Pain* está definido como aquel dolor que persiste pasado el tiempo normal de recuperación del tejido dañado, siendo el mismo de aproximadamente 3 meses (International Association for the Study of Pain, 1986).

Al experimentar dolor de tipo crónico causado por daño o inflamación diversos mecanismos químicos y neurales del paciente sufren de alteraciones lo que resulta en cambios en su funcionamiento, como es el caso de modificaciones en conductas

relacionadas al sistema de recompensa. Existe evidencia en experimentos con roedores que indica que el dolor neuropático está relacionado con una disminución de la síntesis y liberación de dopamina en el área ventral tegmental lo que lleva al desarrollo de síntomas depresivos y disminución en la motivación (Mitsi & Zachariou, 2016).

1.7. MODELOS DE ADICCIONES: PREFERENCIA DE SITIO CONDICIONADO

Cuando se habla de recompensa y adicción en humanos el individuo usualmente asocia estos estímulos con sentimientos agradables o de felicidad. Sin embargo, al trabajar con otros modelos animales determinar estas sensaciones no es posible por lo que es necesario basarse en la respuesta motriz y conductual del mismo. Así mismo, al igual que en los humanos, diferentes estímulos sociales o ambientales se encuentran asociados con el desarrollo de esta enfermedad (Ciccocioppo, Sanna, & Weiss, 2001).

Sin embargo, no existe modelo que sea capaz de representar el extenso abanico de síntomas y conductas presentadas por los seres humanos por lo que se hace necesario el uso de diversos modelos específicos para hacer posible la evaluación de cada fase, conducta y respuesta del proceso de adicción. Uno de los modelos más comúnmente usados para el análisis de la respuesta de recompensa a fármacos de abuso es el de preferencia de sitio condicionado (Suzuki, Kishimoto, & Misawa, 1996).

El modelo de Preferencia de Sitio Condicionada o CPP (*Conditioned Place Preference* por sus siglas en inglés) es el modelo comúnmente usado para la evaluación de la conducta de recompensa y aversión a diversos fármacos. En este modelo se parea un ambiente particular con el fármaco evaluado y un ambiente distinto con solución salina, dado que esta última no produce efecto alguno de recompensa.

Este modelo cuenta con diferentes ventajas como una elevada sensibilidad pues el uso de una concentración baja del fármaco de abuso es capaz de generar la respuesta de recompensa, así mismo, este modelo también es útil para evaluar conductas de aversión. Este modelo es adaptable a diferentes especies de uso en laboratorio y es de gran utilidad para analizar conductas dosis dependiente con el fármaco de abuso. Igualmente, este modelo permite

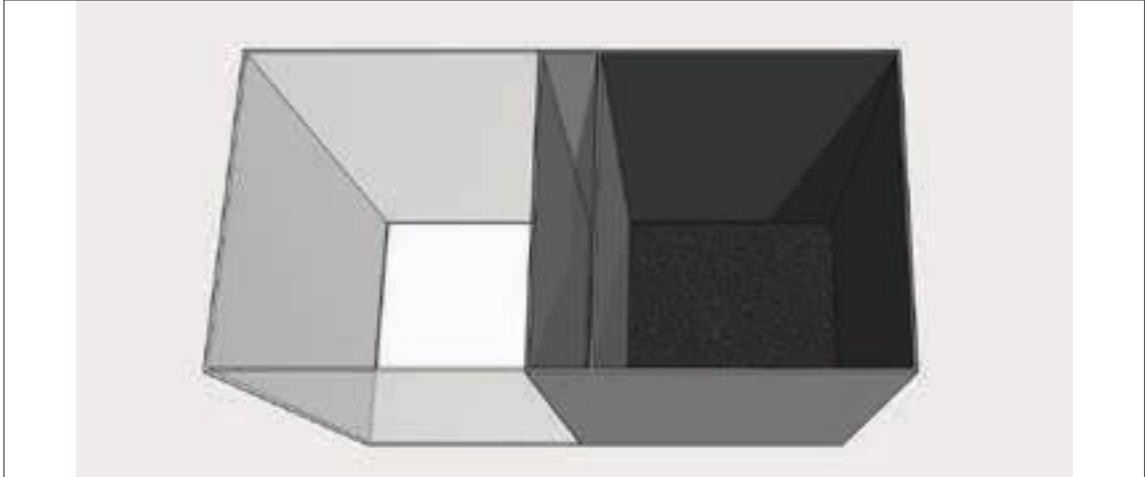


IMAGEN 1.9 Modelo de preferencia de sitio condicionada. Modelo de CPP modificado de 3 compartimentos.

el análisis de conducta motriz asociada con la respuesta de recompensa, como lo es, el desplazamiento a la zona pareada al fármaco de abuso. (Bardo & Bevins, 2000)

En el protocolo estándar se hace uso de un equipo de dos compartimentos, cada uno exhibiendo características diferentes (paredes blancas vs negras, suelo liso vs suelo texturizado). En el modelo modificado se hace uso de 3 compartimentos, en el que los compartimentos laterales acondicionados con características especiales mientras que el compartimento medio no cuenta con características distintivas. En cuanto al método empleado se puede hacer uso de un protocolo con o sin bias (tendencia basal) en este último es tomado a consideración la preferencia basal del sujeto para definir cuál será el compartimento pareado al fármaco de abuso siendo este aquel compartimento menos preferido. Considerado como un modelo de condicionamiento clásico nos provee de valiosa información acerca de los efectos tanto de recompensa como de aversión producto de la administración del fármaco de abuso.

2. JUSTIFICACIÓN

Los fármacos de origen opioide son vitales para el manejo del dolor a nivel mundial dentro de los cuales la morfina es clasificada como el analgésico por excelencia por parte de la OMS, y uno de los principales medicamentos usados para cuidados paliativos en México. Sin embargo, sus efectos adictivos igualan en complicaciones a sus cualidades beneficiosas dado que su abuso es una de las principales causas de muerte en países desarrollados. Se ha reportado en 2014 tan solo en los Estados Unidos 15,281 muertes a causa de sobredosis de fármacos opioides, el abuso de estos medicamentos también fue reportado como la tercera causa de muerte en reino Unido para el año 2015.

El aumento en la mortalidad por abuso de un fármaco de primera necesidad para el manejo del dolor crónico hace necesaria la realización de estudios sobre el principal sistema encargado del establecimiento de la adicción a este fármaco: el sistema de recompensa.

Existe evidencia experimental que sugiere que la presencia de un estado inflamatorio crónico junto a un estímulo doloroso es capaz de modificar la percepción de la respuesta de recompensa (Suzuki *et al.*, 1996; Borsook *et al.*, 2007; Walter Swardfager *et al.*, 2016). Sin embargo, si se tiene como objetivo el desarrollo de una posible terapia a partir del modelo que se propone en este trabajo es esencial determinar si el factor dolor es estrictamente necesario para la modificación de la respuesta de recompensa. De igual manera, determinar cuáles moléculas de la cascada inflamatoria periférica se encuentran mayormente expresadas en este sistema nos permitiría sentar las bases para la investigación de nuevas terapias para individuos bajo regímenes de administración de fármacos opioides mejorando la efectividad de los mismos, así como la calidad de vida de los pacientes.

3. HIPÓTESIS

La presencia de inflamación periférica no infecciosa no dolorosa modificará la preferencia de sitio condicionada a la morfina en ratas.

La presencia de inflamación periférica infecciosa no dolorosa modificará la preferencia de sitio condicionada a la morfina en ratas.

Retirar el estímulo doloroso no reinstaurará la preferencia de sitio basal si se mantiene el estímulo inflamatorio periférico.

La eliminación del estímulo inflamatorio por medio de la administración de un fármaco antiinflamatorio restituirá la preferencia de sitio condicionada a morfina.

La administración de carragenina como modelo inflamatorio no doloroso presentara un aumento de Prostaglandina E2 en suero de sangre periférica.

4. OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de inflamación periférica dolorosa y no dolorosa sobre un modelo de preferencia de sitio condicionada a morfina en ratas.

Particulares

- Determinar si el componente de dolor es esencial en la modificación de la conducta de preferencia de sitio.
- Evaluar el efecto de un estímulo inflamatorio periférico no infeccioso mediado por daño tisular causado por la administración de carragenina en la conducta de recompensa.
- Evaluar el efecto de un estímulo inflamatorio infeccioso en la conducta de recompensa mediado por BCG.
- Determinar el efecto de la administración de un fármaco antiinflamatorio en la conducta de preferencia de sitio condicionada a morfina.
- Cuantificar la concentración de prostaglandinas pro inflamatorias en la cascada de inflamación periférica por daño tisular mediado por la administración de carragenina en un modelo de inflamación no infeccioso no doloroso.

5. MÉTODO

Los experimentos conductuales y de toma de muestra sanguínea fueron realizados en el Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Farmacología en la Facultad de Medicina de la UNAM a cargo de la Dra Claudia Gómez Acevedo bajo los lineamientos establecidos por la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los experimentos de identificación de Prostaglandinas y citocinas se realizaron en el Laboratorio de psicoimmunología en el Instituto de Psiquiatría a cargo del Dr. Lenin Pavón Romero.

Para el protocolo de prueba conductual se usaron 81 ratas macho de la especie *Rattus norvegicus* cepa Wistar de 250 a 300 g de peso con comida y agua *ad libitum* en cajas habitación de un máximo de 5 individuos en ciclo invertido luz/oscuridad 12:12 (encendido de las luces a las 18hrs y apagado a las 6 hrs) con el fin de realizar la evaluación de preferencia de sitio durante el periodo nocturno natural de los sujetos de experimentación.

Las pruebas conductuales fueron realizadas en un cuarto iluminado con luz roja durante el periodo nocturno de los sujetos y atenuación de los ruidos externos.

Para la cuantificación de la concentración de PGE2 en sangre periférica se usaron 8 ratas macho de la especie *Rattus norvegicus* cepa Wistar de 250 a 300 g de peso con comida y agua *ad libitum*.

5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

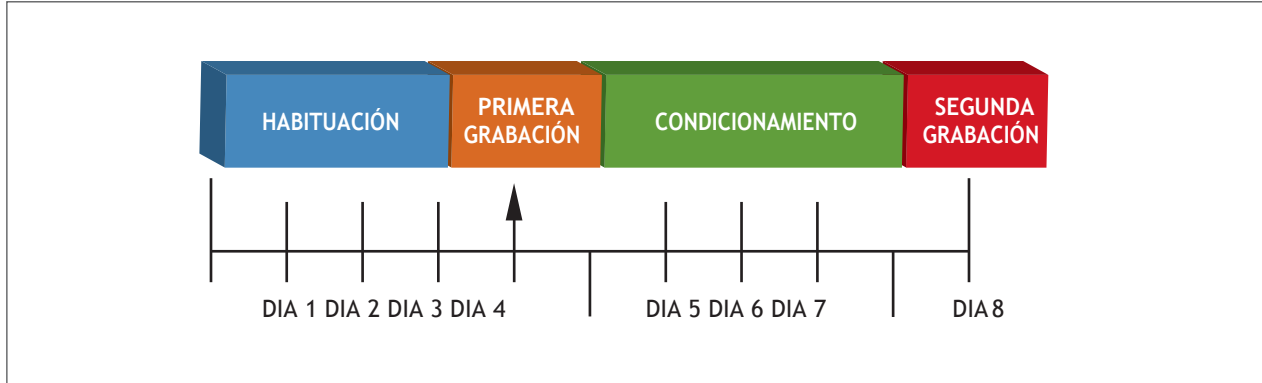


IMAGEN 1.9 Diseño experimental. Se muestra los periodos de habituación y condicionamiento inducido por administración de morfina, la forma triangular indica la administración del estímulo inflamatorio al finalizar la primera grabación 24 horas previas al inicio del condicionamiento

La denervación del nervio ciático derecho es realizada una semana previa al inicio de la habituación.

