



# ACTUALIZACIÓN

## FUNDAMENTOS BIOQUÍMICOS DE LA INMUNOTOXICOLOGÍA DE LOS OPIÁCEOS

Fundamentals of opioids biochemical immunotoxicology

Guillermo Orlando Narváez Quintero<sup>1</sup>, Carlos Arturo Guerrero Fonseca<sup>2</sup>

1. Químico Farmacéutico, MSc en Bioquímica, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Director del Centro de Estudios para el Acondicionamiento Bioquímico y Metabólico. Bogotá, Colombia.
2. MD. MSc en Farmacología, MSc en Genética, PhD. Profesor Asociado, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Correspondencia: [orlandonarvaezq@gmail.com](mailto:orlandonarvaezq@gmail.com)

### Resumen

Se ha descubierto que la morfina, anteriormente conocida como una sustancia de origen vegetal extraída de la amapola, es sintetizada también por el cuerpo humano y hace parte del sistema opioide endógeno. La morfina endógena está involucrada en la regulación negativa del sistema inmune, regresándolo a sus condiciones basales luego de haber sido activado. Las investigaciones experimentales preclínicas y clínicas han mostrado que la administración de morfina conduce a efectos inmunosupresores, inhibiendo la actividad de las células asesinas naturales, la proliferación linfocitaria y la capacidad fagocítica de los polimorfonucleares y monocitos. Adicionalmente esta sustancia altera el patrón de síntesis, secreción y actividad paracrina de citocinas, favoreciendo así la respuesta inmune mediada por anticuerpos (Th2-dependiente) e inhibiendo la respuesta inmune mediada por células (Th1-dependiente). Estos efectos son suprimidos por la naloxona, un antagonista de los receptores  $\mu$ . Al parecer la morfina actúa a través de una nueva variante del receptor  $\mu$  de péptidos opioides denominado  $\mu_3$ , presente en la superficie de las células inmunocíticas. Llama la atención

la similitud entre los efectos inmunotóxicos generados en adictos al opio, VIH negativos, con aquellos observados en pacientes no drogadictos VIH positivos que progresan hacia sida.

**Palabras claves:** morfina, opiáceos, toxicología, sistema inmune, droga de abuso.

**Narváez-Quintero G, Guerrero-Fonseca C.** Fundamentos bioquímicos de la inmunotoxicología de los opiáceos. *Rev.Fac.Med.* 2009; 57: 258-273.

### Summary

Morphine, previously known as a substance of plant origin extracted from poppy flowers, is also produced by the human body as a part of the endogenous opioid system. Endogenous morphine is involved in the regulation of the immune system, helping it return to its baseline state after it has been activated. Clinical and pre-clinical investigations have shown that the administration of morphine leads to immunosuppressive effects, inhibiting the actions of natural killer cells, lymphocyte proliferation and the phagocytic activity of polymorphonuclear cells and monocytes.

Additionally, this substance alters the pattern of synthesis and secretion and the paracrine activity of cytokines, favoring the antibody-mediated immune response (Th2-dependent) and inhibiting cell-mediated immune responses (Th1-dependent). These effects are suppressed by naloxone, an antagonist of the *miu* opioid receptors. Apparently naloxone acts through an isoform called *miu*-3, present at the surface of diverse immune cells.

Remarkably, the immunotoxic effects observed in HIV negative opium addicts are very similar to those observed in non-addict HIV positive patients who progress to AIDS.

**Key words:** morphine, opioid peptides, toxicology, immune system, street drugs.

**Narváez-Quintero G, Guerrero-Fonseca CA.** Fundamentals of opioid biochemical immunotoxicology. *Rev.Fac.Med.* 2009; 57: 258-273.

## Introducción

Con frecuencia, cuando se menciona a la sustancia morfina, automáticamente se piensa en la amapola, en el opio y en las consecuencias sobre la salud cuando es consumida como droga de abuso. Por otro lado, en el contexto clínico, la morfina es sinónimo de analgesia. No obstante, y a pesar de su difundido uso en la práctica médica, sólo recientemente se han comenzado a dilucidar desde el punto de vista bioquímico otros efectos sobre el organismo, especialmente aquellos relacionados con la homeostasis del sistema inmune.

