

Efecto Subagudo de la Administración Subcutánea de Morfina en la Apoptosis Neuronal en Corteza Cerebral de Ratones Machos CF-1

Effect of Subacute Administration of Subcutaneous Morphine in the Neuronal Apoptosis in the Brain Cortex of Male CF-1 Mice

Quilodrán, Javier ⁽¹⁾; Miranda, Antonio ⁽²⁾; Moller, Germán ⁽²⁾; Orellana, Javier ⁽²⁾; Yumha, María José ⁽²⁾; Vicente, José Miguel ⁽²⁾; Morales, Andrea ⁽³⁾; Jiménez, Leonella ⁽¹⁾.

Resumen

La prevalencia de dolor crónico moderado a severo es elevada, tanto en pacientes oncológicos como no oncológicos y la principal herramienta en su manejo es la administración de opioides, especialmente morfina. Este tratamiento es efectivo en el efecto analgésico, pero presenta toxicidad renal y hepática, entre otras. En trabajos previos se ha reportado que las sustancias producen efectos tóxicos en el sistema donde actúan. Por lo tanto, es necesario estudiar sus efectos tóxicos a nivel del sistema nervioso central, especialmente en los mecanismos de muerte celular. En la presente investigación se estudia el efecto de una administración subaguda de morfina por vía subcutánea en la apoptosis neuronal en la corteza cerebral de ratones machos CF-1. El diseño experimental incluyó 4 grupos experimentales: control negativo, control positivo (vehículo), grupo modelo dolor (inyección plantar de formalina) y grupo experimental (morfina 10% 0,6 ml c/6 horas por 48 horas). Luego de 48 horas se sacrificaron para extraer sus cerebros, los que fueron cortados, fijados y teñidos con técnica corriente (H&E), para analizar morfológicamente la muerte celular. Además, se realizó tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anticaspasa-3 para evidenciar la apoptosis como mecanismo de muerte celular. En los cortes se contaron el número de células muertas del total de células en un área determinada, para obtener el porcentaje de células apoptóticas en cada grupo. Los resultados indican la presencia de una diferencia significativa en los niveles de apoptosis del grupo experimental en comparación con el grupo control negativo, sin embargo, la diferencia es mayor entre el grupo modelo dolor versus grupo experimental tanto como con el grupo control negativo. Las células muertas fueron positivas a la tinción inmunohistoquímica con anticaspasa 3. Los resultados sugieren la existencia de un efecto neurotóxico vía apoptosis en la corteza cerebral de la morfina que, sin embargo, es menor que el producido por el dolor en el grupo con un modelo de dolor, lo que confirmaría el beneficio de la terapia analgésica activa. Esto nos permite conocer nuevos mecanismos de toxicidad y teóricamente, permitir desarrollar terapias más seguras y efectivas a largo plazo.

Palabras clave: Morfina, apoptosis, corteza cerebral.

Summary

The prevalence of moderate to severe chronic pain is high in the oncologic and no oncologic patient, and the gold standard of treatment for the pain management is the administration of opioids, especially morphine. This treatment is effective in the analgesic effect, but it has a renal and hepatic toxicity, among others. In previous papers it has been reported that the substances have produced toxicity in the systems where they produce their effect. Therefore it is necessary to study its toxic effect at a central nervous system, especially its cell death mechanism. In the present investigation it was studied the effect of subacute administration of subcutaneous morphine in the neuronal apoptosis in the brain cortex of male CF-1 mice. For this purpose 4 experimental groups were used: negative control, positive control (vehicle), pain model group and the experimental group (morphine 10% 0,6 ml every/6 hours per 48 hours). After 48 hours they were euthanased in order to remove their brains and then they were sliced, which were fixed and stained with routine technique (H&E), to morphologically analyze the cell death. Besides, it was performed immunohistochemistry stained with anticaspase 3 antibodies to demonstrate the cell death mechanism via apoptosis. In the slices it was counted the number of death cells from a total of cells in a determined area, for obtaining the percent of apoptotic cells in each group. Results indicate the presence of a significant difference in the apoptosis level from the experimental group, in comparison with negative control group, however the difference is greater in the pain model group versus experimental group and even greater versus negative control group. Dead cells were positive in anticaspase 3 antibody stain. Results suggest the existence of a neurotoxic effect via apoptosis in the cerebral cortex of the morphine, nevertheless is significantly fewer in comparison with pain group, which would confirm the benefits of active analgesic therapy. It allows to know new toxicity mechanism and theoretically it would permit develop a safer and effective long term therapies.