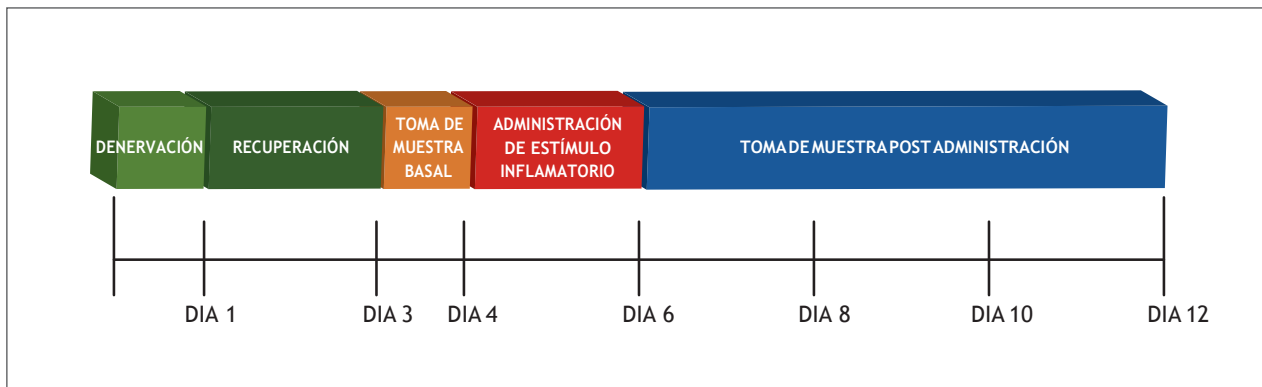


IMAGEN 2.0 Diseño experimental de toma de muestra sanguínea por medio de punción retro orbital para análisis de prostaglandinas. Se realiza la denervación del nervio ciático de la pata derecha trasera para retirar el estímulo doloroso a causa del daño tisular ocasionado por la administración de carragenina.

5.2. CONDICIONAMIENTO DE SITIO

Para los experimentos conductuales se utilizó un modelo de CPP de 3 compartimentos. Dos compartimentos mayores con las mismas dimensiones, pero de color diferente; uno de color negro y base con textura de papel lija (A) y el otro iluminado con luz blanca y con textura de suelo lisa (B), mientras que el compartimento medio (C) es de color gris con una textura suave cuya función será la de unir a los dos compartimentos de mayor tamaño. Se hizo uso de un protocolo con bias semejante al descrito en la literatura (Wang *et al.*, 2015) con modificaciones, en el cual se utilizó la preferencia de compartimiento inicial de la rata (bias). Este procedimiento se desarrolló a lo largo de 8 días en 4 fases distintas: habituación al aparato de CPP, prueba de preferencia precondicionamiento, condicionamiento y prueba de preferencia postcondicionamiento.

5.3. HABITUACIÓN

Esta fase se realizó con el fin de disminuir el estrés del sujeto al nuevo entorno del aparato de CPP.

De los días 1 a 3 cada individuo fue colocado en el compartimento C y se le concedió acceso total al aparato de preferencia de sitio para libre exploración durante 30 minutos.

Este proceso se llevó a cabo en condiciones de atenuación de ruido e iluminación roja dado que no es visible para los sujetos.

5.4. PRUEBA DE PREFERENCIA PRE-CONDICIONAMIENTO

En el cuarto día del procedimiento el animal fue colocado en el compartimento C y le fue otorgado libre acceso al aparato completo con el fin de determinar la preferencia basal. Su actividad fue video grabada durante 15 minutos. Para este protocolo se consideraron como aptos sólo a los individuos que presentarán preferencia basal por el compartimento oscuro (B) reflejada en una diferencia de al menos 700 segundos con respecto al compartimento iluminado.

5.5. CONDICIONAMIENTO

Fue usado un protocolo de condicionamiento semejante al descrito en la literatura (Bals-Kubik, Ableitner, Herz, & Shippenberg, 1993) con modificaciones. En este protocolo el condicionamiento fue llevado a cabo durante 3 días con dos sesiones diarias en las que se administró el fármaco de abuso y solución salina alternadamente con un mínimo de 6 horas entre cada sesión.

Del día 5 al día 7 se llevó a cabo el condicionamiento de los individuos que consistió en 2 sesiones diarias durante 3 días dejando un lapso de 6 horas entre cada una de las dos sesiones por día. En la primera sesión se realizó la administración del fármaco vía subcutánea (morfina 5 mg/kg), inmediatamente tras la cual, el individuo fue aislado en el compartimiento iluminado (B) con la finalidad de que asociara el estímulo de recompensa producido por el fármaco de abuso a este compartimiento, transcurridos 15 min el sujeto fue retirado a su respectiva caja - habitación.

Durante la segunda sesión se realizó la administración de solución salina y posteriormente del fármaco (morfina 5 mg/kg), la vía administración tanto del vehículo como del fármaco fue subcutánea. En seguida de la administración del vehículo la rata fue aislada en el compartimiento preferido durante 45 min y posteriormente regresó a su caja - habitación, 6 hrs después al mismo individuo se le administró la dosis de morfina correspondiente y fue aislado en el compartimiento no preferido durante el mismo tiempo tras el cual regresó a su caja - habitación. Esquema de administración representado en la tabla 1.1.

Hora	Día 5		DÍA 6		DÍA 7	
	Compartimento	Fármaco	Compartimento	Fármaco	Compartimento	Fármaco
11:00	No preferido	Morfina	Preferido	Solución salina	No preferido	Morfina
17:00	Preferido	Solución salina	No preferido	Morfina	Preferido	Solución salina

TABLA 1.1 Esquema de condicionamiento con morfina indicando horarios de administración

5.6. PRUEBA DE PREFERENCIA POST-CONDICIONAMIENTO

En el día número 8 cada sujeto fue colocado en el compartimento (C) con libre acceso a todo el aparato, se videograbó su conducta durante 900 segundos. Transcurrido este tiempo el individuo fue retirado a su caja - habitación.

Se hizo la comparación con la conducta basal de cada individuo y sólo se consideró como cambio de preferencia de sitio a aquellos individuos que presentaron preferencia por el compartimento condicionado o basal de acuerdo al grupo evaluado.

5.7. INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA

Este protocolo se realizó únicamente en la extremidad anterior derecha de los sujetos pertenecientes a los grupos experimentales sometidos al modelo de inflamación por carragenina no dolorosa.

Para esta operación las ratas fueron sedadas con pentobarbital sódico 30 mg/kg vía i.p. de acuerdo con los lineamientos de analgesia y anestesia en animales de laboratorio (Kießling, Pichler, & Hau, 2017).

Para inhibir la sensación dolorosa en el área intervenida se administró lidocaína (PiSA 20 mg/mL) subcutánea (0.3 mL) en la zona del trocánter superior, posteriormente se administró el volumen restante (0.7 mL) en tejido muscular profundo de la misma zona.

Se usó Antibenzil 1:100 como antiséptico sobre la zona de la articulación pélvica - femoral anterior a la incisión. Se efectuó una incisión de 2 cm sobre la articulación pélvica para profundizar a través de la fascia muscular entre el músculo vasto lateral de los cuádriceps y la cabeza larga del bíceps femoral para exponer el nervio ciático.

Una vez expuesto el nervio fue bañado en lidocaína (0.2 mL) con el fin de inhibir la activación del mismo, transcurridos 30 seg se evaluó la eficacia del bloqueo con lidocaína al comparar la retracción de la extremidad intervenida contra la extremidad opuesta en respuesta a la compresión del cojinete por una pinza de piel, en ausencia de la respuesta de retracción se consideró como bloqueo intenso de la actividad del nervio ciático.

Comprobado el bloqueo exitoso del nervio se removió un segmento de 2 mm del mismo cerca de la bifurcación en nervios tibial y peroneal, se realizó el primer corte en zona más distal de la pata y el segundo corte a la derecha del primero.

Finalmente, la incisión fue suturada con hilo 100% algodón Guttermán y limpiada con antibenzil 1:100.

Completada la intervención el sujeto fue puesto en reposo para su recuperación durante un periodo de 7 días.

5.8. GRUPOS EXPERIMENTALES

Prueba conductual

En este experimento fueron utilizados 9 grupos animales: 1 grupo control y 8 experimentales.

El protocolo de inducción de la respuesta inflamatoria por carragenina (zona de administración y dosis empleada) usado en este trabajo se llevó a cabo siguiendo los lineamientos reportados anteriormente (Suzuki *et al.*, 1996).

Grupo control n=9

Se siguió el mismo procedimiento de condicionamiento de sitio con la diferencia de que se administró NaCl 0.9% tanto en el compartimento iluminado como en el oscuro dado que esta solución no genera respuesta de recompensa.

No fue administrado ningún fármaco ni se llevó a cabo el protocolo de inducción inflamatoria.

Grupo fármaco (Mor 5 mg/kg) n=9

Los sujetos del grupo fármaco fueron sometidos al mismo procedimiento de condicionamiento mencionado anteriormente pareando el compartimento iluminado

con la administración de la dosis de morfina correspondiente (mor 5 mg/kg) mientras que el compartimiento oscuro fue pareado a la administración de solución salina.

Inflamación no infecciosa dolorosa (INID)

(Carr 250 + Mor 5 mg/kg) n=9

Con el fin de determinar si la presencia del componente dolor junto con el estímulo inflamatorio esencial de la modificación de preferencia de sitio condicionada la intervención quirúrgica no fue llevada a cabo.

En este grupo los sujetos experimentales recibieron una inyección de 250 µL de carragenina al 1% intraplantar en la extremidad anterior derecha 24 horas antes de iniciar el condicionamiento.

Transcurrido este tiempo se llevó a cabo el condicionamiento y las respectivas grabaciones de manera normal.

Inflamación no infecciosa no dolorosa (ININD250)

(Den+Carr 250 + Mor 5 mg/kg) n= 9

Los sujetos de este grupo fueron sometidos a denervación no dolorosa del nervio ciático derecho con el fin de eliminar el componente dolor. Al término de una semana de recuperación se les administró 250 µL de carragenina al 1% intraplantar (Aplicada al cojinete de la misma extremidad) 24 hrs antes del condicionamiento.

Terminado este periodo de tiempo se llevó a cabo el condicionamiento y las respectivas grabaciones de manera normal.