Desde el siglo XIX y comienzos del siglo XX ya eran reconocidas las serias complicaciones microbiológicas que traía consigo la adicción al opio y de hecho hoy en día hay controversia acerca del empleo de opiáceos en el contexto clínico debido a sus efectos depresores sobre el sistema inmune y a la susceptibilidad que esto genera en el paciente, haciéndolo más vulnerable al desarrollo de infecciones bacteriales y virales y al detrimento en la respuesta inmune contra células cancerosas (1).

El presente artículo de revisión pretende analizar la evidencia bioquímica más relevante publicada hasta el momento acerca de los efectos del consumo de opiáceos sobre los mecanismos de defensa del individuo, en especial, argumen-

tando cómo se puede generar un cuadro de inmunodeficiencia sin que haya de por medio agentes infecciosos específicos que ataquen al sistema inmune.

### **La morfina hace parte del sistema opioide endógeno y es una molécula señalizadora por excelencia**

Hoy en día se conoce que los péptidos opioides endógenos sintetizados por las células neuronales y sus correspondientes receptores a nivel central forman un sistema neuromodulador que controla diversos procesos fisiológicos, entre los cuales se cuentan funciones inmunorreguladoras. Esta regulación se efectúa en forma directa sobre las células del sistema inmune (inmunocitos) e indirectamente a través del sistema nervioso central y del eje hipotalámico-pituitario-adrenal. Los péptidos opioides endógenos comparten funciones similares a las citocinas, las principales mediadoras del sistema inmune, y por esto se han propuesto como parte integrante de esta familia de moléculas, pues al igual que ellas, los opioides endógenos son sintetizados también por los inmunocitos, tienen receptores específicos sobre estas células y participan activamente en una comunicación bidireccional entre el sistema nervioso central y el sistema inmune (2-6). De forma similar, la morfina, la misma molécula encontrada en la amapola, hace parte del sistema de señalización



opioide endógeno, sistema que se ha mantenido a través de la evolución y que permanece intacto aun en la especie humana, con un papel fundamental en la regulación del sistema inmune (7).

En el año 2003 (8) se confirmó la existencia de una nueva variante del receptor  $\mu$  de péptidos opioides, denominado  $\mu_3$ , cuya principal característica es su alta afinidad por la morfina, sin tener afinidad por alguno de los péptidos opioides endógenos conocidos hasta la fecha (9,10). Si bien en la especie humana se han identificado 12 variantes del receptor  $\mu$ , los cuales se expresan en diversos tipos de células mediante mecanismos de *splicing* alternativo (11), la variante  $\mu_3$  se ha encontrado particularmente en la superficie de leucocitos mononucleares, polimorfonucleares, en células vasculares endoteliales y en células neuronales humanas.

Estos hallazgos generaron varias inquietudes: ¿por qué se tiene un receptor con una alta afinidad para la morfina pero que es insensible a los péptidos opioides endógenos?; ¿cuáles son los ligandos endógenos de este receptor?; ¿si este receptor se encuentra en la superficie de las células del sistema inmune, tiene él algún papel en la regulación de la respuesta inmunológica?

Algunas investigaciones evidenciaron que el estímulo de granulocitos humanos con morfina bajo condiciones *in vitro* suprimía los efectos de activación y quimiotaxis inducidos normalmente por agentes como la interleucina-1, el factor de necrosis tumoral alfa, el lipopolisacárido y la interleucina-8. Estos eventos ejercidos por la morfina fueron suprimidos por la naloxona, un antagonista de los receptores  $\mu$ . Teniendo en cuenta estudios previos donde se propuso que la estimulación del receptor de péptidos opioides  $\delta_2$ , presente también en la superficie de los granulocitos, conduce a una activación en la motilidad y quimiotaxis de estas células, se sugi-

rió que la morfina ejerce un efecto biológico opuesto, actuando a través del receptor  $\mu_3$  (12).