Key words: Morphine, apoptosis, cerebral cortex.

(1) Laboratorio de Neurobiología del Dolor, Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

(2) Alumnos Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

(3) Magister en Bioestadística, Universidad de Chile.

1. Introducción

Los fármacos opioides son indispensables en el manejo de dolor tanto agudo como crónico, de intensidad moderada a severa, en numerosas patologías. Sin embargo, se ha evidenciado en clínica que su uso repetido en el tiempo puede llevar al desarrollo de fenómenos de tolerancia analgésica. Los mecanismos neurobiológicos subyacentes al desarrollo de la tolerancia a los opioides son multifacéticos y solo parcialmente

conocidos. Los primeros estudios respecto al tema han indicado que la apoptosis neuronal en algunas regiones del asta dorsal de la médula espinal estaría relacionada con la tolerancia a la analgesia opioide (1).

Los principales estudios biomoleculares relacionados con el desarrollo de tolerancia han mostrado que el receptor NMDA, un subgrupo de receptores de glutamato, estarían relacionados con el desarrollo de tolerancia a opioides, en especial con tolerancia relacionada con el receptor mu de opioides (2, 3) y esto estaría en directa relación con la prolongación en el tiempo de la administración de morfina (4,5).

Además, existiría una interrelación entre los mecanismos celulares responsables de la tolerancia a opioides y el dolor neuropático, sugiriendo que un mecanismo común podría estar envuelto en el desarrollo de ambos fenómenos (6). La activación de los receptores NMDA podrían responder a este mecanismo común, ya que existe evidencia que demostraría que el daño de nervios periféricos activaría los receptores NMDA a nivel de médula espinal, resultando en un severo y refractario dolor neuropático, secundario a activación de procesos de apoptosis neuronal (7).

La apoptosis es un mecanismo genéticamente determinado de muerte celular programada, que se puede activar por una serie de estímulos internos o externos. Los estudios de los complejos mecanismos moleculares y bioquímicos relacionados con la apoptosis han revelado que esta vía de muerte celular requiere de la activación secuencial de una cascada de cisteína-proteasas intracelulares, denominadas caspasas (8). De las más de 12 caspasas identificadas en humanos, la caspasa 3 juega un rol central en la concreción del fenómeno apoptótico (9).

Algunos estudios iniciales demostraron que los opioides inducían apoptosis en células neuronales in vitro expuestas a agonistas de receptores mu y kappa de opioides en cultivos neuronales (10) y en líneas celulares específicas, aumentando su vulnerabilidad a morir por mecanismos apoptóticos (11, 12, 13, 14, 15). Estudios posteriores relacionarían el fenómeno apoptótico con la inducción de tolerancia a opioides desde un punto de vista funcional (1, 16). Otros estudios han demostrado que el tratamiento crónico en ratas con morfina (tolerantes y dependientes) está asociado con modulación diferencial de dos proteínas cerebrales claves en la regulación de la muerte celular programada a nivel neuronal, el receptor del ligando Fas (Fas receptor) con efecto proapoptótico, así como de BCL-2, una oncoproteína de efecto antiapoptótico (17, 18). En forma complementaria, se ha demostrado que in vivo ocurre apoptosis neuronal en médula espinal y núcleo dorsal del rafe, luego de tratamientos crónicos con morfina (16, 19).