Inflamación no infecciosa no dolorosa (ININD500)

(Den+Carr 500 + Mor 5 mg/kg) n= 9

Los sujetos de este grupo fueron sometidos a denervación no dolorosa del nervio ciático derecho con el fin de eliminar el componente dolor, transcurrida una semana de recuperación se les administró 500 µL de carragenina al 1% intraplantar (Aplicada al cojinete de la misma extremidad) 24 hrs antes del condicionamiento.

Transcurrido este tiempo se llevó a cabo el condicionamiento y las respectivas videograbaciones de manera normal.

Inflamación no infecciosa no dolorosa (ININD750)

(Den+Carr 750 + Mor 5 mg/kg) n= 9

Los sujetos de este grupo fueron sometidos a la denervación no dolorosa del nervio ciático derecho con el fin de eliminar el componente dolor, transcurrida una semana de recuperación se les administró 750 µL de carragenina al 1% intraplantar (Aplicada al cojinete de la misma extremidad) 24 hrs antes del condicionamiento.

Pasado este tiempo se llevó a cabo el condicionamiento y las respectivas grabaciones de manera normal.

Inflamación infecciosa no dolorosa (IIND)

(BCG 1x10⁷ UFC + Mor 5 mg/kg) n= 9

A los sujetos de este grupo les fueron administrados intraperitonealmente 1x10⁷ UFCs del Bacilo de Calmette-Guerin cepa danesa 24 horas antes del condicionamiento, así mismo no fueron intervenidos quirúrgicamente.

Transcurrido este tiempo se llevó a cabo el condicionamiento y las respectivas grabaciones de manera normal.

5.9. ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS

Para determinar si existían diferencias en la cascada de activación de la respuesta inflamatoria se empleó un inhibidor de la prostaglandina E2 (ibuprofeno SIGMA-ALDRICH) los sujetos solo tuvieron acceso a ibuprofeno disuelto en agua 0.6mg/mL en un periodo de 24hrs previas a la primera sesión de condicionamiento hasta la última sesión de grabación, así mismo este fármaco les fue administrado vía i.p. en una dosis de 50mg/kg 15 minutos previo a cada sesión de condicionamiento.

ININD + Ibu (Carr 750 + Mor 5 mg/kg +Ibu 0.6mg/ml) n=9

Los sujetos de este grupo fueron sometidos al mismo procedimiento del grupo ININD 750 con la diferencia de la administración de ibuprofeno (SIGMA-ALDRICH Ibuprofen) vía oral por medio de la ingesta de agua con ibuprofeno 0.6mg/ml 24 horas previas al proceso de condicionamiento y hasta finalizar el protocolo, así mismo a cada individuo de este grupo se les administro el mismo fármaco via I.P. en una dosis de 50mg/kg 15 minutos antes de cada sesión de condicionamiento.

IIND + Ibu (BCG 1x10⁷ UFC + Mor 5 mg/kg + Ibu 0.6mg/ml n=9

En este grupo se llevó a cabo el mismo procedimiento que con los individuos del grupo IIND adicionando la administración de ibuprofeno (SIGMA-ALDRICH Ibuprofen) vía oral por medio de la ingesta de agua con ibuprofeno 0.6mg/ml 24 horas previas al proceso de condicionamiento y hasta finalizar el protocolo. Así mismo a cada individuo de este grupo se les administro el mismo fármaco via i.p. en una dosis de 50mg/kg 15 minutos antes de cada sesión de condicionamiento.

Medición de PGE2 en suero de sangre periférica

Se analizó suero de sangre periférica en el mismo modelo de inflamación por administración de carragenina usado en la prueba conductual con el fin de determinar la presencia de PGE2 en la cascada inflamatoria como uno de los factores clave en la modificación de la conducta de recompensa.

Para este proceso se optó por un método de toma de muestra de sangre vía retro orbital por limitaciones de material como del mismo modelo pro inflamatorio, la toma de sangre a través de una punción en la cola del sujeto provoca necrosis del tejido por acumulación de cristales de carragenina.

5.10. TOMA DE MUESTRA SANGUÍNEA RETRO ORBITAL

La toma de muestra fue realizada cada 48hrs. durante un periodo de 5 días alternado el ojo de muestra con el fin de disminuir la posibilidad de daño ocular al individuo y permitir una mayor recuperación entre muestreos.

Para la realización de esta técnica los sujetos fueron sedados de manera general mediante el uso de éter, una vez que la rata no presentara tono muscular se sujetó el cuello de manera firme de manera que el ojo del sujeto sobresaliera de la cuenca ocular, hidratándolo constantemente con solución salina. Posteriormente con sumo cuidado se insertó un tubo capilar de cristal de 1.15 mm de diámetro en la zona dorsal de la cuenca ocular con una inclinación de 45° al mismo tiempo que se realizaba un movimiento de rotación lenta para ocasionar una incisión en el tejido. Este procedimiento permite que el flujo de sangre sea constante por medio de la capilaridad del fluido. La toma de muestra se detiene al recolectar el volumen de .5 mL. de tejido sanguíneo tras lo cual el capilar fue retirado y el ojo hidratado con agua salina con el fin de retirar cualquier remanente de sangre evitando daños por coagulación.

La toma fue realizada durante 8 días cada 48 hrs alternando ojo izquierdo y derecho con el fin de disminuir el daño causado en la recolección sanguínea. Nunca se recolectó más de 5 mL de volumen sanguíneo de acuerdo a lineamientos anteriormente reportados (Sharma *et al.*, 2014).

Las muestras fueron almacenadas en un ultracongelador a -196 ° en el departamento de Biomembranas.

5.11. GRUPOS ANÁLISIS SANGUÍNEO DE PGE2

Para este protocolo se hizo uso de 3 grupos, 1 grupo experimental, 1 grupo control y 1 grupo Sham.

Control n=3

Este grupo no fue sometido a ningún tipo de protocolo quirúrgico ni administración de ningún agente pro inflamatorio

Inflamación no infecciosa no dolorosa (ININD500) (Den+Carr 500) n=3

Los sujetos de este grupo fueron sometidos al mismo protocolo de denervación del nervio ciático derecho, con una semana de recuperación tras la que se les fue administrados 500 µL de carragenina al 1% intraplantar (Aplicada al cojinete de la misma extremidad) inmediatamente antes de la primera recolección sanguínea.

Sham n= 2

En este grupo los sujetos fueron sometidos al mismo protocolo de denervación del nervio ciático derecho con la única diferencia de que no fue realizada la sección del nervio. Al finalizar la manipulación del nervio ciático el sujeto fue suturado y se procedió inmediatamente a la toma de la muestra sanguínea.

5.12. ANÁLISIS SANGUÍNEO DE PGE2 - ELISA

Para este protocolo se hizo uso del kit de ELISA ab133021- Prostaglandin E2 de abcam® y se siguió el manual de uso incluido en el mismo.

De acuerdo a las instrucciones del kit tanto las muestras como los agentes reactivos fueron mantenidas a una temperatura ambiente (18 a 25 °C).

Preparación del agente reactivo

El conjugado de fosfatasa alcalina PGE2 fue equilibrado a temperatura ambiente para ser usado. Posteriormente fue preparada la primera concentración del buffer de lavado al diluir 5 ml del concentrado de buffer de lavado en 95 mL de agua desionizada. A continuación, se llevó a cabo la preparación de las disoluciones estándar para lo cual el volumen total (5000 pg/mL) de la solución stock de PGE2 se mantuvo a temperatura ambiente.

Para realizar las diluciones correspondientes de la solución estándar se siguieron las instrucciones y tabla adjuntas por el fabricante.

Estandar	Solución a diluir	Volumen a diluir (µL)	Volumen del diluyente (µL)	Concentración inicial (pg/mL)	Concentración final (pg/mL)
1	Estándar 1	50	950	50000	2500
2	Estándar 2	500	500	2500	1250
3	Estándar 3	500	500	1250	625
4	Estándar 4	500	500	625	313
5	Estándar 5	500	500	313	156
6	Estándar 6	500	500	156	78.1
7	Estándar 7	500	500	78.1	39.1
B0	Ninguno	-	500	-	0



TABLA 1.2. Instrucciones de dilución. Tomadas de manual de usuario de kit ab133021 - Prostaglandin E2 ELISA Kit abcam®

Preparación de muestras de suero de sangre periférica

Para la preparación de los sueros se realizó una dilución 1:10 diluyendo 100 µL del suero en 900 µL de la solución de buffer de ensayo. De acuerdo a las instrucciones del fabricante las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente.

Ensayo ELISA

El protocolo de ELISA fue llevado a cabo de acuerdo a los lineamientos proporcionados por el fabricante, los cuales son listados a continuación. Se realizó una tabla esquemática para determinar la posición de los pozos de estandarización de lectura y de muestras a analizar. A continuación, se ejemplifica dicha tabla.

Cada una de los pozos fue realizado por duplicado para dar validez estadística.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	BS	EST1	EST5	Sham 1.2	Sham 2.2	Car 1.2	Car 2.2	Car 3.2	C 1.2	C 2.2	C 3.2
B	BS	EST1	EST5	Sham 1.2	Sham 2.2	Car 1.2	Car 2.2	Car 3.2	C 1.2	C 2.2	C 3.2
C	TA	EST2	EST6	Sham 1.3	Sham 2.3	Car 1.3	Car 2.3	Car 3.3	C 1.3	C 2.3	C 3.3
D	TA	EST2	EST6	Sham 1.3	Sham 2.3	Car 1.3	Car 2.3	Car 3.3	C 1.3	C 2.3	C 3.3
E	NSB	EST3	EST7	Sham 1.4	Sham 2.4	Car 1.4	Car 2.4	Car 3.4	C 1.4	C 2.4	C 3.4
F	NSB	EST3	EST7	Sham 1.4	Sham 2.4	Car 1.4	Car 2.4	Car 3.4	C 1.4	C 2.4	C 3.4
G	B0	EST4	Sham 1.1	Sham 2.1	Car 1.1	Car 2.1	Car 3.1	C 1.1	C 2.1	C 3.1	
H	B0	EST4	Sham 1.1	Sham 2.1	Car 1.1	Car 2.1	Car 3.1	C 1.1	C 2.1	C 3.1	

1. Se añadieron 100 μ L de buffer de ensayo a los pozos denominados como NSB (*non-specific bending* por sus siglas en inglés).
2. Se añadieron 100 μ L en los pozos B0.
3. Se añadieron 100 μ L de las soluciones estándar a los pozos correspondientes en sucesión vertical descendente.
4. Se añadieron 50 μ L de buffer de ensayo en los pozos NSB.