Adicionalmente a la existencia del receptor  $\mu_3$ , desde hace varias décadas se había sugerido la presencia de sustancias no peptídicas, químicamente relacionadas con la morfina presentes en el sistema nervioso central de animales (13-16). Sin embargo, solamente hasta los años 2004 y 2005 se descubrió y se comprobó que los inmunocitos (17) y otras células humanas (18, 19) son capaces de sintetizar morfina, la misma molécula encontrada en la amapola; de hecho, se ha detectado la presencia de morfina endógena en el plasma de individuos sanos en una concentración de 80 pg/ml (20,21). En la síntesis de morfina en los inmunocitos participan enzimas como el citocromo P450 subtipo 2D6 y la COMT (catecol o-metiltransferasa) (22), siendo algunos intermediarios biosintéticos la tiramina, la reticulina y la dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA), entre otros. Sumado a lo anterior, se evidenció que las células del sistema inmune humanas no solamente sintetizan morfina sino que también la secretan al medio (17), situación que hizo sugerir a esta molécula como el ligando endógeno del receptor  $\mu_3$ .

Se ha propuesto que la morfina endógena está implicada en aquellos eventos bioquímicos que regresan al sistema inmune activado a sus condiciones basales (7), proceso que es tan importante como la activación misma del sistema. Esta acción es opuesta a la inducida por los péptidos opioides, los cuales han mostrado ser ampliamente estimuladores, actuando a través del receptor  $\delta$  (7,23). Ahora bien, si la morfina sintetizada por células del sistema inmune actúa como una molécula señalizadora involucrada en la modulación negativa de la actividad del sistema inmune, ¿cuáles serían las consecuencias a este nivel cuando se administra al organismo morfina "exógena", ya sea en concentraciones tera-

péuticas para lograr efectos analgésicos, o cuando se administra el alcaloide de forma crónica en dosis significativamente superiores a las terapéuticas, como sucede en los individuos adictos a los opiáceos?

### La morfina exógena es inmunodepresora

Entre los efectos mejor caracterizados ejercidos por la administración de morfina en modelos animales murinos se tiene la atrofia de órganos linfoides y la reducción en la actividad citotóxica de las células asesinas naturales (*natural killer, NK*) (24,25). No solamente estudios de tipo farmacológico han evidenciado estos efectos, sino que también se han realizado experimentos utilizando aproximaciones genéticas, los cuales evidenciaron claramente que la participación de los receptores  $\mu$  es esencial. Las investigaciones hechas empleando ratones *knockout* para el receptor  $\mu$ , mostraron que la administración intraperitoneal de morfina durante seis días, a intervalos de 12 horas, con incrementos paulatinos de la dosis, iniciando con 20 mg/kg y finalizando con 100 mg/kg, conduce a una atrofia tanto del bazo como del timo, observándose una marcada reducción en la actividad citotóxica de las células NK obtenidas a partir del bazo de los ratones homocigotos normales tratados con el alcaloide. La citotoxicidad de estas células se redujo aproximadamente entre un 33 por ciento y un 43 por ciento con relación al grupo control de animales tratados con solución salina. De forma contraria, en los animales homocigotos recesivos que no expresaban el receptor  $\mu$ , no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los efectos citotóxicos de las células NK de los ratones a los cuales se les administró morfina y el grupo control al cual le fue administrado solución salina (25).

Una investigación similar a la anterior evaluó las alteraciones inmunológicas en ratones

*knockout* para el receptor  $\mu$ , generadas esta vez no mediante una administración crónica de morfina sino a través de una administración aguda de una sola dosis del alcaloide (27 mg/kg), cuantificando las alteraciones inmunológicas luego de tres horas de su administración. En este caso para los ratones homocigotos normales, la administración de morfina condujo a una reducción de la actividad citotóxica de las células NK entre el 40 y 49 por ciento, mientras que en los ratones *knockout* para el receptor  $\mu$  se observó una reducción en dicha actividad entre el 2,5 y el 3,5 por ciento, con relación a las respuestas observadas en los animales control tratados con solución salina. En este trabajo se evaluó adicionalmente la respuesta proliferativa de linfocitos obtenidos a partir del bazo de los animales frente a mitógenos como la concanavalina A, la fitohemaglutinina y un anticuerpo contra el receptor de célula T, observándose que la morfina causó una disminución del 83, 70 y 65 por ciento respectivamente, en la proliferación de linfocitos obtenidos a partir de animales homocigotos normales que expresaban el receptor  $\mu$ ; no obstante, la administración del alcaloide a los ratones *knockout* no alteró la respuesta proliferativa de sus células T (26).