Los estudios que evalúan los mecanismos de toxicidad inducida por morfina centran la atención sobre los efectos de tolerancia a opioides, sin embargo, no hay comparación con los mismos fenómenos tóxicos inducidos por el dolor, en cuanto a la activación de los mecanismos de muerte celular programada.

La presente investigación intenta evaluar los efectos de una administración subaguda de morfina a nivel de corteza cerebral de ratones, en comparación con los mismos efectos inducido por la presencia dolor, a través de un modelo animal de dolor agudo, observando la presencia de muerte neuronal morfológicamente, y mediante técnica inmunohistoquímica evidenciar la presencia de apoptosis, evaluando si existen diferencias entre los efectos del opioide y del dolor sobre las neuronas corticales.

Material y Método

Animales

Se utilizaron 16 ratones machos cepa CF-1, de 3 meses de edad (20-30 g), provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, mantenidos bajo condiciones estándar de bioterio, con comida y agua ad libitum, cuyo manejo fue aprobado por el Comité de Ética para Investigación con Animales de la misma institución.

Reactivos y Fármacos

Se utilizó para el grupo experimental morfina clorhidrato 10% (Biosano®), diluida en solución fisiológica 0,9% (Fresenius Kabi®). La misma solución fisiológica fue utilizada como control positivo (vehículo). Para el modelo de dolor se utilizó formaldehído 4% (formalina 10%), tamponada pH 6,9 para uso en histología. Para la sedación de los ratones se utilizó ketamina (Biosano®). Los reactivos para técnicas de rutina (hematoxilina-eosina) fueron obtenidos con un alto grado de pureza de distintas fuentes comerciales. Para la técnica inmunohistoquímica se utilizó anticuerpo anti-caspasa 3 (CPP32, LabVision™), según instrucciones de uso del kit por el fabricante.

Diseño experimental

Los 16 ratones fueron distribuidos en cuatro grupos: 1) Control negativo: no se les administró sustancia alguna. 2) Control positivo: se aplicó 0,1 ml de solución fisiológica 0,9% cada 6 horas por 48 horas en base de la cola, mediante inyección subcutánea. 3) Grupo modelo dolor: se aplicó una inyección intraplantar en extremidad inferior izquierda de 0,1 ml de formalina 10% por una vez. 4) Grupo morfina: se aplicó 0,1 ml de morfina 10% diluida en solución fisiológica 0,9% llevada a una concentración del 1%, en dosis de 5 mg/kg, cada 6 horas por 48 horas (dosis terapéutica en ratones 5 mg/kg SC) en base de la cola, mediante inyección subcutánea.

Los ratones fueron anestesiados mediante una dosis de ketamina al 5% (150 mg/kg vía intramuscular) y sacrificados mediante dislocación cervical. Todos los grupos fueron sacrificados a las 48 horas de mantenerlos en las mismas condiciones de Bioterio. Los encéfalos fueron removidos y fijados en una solución de formalina 10%, en buffer fosfato (pH 7,2) por 12 días y luego impregnados en parafina. Se obtuvieron cortes coronales seriados de 5 micrones, que fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Los cortes obtenidos se estudiaron, identificando el área correspondiente a la corteza cerebral somatosensorial, según Atlas de Paxinos & Watson (20). Para la técnica inmunohistoquímica, los cortes fueron desparafinados y teñidos según las instrucciones del fabricante, con anticuerpo anti-caspasa 3. Los cortes fueron finalmente montados y evaluados con microscopio óptico con objetivo grillado, y se obtuvieron microfotografías de los mismos para su posterior análisis.