5. Se añadieron las muestras a analizar en los pozos correspondientes.
6. Se añadió 50 μL de conjugado alcalino de PGE2 en todos los pozos excluyendo a los pozos B0 y TA (Total Activity por sus siglas en inglés)
7. Se añadieron 50 μL de anti cuerpo anti PGE2 en todos los pozos exceptuando Bs, TA y NSB.
8. Posteriormente se incubo la placa a temperatura ambiente en agitación continua de 500 rpm durante 2 horas cubierta por el sticker provisto por el fabricante.
9. Tras la incubación se realizaron 3 lavados añadiendo 400 μL de buffer de lavado.
10. Se añadieron 5 μL de conjugado alcalino de PGE2 a los pozos TA.
11. Se agregaron 200 μL de solución de sustrato pNpp a todos los pozos y se incubo durante 45 minutos en oscuridad sin agitación.
12. Se agregaron 50 μL de solución de STOP a todos los pozos. Inmediatamente después la placa de ELISA fue analizada en espectrofotómetro con una longitud de onda de 405 nm
13. Se determinó la curva estándar con la ayuda del software SkanIt Software 5.0 for Microplate Readers RE, ver. 5.0.0.42 con un análisis de 4L recomendado por el fabricante del kit

5.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico y graficas fueron realizados en el programa GraphPad 8.

Protocolo conductual

Se calculó la CPP como la diferencia de tiempo en la permanencia del sujeto en cada compartimento del aparato de Preferencia de Sitio pre y post condicionamiento
 $CPP_{preferencia} = \text{Tiempo total en el compartimento no preferido postcondicionamiento} - \text{Tiempo total en el compartimento no preferido pre-condicionamiento}$.

Para poder calcular la distribución normal de los datos de CPP se utilizó la prueba de normalidad D'Agostino & Pearson, para aquellos datos que presentaban distribución estándar se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía (Preferencia) para determinar si existían diferencias significativas.

Posteriormente se realizó la comparación entre grupos utilizando el análisis post hoc Dunnett, así mismo se reportaron los intervalos de confianza al 95%. En el caso de la comparación entre grupos se realizó la prueba post hoc de Tukey.

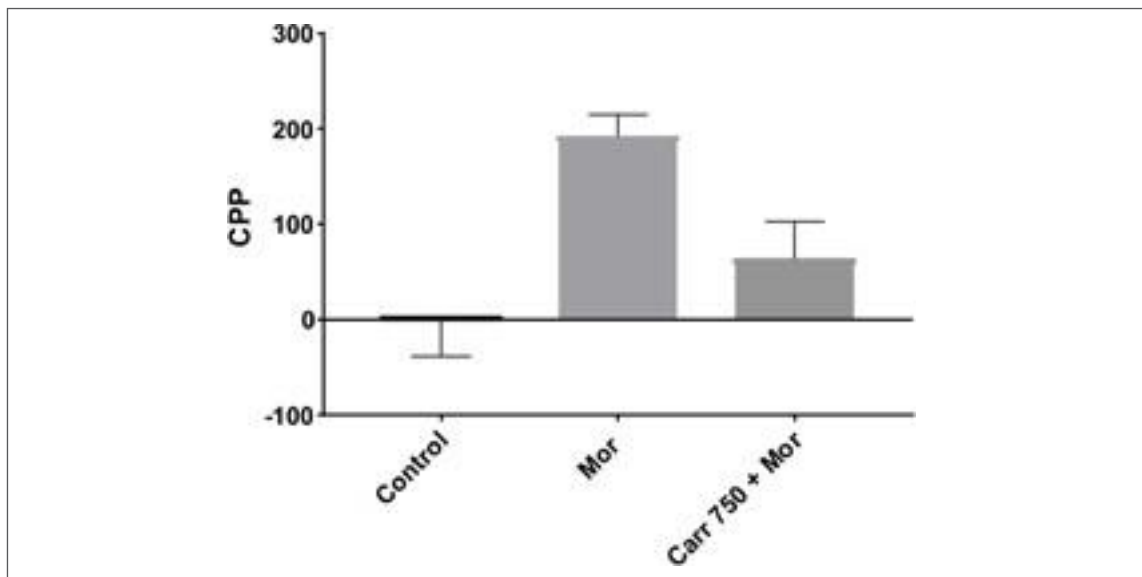
Análisis sanguíneo de PGE2 - ELISA

Para el análisis de concentración de PGE2 en suero se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro Wilk, determinada la normalidad de los datos fue aplicada una ANOVA de dos vías (Tiempo x Concentración) con el fin de comparar tanto las diferencias en los tiempos de muestra como entre grupos.

Se estableció como valor crítico de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

Inflamación dolorosa por carragenina inhibe la preferencia de sitio condicionado a morfina

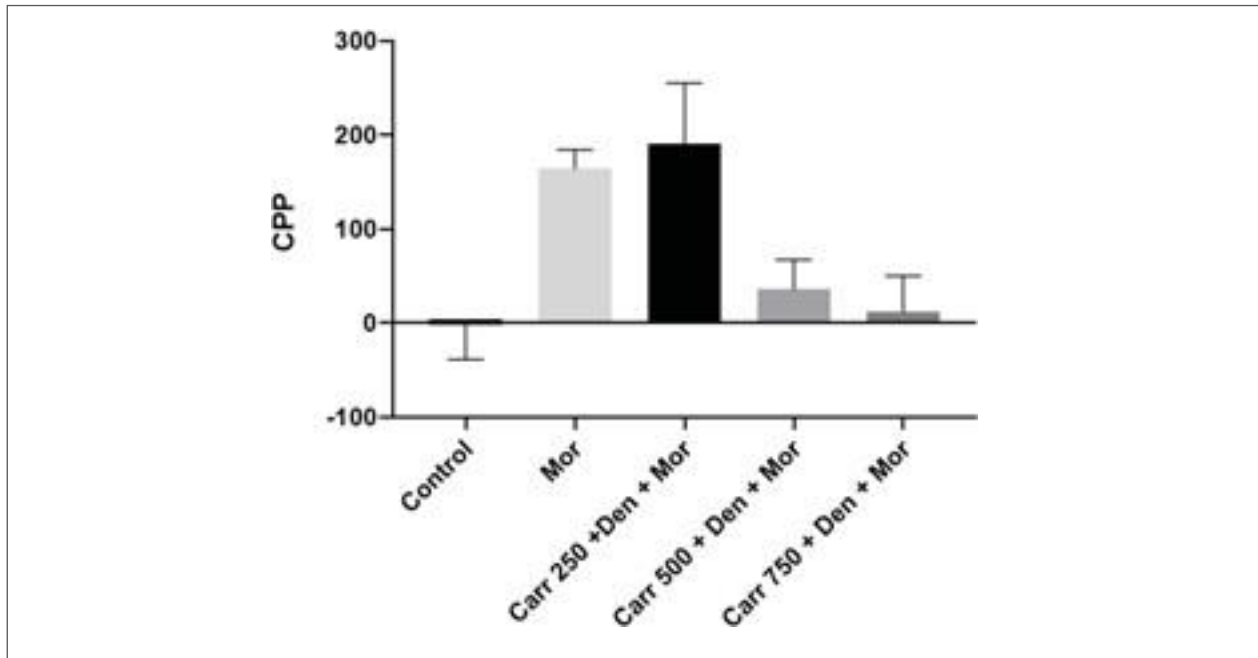


GRAFICA 2.1 Un estímulo doloroso inflamatorio es capaz de inhibir el CPP a morfina presentando una diferencia significativa con respecto a las ratas carentes del estímulo doloroso inflamatorio. $N= 9$ $F(2,24) = 8.550$ $p < 0.01$. Las barras representan la desviación estándar. $***p < 0.0005$.

En el grupo control no se aprecia preferencia condicionada provocada por la administración de solución salina. Así mismo se determinó que la administración de carragenina intraplantar 24 horas previas al condicionamiento en sujetos del grupo INID 750 aun siguiendo el esquema de condicionamiento es capaz de inhibir el CPP a morfina. En la gráfica 2.1 se puede apreciar que la administración de morfina en el grupo Mor causa CCP.

Sin embargo, al administrar carragenina en la dosis de 750 μL al 1% intraplantar podemos observar una drástica reducción del CCP (63.5) de manera que no se presentan diferencias significativas con respecto del grupo control.

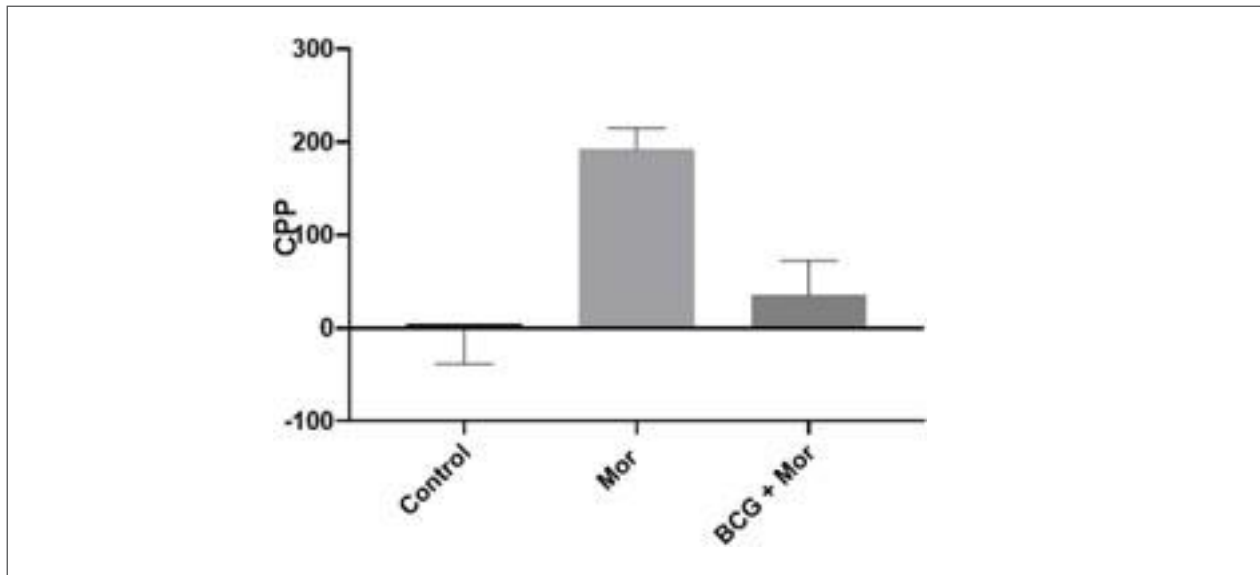
Inflamación no dolorosa por carragenina inhibe preferencia de sitio condicionado a morfina



GRAFICA 2.2 Cada barra representa la media con el error estándar para 9 ratas. * $p < 0.05$. $N = 9$ $F(4,44) = 5.376$ $p < 0.01$. Las barras denotan desviación estándar. * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$

Para determinar la dosis de carragenina a usar en este protocolo se comparó si existían diferencias significativas entre la administración de 250 μL , 500 μL y 750 μL de carragenina, sin embargo, se encontró que no existieron diferencias significativas entre las dosis más altas contra el grupo control en ausencia del estímulo doloroso por lo que se optó por la dosis más alta para aplicar al modelo conductual dado que redujo en un 93% el CPP presentado (180.5 vs 11.6) con respecto al grupo Mor la siguiente dosis más baja para el modelo de cuantificación de prostaglandinas en sangre periférica. Igualmente se encontró que en ausencia de dolor al administrar la dosis de 250 μL de carragenina al 1% intraplantar no se encontraban diferencias significativas con respecto al grupo Mor ni con respecto al grupo control.