Conteo de neuronas y análisis de resultados

Se realizó el conteo de neuronas, considerando neuronas muertas o degeneradas aquellas que presentaban marcada eosinofilia en soma y dendrita apical y retracción nuclear, con apariencia de grumos, según criterios en estudios previos (21, 22). Se realizaron 150 microfotografías de sendos cortes de cada hemisferio en la zona de la corteza somatosensorial, de cada uno de los ratones de los grupos estudiados. El conteo del número de neuronas vivas y muertas de cada microfotografía

fue realizado en forma ciega por dos observadores independientes, registrando como valor final el promedio de la observación de cada una de las microfotografías, así como un promedio del porcentaje de neuronas muertas respecto al total de neuronas observadas, análisis que se realizó comparando capas superficiales y capas profundas de la corteza cerebral. La observación de la positividad a la tinción inmunohistoquímica se realizó y registró en forma cualitativa. Para cada grupo se obtuvieron valores promedios y desviaciones estándares, siendo analizadas las diferencias estadísticas con Test de Kruskal-Wallis, con significancia de $p < 0,05$.

Resultados

Análisis morfológico

Las Figuras 1 y 2 corresponden a microfotografías de la corteza somatosensorial de ratones del grupo control negativo y grupo morfina respectivamente. Se evidencian las características distintivas del tejido nervioso a la tinción con hematoxilina-eosina, destacando la presencia de neuronas con sus característicos nucléolos y citoplasma eosinófilo. Se muestra la localización de neuronas muertas, con su eosinofilia y cambios nucleares característicos. Se logra apreciar la diferencia en

Figura 1. Microfotografía de corteza cerebral (área somatosensorial) de ratones grupo control negativo, con tinción corriente con hematoxilina-eosina. Se muestran las características morfológicas de las neuronas en proceso de muerte celular (flechas). (x60)

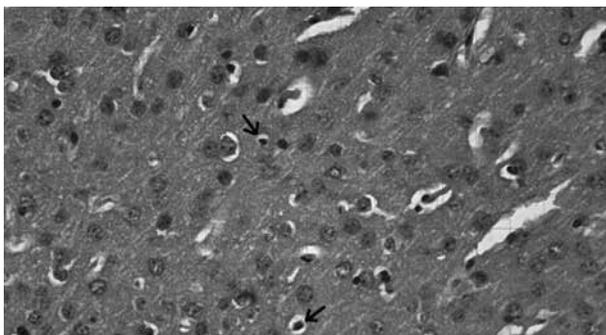
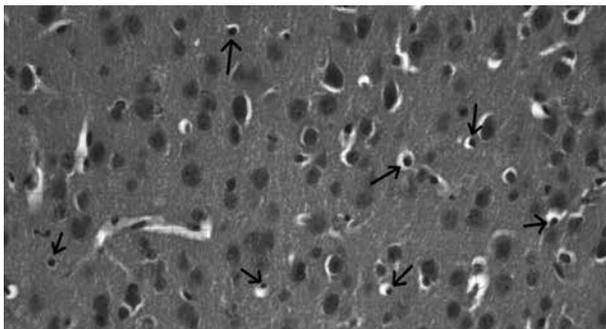


Figura 2. Microfotografía de corteza cerebral (área somatosensorial) de ratones grupo morfina, con tinción corriente con hematoxilina-eosina. Se muestran las características morfológicas de las neuronas en proceso de muerte celular (flechas). (x60)



la cantidad de neuronas con características de muerte celular respecto al total de neuronas de cada corte.

Análisis inmunohistoquímico

La figura 3 muestra la tinción inmunohistoquímica que muestra la positividad a la presencia de caspasa 3 activada en el citoplasma neuronal, que destaca aquellas zonas donde esta enzima presenta su isoforma activada.

Porcentaje de neuronas muertas

El gráfico 1 muestra el porcentaje de neuronas muertas respecto al total de neuronas observadas en cada uno de los grupos experimentales.

Análisis estadístico

El primer análisis realizado permitió validar al grupo observador, evidenciando que no había diferencia significativa en los resultados obtenidos entre los observadores de cada uno de los cortes de los grupos experimentales. Además, no se evidenció diferencia entre los resultados obtenidos entre capas superficiales y profundas, por lo que para la evaluación se consideró el resultado de la corteza cerebral en su totalidad.

En cuanto a los grupos en estudio no se evidenció diferencia significativa entre el grupo control negativo y el control positivo ($p=0,073$), ni entre el grupo control positivo y el grupo morfina ($p=0,438$). En cambio, se evidenció mayor porcentaje de muerte neuronal en el grupo morfina respecto al grupo control negativo ($p < 0,005$). En cuanto al grupo de modelo de dolor, el porcentaje de muerte neuronal fue significativamente mayor a todos los otros grupos en estudio ($p < 0,005$).

Figura 3. Microfotografía de corteza cerebral (área somatosensorial) de ratones grupo morfina, con tinción inmunohistoquímica anti-caspasa 3. Detalle de positividad de células con núcleos grumosos y características de muerte celular para el anticuerpo señalado (x140).

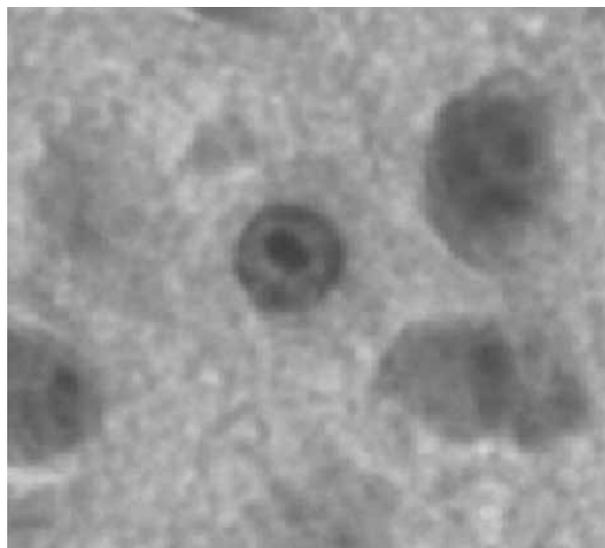
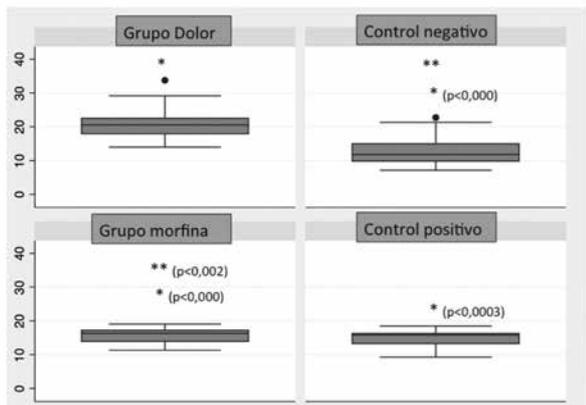


Gráfico 1. Porcentaje de neuronas con morfología de muerte celular según grupo experimental. Se muestra los cuartiles 25 y 75 (caja), mediana (centro de caja) y valores extremos (línea superior e inferior). (*) Diferencia significativa del porcentaje de neuronas muertas del grupo dolor respecto a los grupos morfina y controles ($p < 0,005$). (**) Diferencia significativa del porcentaje de neuronas muertas del grupo morfina respecto al grupo control negativo ($p < 0,002$).



Discusión

El presente estudio confirma que existe una influencia de los opioides sobre la sobrevida neuronal, induciendo aumento de la muerte neuronal, que al menos en parte estaría mediada por apoptosis. Sin embargo, demuestra que el efecto de un estímulo doloroso inducido en un modelo animal tiene un mayor efecto en esta sobrevida neuronal que el producido por la morfina. Incluso, si bien la diferencia no es significativa, se evidencia cierta tendencia para pensar que la administración del vehículo a través de inyección subcutánea tendría cierta influencia similar a la producida por el dolor.