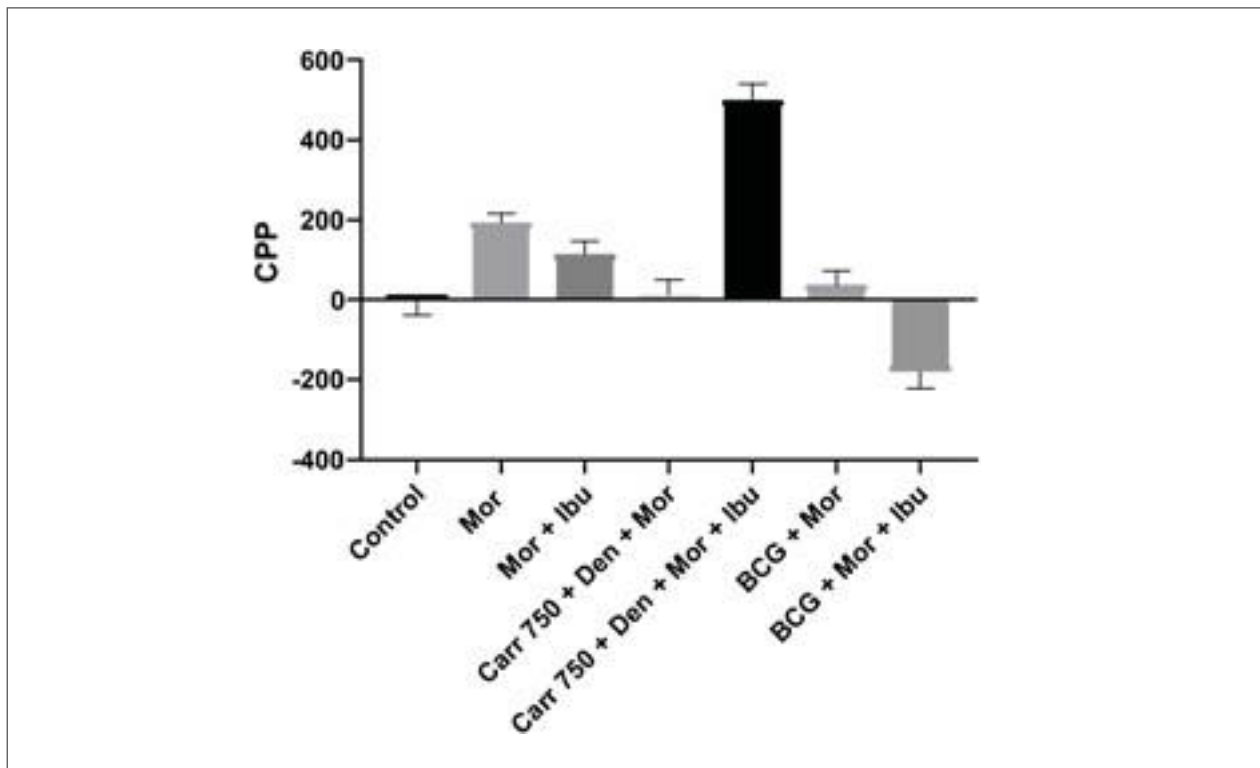
Inflamación no dolorosa Inducida por BCG Inhibe la CCP por morfina



GRAFICA 2.3 La administración de BCG como estímulo inflamatorio en ausencia de dolor provocó la reducción del CPP con respecto al grupo MOR y no presenta diferencias significativas contra el grupo control. $N=9$ $F(2,24) = 9.733$ $p < 0.001$. Las barras denotan la desviación estándar. $*p < 0.005$

Se hizo uso del Bacillus Calmette-Guérin para administración del estímulo inflamatorio diferente no doloroso, se siguió el mismo protocolo de administración 24 horas antes del proceso de condicionamiento. Se administró BCG en la dosis de 1×10^7 UFC vía i.p. En la gráfica 2.3 se puede apreciar que el grupo control no muestra referencia de sitio condicionada, igualmente se observa la reducción del CPP por este perfil inflamatorio con respecto al grupo MOR con una reducción del 97.9% (180.5 vs 3.9), este ultimo grupo no presenta diferencias significativas con respecto al control.

Administración de Ibuprofeno modula el efecto de la inflamación en CPP a morfina

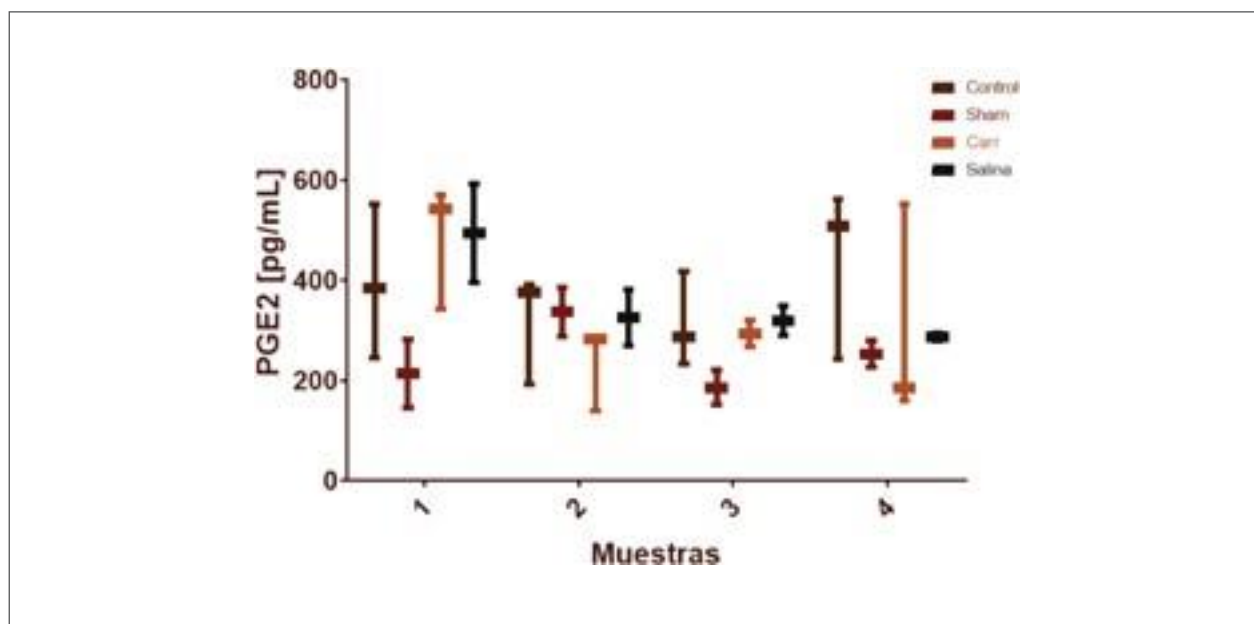


GRAFICA 2.1 La administración de BCG como estímulo inflamatorio en ausencia de dolor provocó la reducción del CPP con respecto al grupo MOR y no presenta diferencias significativas contra el grupo control. $N=9$ $F(2,24) = 9.733$ $p < 0.001$. Las barras denotan la desviación estándar. $*p < 0.005$

Para determinar si ambos modelos de inflamación pueden ser modulados por la administración de un fármaco inhibidor de COX se usó Ibuprofeno, dado que ambos perfiles inflamatorios difieren en las citocinas, interleucinas y prostaglandinas sintetizadas en cada respuesta. Así mismo se realizó la administración de ibuprofeno en el segundo grupo MOR con el fin de descartar la interacción farmacológica entre el fármaco de abuso y el fármaco antiinflamatorio, no se presentaron diferencias significativas en este grupo respecto al grupo Mor.

Se realizó el protocolo de CPP con el grupo ININD 750 + ibu y se observó que el CPP de los sujetos de este grupo fue recuperado y que excedía de gran manera al grupo ININD 750 $p < 0.0005$ sobrepasando igual el CPP del grupo MOR $p < 0.0005$. De igual manera se observó que en el grupo de IIND + Ibu presento diferencias significativas con respecto al grupo IIND $p < 0.005$.

Análisis de concentración de prostaglandina E2 en suero periférico en un modelo de inflamación no dolorosa por carragenina



GRAFICA 2.1 La administración de BCG como estímulo inflamatorio en ausencia de dolor provocó la reducción del CPP con respecto al grupo MOR y no presenta diferencias significativas contra el grupo control. $N=9$ $F(2,24) = 9.733$ $p <$

ANOVA table	F (X, x)	g.l.	P
Día x Grupo	F (9, 23) = 0.9760	9	P=0.4844
Día	F (3, 23) = 1.672	3	P=0.2007
Grupo	F (3, 23) = 1.730	3	P=0.1888

Se realizó un análisis de ELISA con el fin de determinar si la administración de carragenina en el modelo no doloroso produce un aumento en la síntesis de PGE2 y si este estímulo proinflamatorio se mantiene durante la duración del protocolo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre grupos ni días.

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se analizó la interacción que existe entre sistema inmune y sistema de recompensa, específicamente el papel de la respuesta inmune a un estímulo proinflamatorio en la alteración de la respuesta de recompensa a un fármaco de abuso específico (morfina).

Evidencia experimental obtenida en este protocolo apoya los hallazgos previos en los que se indica que tanto el dolor como la inflamación son vitales en la inhibición del CPP inducida por la administración de morfina, (Narita *et al.*, 2005). Sin embargo, uno de los objetivos de este estudio era determinar si la presencia de un estímulo inflamatorio no doloroso es capaz de inhibir la respuesta a morfina en el CPP, para lo cual se realizó una intervención quirúrgica a los sujetos de este estudio, en la cual se extrajo un segmento del nervio ciático derecho con el fin de separar el estímulo doloroso del estímulo inflamatorio.

En aquellos sujetos con perfil inflamatorio sin dolor (grupo ININD) se encontró que si el agente pro inflamatorio (Carragenina) es administrado en una dosis baja (250 μ L) el estímulo por sí solo no es capaz de modificar el CPP a morfina, esto arrojó resultados sin diferencias significativas contra los sujetos del grupo solo administrado con morfina (Grupo MOR). Sin embargo como se puede apreciar en la gráfica 2.2 al duplicar (500 μ L) y triplicar la dosis (750 μ L) se presenta una reducción en la preferencia por el compartimento pareado a morfina arrojando datos no significativos con respecto al control, esto nos indica que aunque el dolor como la inflamación son necesarios para la modificación del CPP, el estímulo inflamatorio administrado es suficiente para provocar una disminución importante en el CPP a morfina. Esto puede estar relacionado a que el perfil inflamatorio ocasionado por la administración de carragenina genera daño tisular liberando así DAMPs al ambiente lo que promueve de esta manera que la respuesta inmunológica sea potenciada. Así mismo, al provocar la formación de un edema mayor que el formado por la administración de una baja dosis ligado a la pobre absorción cutánea de esta molécula lleva al establecimiento y mantenimiento de una respuesta inflamatoria más

duradera. De igual manera, la inducción del edema por la administración de carragenina es un modelo comúnmente usado en la investigación de nuevos antiinflamatorios debido a que la respuesta inflamatoria ocasionada por este protocolo se encuentra ampliamente reportada (Cong, Khaziakhmetova, & Zigashina, 2015; DI ROSA, 1972).

Como se mencionó anteriormente, el estado inflamatorio es capaz de alterar el correcto funcionamiento del sistema de recompensa, tal es el caso del aumento en la concentración de Prostaglandina E2 (PEG2) y su interacción con los receptores de prostaglandinas E2 o EP2 tipo 2 en tejidos del SNC que está directamente ligada con la generación de conductas depresivas independiente de citocinas (de Paiva, Lima, *et al.*, 2010; Hein & O'Banion, 2009). Ya que el estado inflamatorio producido por la administración de carragenina esta mediado principalmente por el aumento de la síntesis de Prostaglandina E2 (Guay, Bateman, Gordon, Mancini, & Riendeau, 2004) esto podría explicar el que los sujetos sometidos a este modelo inflamatorio presentaron una reducción significativa en el CPP a morfina dado que el aumento de PEG2 y el subsecuente aumento de cAMP que provoca la reducción en la activación de neuronas dopaminérgicas del NAC mediada por la baja en la síntesis de GABA (Di Chiara & Bassareo, 2007; Hnasko, Robinson, Kremer, Palmiter., 2005). Sin embargo para determinar si esta molécula se encuentra relacionada con la modificación conductual en este modelo particular es necesario la realización de futuros experimentos.

Así mismo, la alteración del sistema de recompensa puede ser provocada por diferentes cascadas inflamatorias, tal es el caso de aumento de la concentración de IL-1 en el SNC el cual es capaz de provocar cambios en el estado de ánimo y síntomas depresivos (Hein & O'Banion, 2009). De igual manera el aumento de diferentes citocinas pro inflamatorias como la IL-1 β , IL-6 y el TNF α en este tejido son capaces de provocar disrupciones en el sistema de recompensa así como el desarrollo y perpetuamiento de conductas depresivas (Eisenberger *et al.*, 2010; Yirmiya, 1996).

Por lo anteriormente mencionado se decidió hacer uso bacilo de Calmette-Guerin (BCG) como segundo modelo inflamatorio ya que este modelo inflamatorio está caracterizado principalmente por el aumento en la síntesis de citocinas como la IL-1, la IL-5 y el TNF α así como de la reducción en la síntesis de prostaglandinas especialmente de la PGE2 (De Reijke, 1993; Yamashita, 2007) excluyendo de esta manera la cascada inflamatoria provocada por el modelo de administración de carragenina al mismo tiempo que se mantenía el estímulo inflamatorio en la ausencia de dolor.

En los grupos experimentales sometidos al modelo inflamatorio de BCG fue posible observar una reducción importante en el CPP pues estos grupos no presentaron diferencias significativas respecto al control, lo que sugiere que si cada modelo difiere en la cascada inflamatoria provocada, ambos se caracterizan por generar un efecto agudo similar al nivel del sistema de recompensa, lo que provoca un estado de estrés que a su vez desencadena la aparición de síntomas relacionados con el comportamiento depresivo confirmando lo que se ha propuesto anteriormente en la literatura (Chrousos, 2009).

Con el fin de determinar si estos modelos inflamatorios pueden ser farmacológicamente modulados se recurrió a la administración de un antiinflamatorio inhibidor de la ciclooxigenasa COX-2. En este estudio se determinó que la administración de ibuprofeno no tiene efecto en conjunto con la morfina por lo que no modificó el CPP de los sujetos condicionados a este fármaco. Sin embargo, es posible observar en la gráfica 2.4 que la administración de ibuprofeno en los sujetos del grupo ININD 750 presenta recuperación e incluso un incremento importante del CPP, esto apoya la hipótesis inicial de que la respuesta inflamatoria por PGE2 provoca la alteración del sistema de recompensa pues se está inhibiendo al principal sustrato para la síntesis de esta molécula. Así mismo este aumento en el CPP podría encontrarse relacionado con anterior evidencia experimental en relación al ibuprofeno en la cual es usado como un neuroprotector de células dopaminérgicas en condiciones de excitotoxicidad y en pacientes con enfermedades neurodegenerativas como Parkinson o Alzheimer (Casper, Yaparalvi, Rempel, & Werner, 2000; Gao, Chen, Schwarzschild, & Ascherio, 2011) mientras que en el caso de los sujetos del grupo IIND la conducta del CPP no es reinstaurada desarrollándose en su lugar un comportamiento de evitación al compartimento asociado con la morfina, dicha conducta podría ser interpretada como aversión hacia el fármaco de abuso, sin embargo es necesario realizar estudios más profundos para determinar si en efecto puede ser considerada como una conducta de aversión.

Finalmente se llevó a cabo el análisis de concentración de PGE2 en suero de sangre periférica para determinar si existe un aumento consistente con la literatura de esta molécula en el modelo inflamatorio no infeccioso no doloroso propuesto en este protocolo el que se obtuvieron muestras sanguíneas de los individuos cada 48 horas durante 8 días después de ser administrados con carragenina. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de esta molécula. Esto puede deberse a diferentes factores como el método de toma de muestra sanguínea ya que el daño tisular constante en la punción retro orbital puede provocar el establecimiento de una respuesta inflamatoria constante afectando los resultados de concentración de PGE2, igualmente

se ha reportado que la muestra tomada por este método no es representativa de sangre venosa pues por la naturaleza de mismo método de muestra esta puede llevar consigo remanente de tejido (Sharma *et al.*, 2014) sin embargo por razones de presupuesto y material disponible se optó por este método. Igualmente, esto se pudo deber al tiempo de almacenaje del kit de ELISA para la medición de PGE2 dando como resultado sensibilidad elevada lo que pudo provocar la lectura de falsos positivos.

Los resultados de este trabajo nos llevan a concluir que efectivamente la presencia de inflamación periférica no infecciosa no dolorosa modifica la preferencia de sitio condicionada a la morfina en ratas, al igual que la presencia de inflamación periférica infecciosa no dolorosa. Igualmente se comprobó que, retirar el estímulo doloroso, pero mantener el inflamatorio, no reinstaura la preferencia de sitio basal de los sujetos experimentales lo que sugiere que para la modificación de la conducta de recompensa el estímulo doloroso no es fundamental lo que da pie a futuras investigaciones respecto a la cascada inflamatoria periférica y su relación con el sistema de recompensa y la transmisión del estímulo inflamatorio periférico al SNC. Dilucidar este mecanismo será un primer paso en el desarrollo de futuras terapias para el manejo de las adicciones y mejoramiento de la calidad de vida de pacientes bajo cuidados paliativos.

Finalmente, no se pudo comprobar que la administración de carragenina como modelo inflamatorio no doloroso presenta un aumento de Prostaglandina E2 en suero de sangre periférica.

8. PERSPECTIVA A FUTURO

La realización de futuros estudios sobre este tópico es necesaria para poder determinar puntualmente tanto a la molécula o grupo de moléculas involucradas en el cambio conductual, así como la vía por el cual cada modelo inflamatorio es capaz de modificar la respuesta de recompensa para así poder sentar las bases del desarrollo de nuevas y más efectivas terapias en el manejo del dolor crónico y cuidados paliativos de la población. Igualmente, para desarrollo de terapias para el manejo de adicciones a estos mismos fármacos en sujetos adictos lo que idealmente mejorará la calidad de vida de los afectados.

En cuanto a la determinación de las moléculas participantes en la cascada inflamatoria del modelo propuesto se pretende realizar de nuevo bajo condiciones más estrictas empleando un método de muestreo más eficiente como la punción cardiaca.

9. GLOSARIO

- SNC:** Sistema Nervioso Central
- SNP:** Sistema Nervioso Periférico
- Ros:** Receptores Opioides
- BHE:** Barrera hematoencefálica
- DA:** Dopamina
- NAC:** Núcleo Accumbens
- NO:** Óxido Nítrico
- VTA:** Área Ventral Tegmental (Ventral Tegmental Area por sus siglas en ingles)
- AINEs:** Fármacos Antiinflamatorios no Esteroideos
- TNF:** Factor de Necrosis Tumoral
- PGE2:** Prostaglandina E2
- BCG:** Bacilo de Calmette y Guérin
- CPP:** Preferencia de Sitio Condicionada (Conditioned Place Preference por sus siglas en ingles)
- Bias:** Error sistemático introducido como constante en un protocolo experimental.
- Vía i.p.:** Vía de administración intraperitoneal
- Vía i.v.:** Vía de administración intravenosa

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, G. C. (2016). The Prescription Opioid Epidemic: An Evidence- Based Approach. Retrieved from https://www.jhsph.edu/research/centers-and-institutes/center-for-drug-safety-and-effectiveness/research/prescription-opioids/JHSPH_OPIOID_EPIDEMIC_REPORT.pdf
- Almaraz, L., Manenschijn, J., Pena, E. De, & Viana, F. (2014). *Handbook of experimental pharmacology* 222.
- Aragón-Poce, F., Martínez-Fernández, E., Márquez-Espinós, C., Pérez, A., Mora, R., & Torres, L. M. (2002). History of opium. *International Congress Series*, 1242, 19-21. [https://doi.org/10.1016/S0531-5131\(02\)00600-3](https://doi.org/10.1016/S0531-5131(02)00600-3)
- Bals-Kubik, R., Ableitner, a, Herz, a, & Shippenberg, T. S. (1993). Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 264(1), 489-495.
- Bardo, M. T., & Bevins, R. A. (2000). Conditioned place preference: What does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*, 153(1), 31-43. <https://doi.org/10.1007/s002130000569>
- Berke, J. D., & Hyman, S. E. (2000). Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*, 25(3), 515-532. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81056-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81056-9)
- Bloom, F. E. (1988). Cellular and Molecular Mechanisms of Drug Dependence. *Science*, 242(4879), 715-723.
- Borsook, D., Becerra, L., Carlezon, W. A., Shaw, M., Renshaw, P., Elman, I., & Levine, J. (2007). Reward-aversion circuitry in analgesia and pain: Implications for psychiatric disorders. *European Journal of Pain*, 11(1), 7-20. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.12.005>
- Bouw, M. R., Gårdmark, M., & Hammarlund-Udenaes, M. (2000). Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of morphine transport across the blood-brain barrier as a cause of the antinociceptive effect delay in rats--a microdialysis study. *Pharmaceutical Research*, 17(10), 1220-1227. <https://doi.org/10.1023/A:1026414713509>
- Capuron, L., Pagnoni, G., Drake, D. F., Woolwine, B. J., Spivey, J. R., Crowe, R. J., ... Miller, A. H. (2015). Dopaminergic Mechanisms of Reduced Basal Ganglia Responses to Hedonic Reward During Interferon Alfa Administration, 69(10), 1044-1053.
- Casper, D., Yaparpalvi, U., Rempel, N., & Werner, P. (2000). Ibuprofen protects dopaminergic neurons against glutamate toxicity in vitro. *Neuroscience Letters*, 289(3), 201-204. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01294-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01294-5)
- Christrup, L. L. (1997). Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 41, 116-122. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.1997.tb04625.x>
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(7), 374 <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>