Algunos estudios han demostrado la influencia que tiene la morfina sobre la modificación del equilibrio entre factores proapoptóticos y antiapoptóticos a favor de los primeros (17, 18), con lo que influiría en la activación final de los mecanismos de muerte celular programada. Además, otros estudios han sugerido que la morfina disminuye los niveles de HSP 70, proteína que protege a las células de la muerte celular/apoptosis en diferentes escenarios (23). Por otra parte, se ha propuesto que otras vías intracelulares podrían relacionarse con mecanismos activadores de apoptosis inducidos por morfina, incluyendo la inhibición de la óxido nítrico sintetasa (NOS) y la prevención de la activación de las vías intracelulares calcio-dependientes (24, 25, 26, 27). Además, podría modularse el estrés oxidativo no sólo a nivel neuronal, sino también en células gliales (28, 29). Desde el punto de vista de las vías neuronales afectadas, estudios han demostrado que la administración de morfina en forma crónica ocasiona un aumento del tono gabaérgico y subsecuente disminución de la actividad serotoninérgica en sitios como el núcleo dorsal del rafe (30), y esta actividad disminuida participaría en la vía final que lleva al desarrollo de tolerancia a opioides (31). También se ha

comprobado que la mayor parte de las neuronas apoptóticas inducidas por morfina a nivel de médula espinal son neuronas gabaérgicas (1). Se postula que esto podría llevar a ocasionar un importante grado de modulación de los circuitos involucrados en dolor y modulación del dolor, aumentando la sensibilidad al dolor por medio de desinhibición espinal, confirmado por los fenómenos de hiperalgesia inducida por opioides observado en animales (32, 33), así como en humanos (34, 35), lo que vería reforzado por el aumento de citoquinas proinflamatorias derivadas de las glías espinales, como IL-1b (36).

Los estudios han concluido que la apoptosis neuronal es parte del desarrollo de los mecanismos de tolerancia a opioides, lo que implicaría mayor dificultad en su recuperación y mayor probabilidad de exacerbación con las subsecuentes terapias. Además, podría ocasionar cambios en las vías moduladoras del dolor, con cambios permanentes que llevan a fenómenos sensibilización secundarias, con escalada de dosis en forma creciente y desarrollo de dolor refractario. El conocimiento de los sitios de modulación de la tolerancia a opioides, tales como los receptores NMDA, entre otros, podría plantear eventuales objetivos terapéuticos para el control de la tolerancia a opioides.

Finalmente, el presente estudio permite evidenciar morfológicamente la presencia de un aumento del fenómeno de muerte neuronal en el grupo expuesto a morfina que, sin embargo, es superado por el grupo del modelo de dolor. Esto hace interesante plantear que el riesgo del desarrollo de toxicidad neuronal por morfina es compensado por el mayor efecto deletéreo que el propio dolor podría producir. El limitado número de los grupos experimentales y los tiempos breves que debieron realizarse para adaptar el trabajo a los requerimientos de las disposiciones del Comité de Ética explica que no puedan obtenerse mayores conclusiones o inferencias de los resultados, sin embargo deja planteada la duda, y justifica una mayor investigación en profundidad de la ocurrencia del mecanismo de muerte neuronal mediada por apoptosis inducida por morfina, así como su comparación con la producida por el dolor y el lograr evidenciar el efecto de la analgesia adecuada en distintas áreas cerebrales y a distintos intervalos de tiempos, con modelos de administración crónica de opioides, por lo que esta investigación inicial entrega las bases que respaldan y justifican la ampliación del diseño experimental, para hacerlo más homologable a las condiciones clínicas de pacientes expuestos a uso crónico de opioides.

Autor(es) no declaran conflictos de interés en el presente trabajo.