- Ciccocioppo, R., Sanna, P. P., & Weiss, F. (2001). Cocaine-predictive stimulus induces drug-seeking behavior and neural activation in limbic brain regions after multiple months of abstinence: Reversal by D1 antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1976-1981. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1976>
- CONADIC. (2012). Encuesta Nacional De Adicciones 2012. *Adicciones*, 1, 34. Retrieved from <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/DOCSAL7326.pdf>
- Cong, H. H., Khaziakhmetova, V. N., & Zigashina, L. E. (2015). Rat paw oedema modeling and NSAIDs: Timing of effects. *International Journal of Risk & Safety in Medicine*. <https://doi.org/10.3233/jrs-150697>
- Contet, C., Kieffer, B. L., & Befort, K. (2004). Mu opioid receptor: A gateway to drug addiction. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(3), 370-378. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.05.005>
- Cooper, S., Robison, A. J., & Mazei-Robison, M. S. (2017). Reward Circuitry in Addiction. *Neurotherapeutics*. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0525-z>
- Corkery, J., Claridge, H., Loi, B., Goodair, C., Schifano, F., & Deaths, S. A. (2013). Drug-related deaths in the UK : 2012 Annual Report 2013 National Programme on Substance Abuse Deaths Annual Report 2013 on deaths between, (December 2012).
- De Gregori, S., De Gregori, M., Ranzani, G. N., Allegri, M., Minella, C., & Regazzi, M. (2012). Morphine metabolism, transport and Brain disposition. *Metabolic Brain Disease*, 27(1), 1-5. <https://doi.org/10.1007/s11011-011-9274-6>
- de Paiva, V. N., Lima, S. N. P., Fernandes, M. M., Soncini, R., Andrade, C. A. F., & Giusti-Paiva, A. (2010). Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. *Behavioural Brain Research*, 215(1), 146-151. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.07.015>
- De Reijke, T. M., Vos, P. C. N., De Boer, E. C., Bevers, R. F. M., de Muinck Keizer, W. H., Kurth, K. H., & Schamhart, D. H. J. (1993). Cytokine production by the human bladder carcinoma cell line T24 in the presence of bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Urological Research*, 21(5), 349-352.
- DeLeo, J. A., & Yeziarski, R. P. (2001). The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain*. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(00\)00490-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(00)00490-5)
- Dershwitz, M., Walsh, J. L., Morishige, R. J., Connors, P. M., Rubsamen, R. M., Shafer, S. L., & Rosow, C. E. (2000). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled versus intravenous morphine in healthy volunteers. *Anesthesiology*, 93(3), 619-628.
- Di Chiara, G., & Bassareo, V. (2007). Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(1), 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.11.003>
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(14), 5274-5278. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>
- DI ROSA, M. (1972). Biological properties of carrageenan. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 24(2), 89-102. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1972.tb08940.x>
- Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118(2), 503-508. <https://doi.org/10.1378/chest.118.2.503>
- Dowell, D., Haegerich, T. M., & Chou, R. (2016). CDC guideline for prescribing opioids for chronic pain-United States, 2016. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 315(15), 1624-1645. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.1464>

- Droney, J. M., Gretton, S. K., Ross, J. R., Sato, H., Welsh, K., Riley, J., London, L. U. K. (2008). Opioid receptors and analgesic response to morphine in cancer patients. *Annals of Oncology*, 19(58), viii273.
- Dunn, K. M., Saunders, K. W., Rutter, C. M., Banta-Green, C. J., Merrill, J. O., Sullivan, M. D., Korff, M. Von. (2010). Opioid Prescriptions for Chronic Pain and Overdose: A Cohort Study. *Annals of Internal Medicine*, 152, 85-92. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-152-2-201001190-00006>
- Eisenberger, N. I., Berkman, E. T., Inagaki, T. K., Rameson, L. T., Mashal, N. M., & Irwin, M. R. (2010). Inflammation-induced anhedonia: Endotoxin reduces ventral striatum responses to reward. *Biological Psychiatry*, 68(8), 748-754. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.06.010>
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2017). European Drug Report 2017: Trends and Developments. *European Monitoring of Drugs and Drugs Addiction*. <https://doi.org/10.2810/88175>
- Felger, J. C., Li, Z., Haroon, E., Woolwine, B. J., Jung, M. Y., Hu, X., & Miller, A. H. (2016). Inflammation is associated with decreased functional connectivity within corticostriatal reward circuitry in depression. *Molecular Psychiatry*, 21(10), 1358-1365. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.168>
- Fisher, G. L., & A. Roget, N. (2009). Encyclopedia of Substance Abuse Prevention, Treatment & Recovery. (G. L. Fisher & N. A. Roget, Eds.). Los Angeles, California: SAGE Publications, Inc. Retrieved from [https://the-eye.eu/public/Books/Medical/texts/Encyclopedia of Substance Abuse Prevention%20 Treatment and Recovery - G. Fisher%2C N. Roget %28Sage%2C 2009%29 WW.pdf](https://the-eye.eu/public/Books/Medical/texts/Encyclopedia%20of%20Substance%20Abuse%20Prevention%20Treatment%20and%20Recovery%20-%20G.%20Fisher%20N.%20Roget%20Sage%202009%29%20WW.pdf)
- Gao, X., Chen, H., Schwarzschild, M. A., & Ascherio, A. (2011). Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. *Neurology*, 76(10), 863-869. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31820f2d79>
- Gendron, L., Cahill, C. M., von Zastrow, M., Schiller, P. W., & Pineyro, G. (2016). Molecular Pharmacology of -Opioid Receptors. *Pharmacological Reviews*, 68(3), 631-700. <https://doi.org/10.1124/pr.114.008979>
- Glare, P., & Walsh, T. (2002). Clinical Pharmacokinetics of Morphine: Therapeutic Drug Monitoring. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy*, Vol. 16(4) 200, 16(4), 5-18. Retrieved from http://journals.lww.com/drug-monitoring/Abstract/1991/01000/Clinical_Pharmacokinetics_of_Morphine.1.aspx
- Gomes, T., Mamdani, M. M., Dhalla, I. A., Michael Paterson, J., & Juurlink, D. N. (2011). Opioid dose and drug-related mortality in patients with nonmalignant pain. *Archives of Internal Medicine*, 171(7), 686-691. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2011.117>
- Gong, L., & Middleton, R. K. (1992). Sublingual administration of opioids. *Annals of Pharmacotherapy*. 26:1525-1527
- Guay, J., Bateman, K., Gordon, R., Mancini, J., & Riendeau, D. (2004). Carrageenan-induced Paw Edema in Rat Elicits a Predominant Prostaglandin E2 (PGE2) Response in the Central Nervous System Associated with the Induction of Microsomal PGE2 Synthase-1. *JBC*, 279(23), 24866-24872. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403106200>
- Guevara-López, U., Covarrubias-gómez, A., Rodríguez-cabrera, R., Carrasco-rojas, A., Aragón, G., & Ayón-Villanueva, H. (2007). Parámetros de práctica para el manejo de dolor en México. *Cirujía y Cirujanos*, (5), 385-407.
- Harstall, C., & Ospina, M. (2003). How Prevalent Is Chronic Pain? *International Association for the Study of Pain*, 11(2), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2010.07.002>
- Hein, A. M., & O'Banion, M. K. (2009). Neuroinflammation and memory: The role of prostaglandins. *Molecular Neurobiology*, 40(1), 15-32. <https://doi.org/10.1007/s12035-009-8066-z>

- Henriksen, G., & Willoch, F. (2008). Imaging of opioid receptors in the central nervous system. *Brain*, 131(5), 1171-1196. <https://doi.org/10.1093/brain/awm255>
- Herlitze, S., Garcia, D. E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1996). Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/380258a0>
- Hnasko, T. S., Sotak, B. N., & Palmiter, R. D. (2005). Morphine reward in dopamine-deficient mice. *Nature*, 438(7069), 854-857. <https://doi.org/10.1038/nature04172>
- Hyman, S. E., & Malenka, R. C. (2001). Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(10), 695-703. <https://doi.org/10.1038/35094560>
- International Association for the Study of Pain. (1986). Classification of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. *Pain*, 3(Supp 3), S1-S226. <https://doi.org/j.pain.0000000000000613>
- Keith, D. E., Anton, B., Murray, S. R., Zaki, P. a, Chu, P. C., Lissin, D. V, von Zastrow, M. (1998). mu-Opioid receptor internalization: opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism in vitro and in the mammalian brain. *Molecular Pharmacology*, 53(3), 377-384. <https://doi.org/10.1124/mol.53.3.377>
- Kieffer, B. L., & Gavériaux-Ruff, C. (2002). Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00008-4](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00008-4)
- Kiessling, F., Pichler, B. J., & Hau, P. (2017). *Small Animal Imaging*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-42202-2>
- Klein, D. A., & Greenfield, D. P. (1999). Chronic benign pain. *CNS Spectrums*. <https://doi.org/10.1017/S1092852900012141>
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (2001). Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*, 24(2), 97-129. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00195-0](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00195-0)
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (2008). Addiction and the Brain Antireward System. *Annual Review of Psychology*, 59(1), 29-53. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.59.103006.093548>
- Le Merrer, J., Becker, J. A. J., Befort, K., & Kieffer, B. L. (2009). Reward Processing by the Opioid System in the Brain. *Physiological Reviews*, 89(4), 1379-1412. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2009>
- Loeser, J., Arendt-Nielsen, L., Baron, R., Basbaum, A., Bond, M., Breivik, H., Woda, A. (2011). Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. *Classification of Chronic Pain* (pp. 209-214). [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(86\)90113-2](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(86)90113-2)
- López-Guzmán, J., Pazos-Alvarado, R. E., Moyao-García, D., & Galicia-Núñez, A. A. (2013). Prevalencia e incidencia del dolor en los pacientes hospitalizados en el Hospital Infantil de México «Federico Gómez» en un periodo de seis meses. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 36(2), 93-97.
- Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2011). Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron*, 69(4), 650-663. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.017>. Drug-evoked
- Middleton, J., McGrail, S., & Stringer, K. (2016). Drug related deaths in England and Wales. *BMJ*, i5259. <https://doi.org/10.1136/bmj.i5259>
- Miller, M., Barber, C. W., Leatherman, S., Fonda, J., Herмос, J. A., Cho, K., & Gagnon, D. R. (2015). Prescription opioid duration of action and the risk of unintentional overdose among patients receiving opioid therapy. *JAMA Internal Medicine*, 175(4), 608-615. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2014.8071>