Correspondencia:
 Dr. Javier Quilodrán Peredo
 Unidad de Cuidados Paliativos,
 Hospital San Luis de Buin-Paine,
 Unidad del Dolor y Cuidados Paliativos,
 Oncomed.
 quiloper@hotmail.com

Referencias Bibliográficas

- (1) Mao J, Sung B, Ji RR, Lim G. Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. *J Neurosci* 22: 7650-61 (2002).
- (2) Marek P, Ben Eliyahu S, Gold M, Liebeskind JC. Excitatory amino acid antagonists (kynurenic acid and MK-801) attenuate the development of morphine tolerance in the rat. *Brain Res* 547: 77-81 (1991).
- (3) Elliot K, Minami N, Kolesnikov YA, Pasternak GW, Inturrisi CE. The NMDA receptor antagonists, LY274614 and MK-801, and the nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the mu-opioid morphine but not to kappa opioids. *Pain* 56: 69-75. (1994).
- (4) Mao J. NMDA and opioid receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 30: 289-304. (1999).
- (5) Inturrisi CE. Preclinical evidence for a role of glutamatergic systems in opioid tolerance and dependence. *Semin Neurosci* 9: 110-9. (1997).
- (6) Mayer DJ, Mao J, Holt J, Price DD. Cellular mechanism of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7731-6. (1999)
- (7) Whiteside GT, Munglani R. Cell death in the superficial dorsal horn in a model of neuropathy. *J Neurosci Res* 64: 168-73. (2001).
- (8) Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326, 1-16 (1997).
- (9) Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-42. (1999).
- (10) Goswami R, Dawson SA, Dawson G. Cyclic AMP protects against staurosporine and wortmannin-induced apoptosis and opioid-enhanced apoptosis in both embryonic and immortalized (F-11 kappa7) neurons. *J Neurochem* 70: 1376-82. (1998).
- (11) Yin D-L, Ren X-H, Zheng Z-L, Pu L, Jiang L-Z, Ma L. Etorphine inhibits cell growth and induces apoptosis in SK-N-SH cells: involvement of pertussis toxin-sensitive G proteins. *Neurosci Res* 29: 121-7. (1997).
- (12) Dawson G, Dawson SA, Goswami R. Chronic exposure to kappa-opioids enhances the susceptibility of immortalized neurons (F-11 kappa7) to apoptosis-inducing drugs by a mechanism that may involve ceramide. *J Neurochem* 68: 2363-70. (1997).
- (13) Singhal PC, Kapasi AA, Reddy K, Franki N, Gibbons N, Ding G. Morphine promotes apoptosis in Jurkat cells. *J Leukoc Biol* 66:650-8. (1999).
- (14) Singhal PC, Sharma P, Kapasi AA, Reddy K, Franki N, Gibbons N. Morphine enhances macrophage apoptosis. *J Immunol* 160: 1886-93. (1998).
- (15) Yin D, Mufson RA, Wang R, Shi Y. Fas-mediated cell death promoted by opioids. *Nature* 397: 218. (1999).
- (16) Chakpour M, Nayeibi AR, Doustar Y, Hassanzadeh K. 8-OH-DPAT prevents morphine-induced apoptosis in rat dorsal raphe nucleus: A possible mechanism for attenuating morphine tolerance. *Anesth Analg* 111: 1316-21. (2010).
- (17) Boronat MA, García-Fuster MJ, García-Sevilla JA. Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic BCL-2 oncoprotein in rat brain. *Br J Pharmacol* 134: 1263-70. (2001).
- (18) Hassanzadeh K, Habibi-Asl B, Farajnia S, Roshangar L. Minocycline prevents morphine-induced apoptosis in rat cerebral cortex and lumbar spinal cord: a possible mechanism for attenuating morphine tolerance. *Neurotox Res* 19: 649-59. (2011).
- (19) Hassanzadeh K, Habibi-Asl B, Roshangar L, Nemat M, Ansarin M, Farajnia S. Intracerebroventricular administration of riluzole prevents morphine-induced apoptosis in the rat lumbar spinal cord. *Pharmacol Rep* 62: 664-73. (2010).
- (20) Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2th Edition. Academic Press Inc. New York. (1986).
- (21) Abdel-Rahman A, Abou-Donia S, El-Masry E, Shetty A, Abou-Donia M. Stress and combined exposure to low doses of pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin produce neurochemical and neuropathological alterations in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum. *J Toxicol Environ Health* 67: 163-92. (2004).
- (22) Jiménez L, Quilodrán J, Miranda JP, Rodríguez H. Efecto de dosis única intraperitoneal de cipermetrina en la corteza cerebral somatosensorial de ratones CF-1. *Int J Morphol* 26:19-26. (2008).
- (23) Chen Q, Cui J, Zhang Y, Yu LC. Prolonged morphine application modulates Bax and HSP70 levels in primary rat neurons. *Neurosci Lett* 441: 311-4. (2008).
- (24) Sadowski T, Steinmeyer J. Minocycline inhibits the production of inducible nitric oxide synthase in articular chondrocytes. *J Rheumatol* 28: 336-40. (2001).
- (25) Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* 166: 7527-33. (2001).
- (26) González JC, Egea J, Del Carmen Godino M, Fernández-Gómez FJ, Sánchez-Prieto J, Gandia L, Garcia AG, Jordan J, Hernández-Guijo JM. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca²⁺ signalling in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 26: 2481-95. (2007).
- (27) Singhal PC, Pamarthi M, Shah R, Chandra D, Gibbons N. Morphine stimulates superoxide formation by glomerular mesangial cells. *Inflammation* 18: 293-9. (1994).
- (28) Singhal PC, Sharma P, Kapasi AA, Reddy K, Franki N, Gibbons N. Morphine enhances macrophage apoptosis. *J Immunol* 160: 1886-93. (1998).
- (29) Patel K, Bhaskaran M, Dani D, Reddy K, Singhal PC. Role of heme oxygenase-1 in morphine-modulated apoptosis and migration of macrophages. *J Infect Dis* 187: 47-54. (2003).
- (30) Jolas T, Aghajanian GK. Opioids suppress spontaneous and NMDA-induced inhibitory postsynaptic currents in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro. *Brain Res* 755: 229-45. (1997).
- (31) Nayeibi AR, Charkhpour M. Role of 5-HT(1A) and 5-HT(2) receptors of dorsal and median raphe nucleus in tolerance to morphine analgesia in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 83:203-7. (2006).
- (32) Vanderah TW, Gardell LR, Burgess SE, Ibrahim M, Dogrul A, Zhong CM, Zhang ET, Malan TP Jr, Ossipov MH, Lai J, Porreca F. Dinorphan promotes abnormal pain and spinal opioid antinociceptive tolerance. *J Neurosci* 20: 7074-9. (2000).
- (33) Celerier E, Laulin JO, Corcuff JB, Le Moal M, Simonnet G. Progressive enhancement of delayed hyperalgesia induced by repeated heroin administration: a sensitization process. *J Neurosci* 21:4074-80. (2001).
- (34) Sjogren P, Jonsson T, Jensen NH, Drenck NE, Jensen TS. Hyperalgesia and myoclonus in terminal cancer patients treated with continuous intravenous morphine. *Pain* 55: 93-7. (1993).
- (35) Devulder J. Hyperalgesia induced by high-dose intrathecal sufentanil in neuropathic pain. *J Neurosurg Anesthesiol* 9: 146-8. (1997).
- (36) Johnston IN, Milligan ED, Wieseler-Frank J, Frank MG, Zapata V, Campisi J, Langer S, Martin D, Green P, Flesher M, Leinwand L, Maier SF, Watkins LR. A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine. *J Neurosci* 24: 7353-65. (2004).