- Mitsi, V., & Zachariou, V. (2016). Modulation of pain, nociception, and analgesia by the brain reward center. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.017>
- Morales, M., & Margolis, E. B. (2017). Ventral tegmental area: Cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.165>
- Naranjo, C. A., Tremblay, L. K., & Busto, U. E. (2001). The role of the brain reward system in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 25(4), 781-823. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(01\)00156-7](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(01)00156-7)
- Narita, M., Kishimoto, Y., Ise, Y., Yajima, Y., Misawa, K., & Suzuki, T. (2005). Direct evidence for the involvement of the mesolimbic κ -opioid system in the morphine-induced rewarding effect under an inflammatory pain-like state. *Neuropsychopharmacology*, 30(1), 111-118. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300527>
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., & Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiological Reviews*, 79(4), 1193-1226. [https://doi.org/10.1016/0928-4680\(94\)90096-5](https://doi.org/10.1016/0928-4680(94)90096-5)
- Nestler, E. J. (1996). Under siege: The brain on opiates. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80110-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80110-5)
- Nestler, E. J. (2001). Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(2), 119-128. <https://doi.org/10.1038/35053570>
- Nestler, E. J., & Aghajanian, G. K. (1997). Molecular and cellular basis of addiction. *Science*, 278(5335), 58-63. <https://doi.org/10.1126/science.278.5335.58>
- Nielsen, S., Larance, B., Degenhardt, L., Gowing, L., Kehler, C., Lintzeris, N., Lintzeris, N. (2016). Opioid agonist treatment for pharmaceutical opioid dependent people (Review) Opioid agonist treatment for pharmaceutical opioid dependent people, (5). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011117>. pub2. Copyright
- Nugent, F. S., Niehaus, J. L., & Kauer, J. A. (2009). PKA signaling in LTP at GABAergic synapses. *Neuropsychopharmacology*, 34(7), 1829. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06299.x>
- Nugent, F. S., Penick, E. C., & Kauer, J. A. (2007). Opioids block long-term potentiation of inhibitory synapses. *Nature*, 446(7139), 1086-1090. <https://doi.org/10.1038/nature05726>
- Ochiai, W., Kaneta, M., Nagae, M., yuzuhara, A., Li, X., Suzuki, H., Sugiyama, K. (2016). Mice with neuropathic pain exhibit morphine tolerance due to a decrease in the morphine concentration in the brain. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92, 298-304. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.03.019>
- Oliveira, C. M. B. de, Kimiko Sakata, R., Machado Issy, A., Roberto Gerola, L., & Salomão, R. (2011). Cytokines and pain. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61(2), 260-265. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0034-70942011000200014>
- Oroszi, G., & Goldman, D. (2004). Alcoholism: genes and mechanisms. *Pharmacogenomics*, 5(8), 1037-1048. <https://doi.org/10.1517/14622416.5.8.1037>
- Pathan, H., & Williams, J. (2012). Basic opioid pharmacology: an update. *British Journal of Pain*, 6(1), 11-16. <https://doi.org/10.1177/2049463712438493>
- Peciña, M., Love, T., Stohler, C. S., Goldman, D., & Zubieta, J. K. (2015). Effects of the mu opioid receptor polymorphism (OPRM1 A118G) on pain regulation, placebo effects and associated personality trait measures. *Neuropsychopharmacology*, 40(4), 957-965. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.272>
- Reyes Chiquete, D., Guillen Núñez, R., Alcázar Olan, R., & Arias Santiago, M. (2006). Epidemiología del dolor por cáncer. *Cancero*, 1, 233-244.
- Rudd, R. A., Aleshire, N., Zibbell, J. E., & Matthew Gladden, R. (2016). Increases in Drug and Opioid Overdose Deaths - United States, 2000-2014. *American Journal of Transplantation*, 16(4), 1323-1327. <https://doi.org/10.1111/ajt.13776>

- Saal, D., Dong, Y., Bonci, A., & Malenka, R. C. (2003). Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron*, 37(4), 577-582. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00021-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00021-7)
- Salamone, J. D., Correa, M., Farrar, A., & Mingote, S. M. (2007). Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. *Psychopharmacology*, 191(3), 461-482. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0668-9>
- Secretaría de Salud de Mexico. (2010). Cuidados Paliativos GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA gpc. Retrieved from www.cenetec.salud.gob.mx
- Services, H., & Control, D. (2017). Annual Surveillance Drug-Related Risks and Outcomes-United State, 2017.
- Sesack, S. R., Carr, D. B., Omelchenko, N., & Pinto, A. (2003). Anatomical Substrates for Glutamate-Dopamine Interactions: Evidence for Specificity of Connections and Extrasynaptic Actions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1003, 36-52. <https://doi.org/10.1196/annals.1300.066>
- Sharma, A., Fish, B. L., Moulder, J. E., Medhora, M., Baker, J. E., Mader, M., & Cohen, E. P. (2014). Safety and blood sample volume and quality of a refined retro-orbital bleeding technique in rats using a lateral approach. *Laboratory Animal*. <https://doi.org/10.1038/labon.432>
- Shimomura, K., Kamata, O., Ueki, S., Ida, S., Oguri, K., Yoshimura, H., & Tsukamoto, H. (1971). Analgesic effect of morphine glucuronides. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 105(1), 45-52. <https://doi.org/10.1620/tjem.105.45>
- Smith, D. E. (2012). Editor's note: The process addictions and the New ASAM definition of addiction. *Journal of Psychoactive Drugs*, 44(1), 1-4. <https://doi.org/10.1080/02791072.2012.662105>
- Smith, H. S. (2009). Opioid metabolism. *Mayo Clinic Proceedings*, 84(7), 613-624. <https://doi.org/10.4065/84.7.613>
- Statement, P. P. (2011). American Society of Addiction Medicine Public Policy Statement : Definition of Addiction, 1-8.
- Streicher, J. M., & Bilsky, E. J. (2017). Peripherally Acting μ -Opioid Receptor Antagonists for the Treatment of Opioid-Related Side Effects: Mechanism of Action and Clinical Implications. *Journal of Pharmacy Practice*. <https://doi.org/10.1177/0897190017732263>
- Suzuki, T., Kishimoto, Y., & Misawa, M. (1996). Formalin- and carrageenan-induced inflammation attenuates place preferences produced by morphine, methamphetamine and cocaine. *Life Sciences*, 59(19), 1667-1674. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(96\)00498-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00498-5)
- Swardfager, W., Rosenblat, J. D., Benlamri, M., & McIntyre, R. S. (2016). Mapping inflammation onto mood: Inflammatory mediators of anhedonia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 64, 148-166. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.02.017>
- Taylor, A. M. W., Castonguay, A., Taylor, A. J., Murphy, N. P., Ghogha, A., Cook, C., Cahill, C. M. (2015). Microglia Disrupt Mesolimbic Reward Circuitry in Chronic Pain. *Journal of Neuroscience*, 35(22), 8442-8450. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4036-14.2015>
- Thorn, C. F., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2009). Codeine and morphine pathway. *Pharmacogenetics and Genomics*, 19(7), 556-558. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32832e0eac>
- Tomek, S. E., Stegmann, G. M., & Olive, M. F. (2018). Effects of heroin on rat prosocial behavior. *Addiction Biology*. <https://doi.org/10.1111/adb.12633>
- Trang, T., Al-Hasani, R., Salvemini, D., Salter, M. W., Gutstein, H., & Cahill, C. M. (2015). Pain and Poppies: The Good, the Bad, and the Ugly of Opioid Analgesics. *Journal of Neuroscience*, 35(41), 13879-13888. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2711-15.2015>
- van Ree, J. M., Gerrits, M. a, & Vanderschuren, L. J. (1999). Opioids, reward and addiction: An encounter of biology, psychology, and medicine. *Pharmacological Reviews*, 51(2), 341-396. [https://doi.org/10.1016/S0924-977X\(98\)80013-8](https://doi.org/10.1016/S0924-977X(98)80013-8)

- Vanderah, T. W., Ossipov, M. H., Lai, J., Malan, T. P., & Porreca, F. (2001). Mechanisms of opioid-induced pain and antinociceptive tolerance: Descending facilitation and spinal dynorphin. *Pain*, *92*(1–2), 5–9. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(01\)00311-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(01)00311-6)
- Varga, E. V., Yamamura, H. I., Rubenzik, M. K., Stropova, D., Navratilova, E., & Roeske, W. R. (2003). Molecular mechanisms of excitatory signaling upon chronic opioid agonist treatment. *Life Sciences*, *74*(2-3), 299–311. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.017>
- Villatoro-Velázquez, J., Medina-Mora, M., Fleiz-Bautista, C., Téllez-Rojo, M., Mendoza-Alvarado, L., & Romero-Martínez, M. (2012). Encuesta Nacional de Adicciones 2011. *Drogas Ilícitas*. (Vol. 28). p8-16 <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Wahlström, A., Winblad, B., Bixo, M., & Rane, A. (1988). Human brain metabolism of morphine and naloxone. *Pain*, *35*(2), 121–127. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90219-9](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90219-9)
- Waldhoer, M., Bartlett, S. E., & Whistler, J. L. (2004). Opioid Receptors. *Annual Review of Biochemistry*, *73*(1), 953-990. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073940>
- Wang, D., Tawfik, V. L., Corder, G., Low, S. A., François, A., Basbaum, A. I., & Scherrer, G. (2018). Functional Divergence of Delta and Mu Opioid Receptor Organization in CNS Pain Circuits. *Neuron*, 90–108. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.002>
- Wang, Y. P., Wei, S. G., Zhu, Y. S., Zhao, B., Xun, X., & Lai, J. H. (2015). Dopamine receptor D1 but not D3 essential for morphine-induced conditioned responses. *Genetics and Molecular Research*, *14*(1), 180-189. <https://doi.org/10.4238/2015.January.16.1>
- Warner, M., Chen, L. H., & Makuc, D. M. (2009). Increase in fatal poisonings involving opioid analgesics in the United States, 1999-2006. *NCHS Data Brief*, *127*(22), 1-8.
- World Health Organisation. (1996). Cancer Pain Relief: a guide to opioid availability. *The Journal of Infectious Diseases*, *204*(7), 63. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir579>
- Yamashita, M., Shinohara, T., Tsuji, S., Myrvik, Q. N., Nishiyama, A., Henriksen, R. A., & Shibata, Y. (2007). Catalytically inactive cyclooxygenase 2 and absence of prostaglandin E2 biosynthesis in murine peritoneal macrophages following in vivo phagocytosis of heat-killed *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md :1950), *179*(10), 7072-7078. <https://doi.org/10.1093/jir579> [pii]
- Yeh, S. Y., Gorodetzky, C. W., & Krebs, H. A. (1977). Isolation and identification of morphine 3- and 6-glucuronides, morphine 3,6-diglucuronide, morphine 3-etheral sulfate, normorphine, and normorphine 6-glucuronide as morphine metabolites in humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *66*(9), 1288-1293. <https://doi.org/10.1002/jps.2600660921>
- Yirmiya, R. (1996). Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. *Brain Research*, *711*(1-2), 163-174. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01415-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01415-2)
- Zhang, Z., Xu, F., Zhang, C., & Liang, X. (2007). Activation of opioid μ receptors in caudal medullary raphe region inhibits the ventilatory response to hypercapnia in anesthetized rats. *Anesthesiology*, *107*(2), 288-297. <https://doi.org/10.1097/01.anes.0000270760.46821.67>