Los hallazgos anteriores sugieren que el producto del gen  $\mu$  es un blanco molecular esencial de la morfina para ejercer sus efectos sobre el sistema inmune, bien sea actuando de forma directa sobre los inmunocitos, de forma indirecta a través de los receptores  $\mu$  ubicados en el sistema nervioso central, o mediante ambos mecanismos.

Efectos inmunotóxicos similares fueron evidenciados en humanos cuando se estudió la alteración en la actividad de las células NK de pacientes sometidos a un procedimiento quirúrgico (27). Para ello, un total de 40 pacientes fue dividido en 4 grupos. Al primer grupo ( $IT_{0,5}$ ) se le administró 0,5 mg de morfina por vía intratecal



antes de la inducción de la anestesia general. Al otro grupo ( $IT_{0,1}$ ) se le administró 0,1 mg de morfina por la misma vía; y a un tercer grupo (IV) se le administró 10 mg de morfina por vía intravenosa. El grupo restante de pacientes (C) fue observado como grupo control. Los análisis mostraron que luego de un día del postoperatorio en los grupos  $IT_{0,1}$ , IV y C no se modificó significativamente la respuesta citotóxica de las células NK, mientras que en el grupo ( $IT_{0,5}$ ) la disminución en ella fue aproximadamente del 52,3 por ciento en el primer día del postquirúrgico, regresando a niveles normales en el segundo día luego de la intervención. No hubo diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas de adrenalina y noradrenalina para los cuatro grupos analizados, mientras que las concentraciones de cortisol sí se incrementaron para los cuatro grupos a las dos horas de la intervención, permaneciendo elevadas hasta el segundo día del postoperatorio para los grupos  $IT_{0,5}$ ,  $IT_{0,1}$  e IV. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por el mismo grupo de investigadores en un estudio clínico adicional con 30 pacientes, donde encontraron una disminución del 56,6 por ciento en la actividad de las células NK cuando se administró 0,5 mg de morfina por vía intratecal (28).

Estudios similares emplearon voluntarios sanos y una administración de morfina en forma subaguda por 36 horas, iniciando con una dosis oral de 30 mg y continuando luego con una infusión continua intravenosa por 24 horas. Las dosis empleadas fueron las que comúnmente se administran a pacientes para alcanzar efectos analgésicos. En esta investigación se observó, al igual que en las mencionadas con anterioridad, una reducción significativa, de hasta el 45 por ciento, en la actividad citotóxica de las células NK con respecto a la actividad que tenían estas mismas células antes de iniciar la administración del fármaco (29).

Se recuerda que la característica fundamental de las células NK es su capacidad única de reconocer y eliminar células tumorales o infectadas con virus u otros patógenos intracelulares sin necesidad de procesamiento antigénico previo específico. De tal forma, su función fisiológica crucial es proveer una línea de defensa primaria contra microorganismos patógenos durante los primeros días de la infección, tiempo en el cual el sistema inmune adaptativo comienza apenas a ser activado y movilizado (30,31).

### La morfina altera el balance Th1/Th2

Sumado a los efectos deletéreos sobre las células NK, otra consecuencia bien caracterizada inducida por la morfina ha sido la polarización de los linfocitos T ayudadores (Th), favoreciendo una respuesta inmune mediada por anticuerpos (Th2-dependiente) e inhibiendo una respuesta mediada por células (Th1-dependiente). Es importante recordar que la respuesta inmune mediada por células es crítica contra virus y ciertas bacterias intracelulares.

Al parecer la morfina induce la polarización de los linfocitos T ayudadores a través de la modulación en su patrón de secreción de citocinas, según lo mostraron estudios *in vitro* empleando células mononucleares extraídas de sangre periférica humana a las cuales se indujo su proliferación utilizando como mitógeno anticuerpos anti-CD3/anti-CD28, semejando así una activación del receptor de célula T, como sucedería con la presentación de un antígeno. Estos experimentos fueron realizados en presencia de diferentes concentraciones de morfina (10 ng/ml, 30 ng/ml y 100 ng/ml) por cuatro días y se cuantificó posteriormente la capacidad de estas células para secretar al medio interleucina-2 (IL-2) e interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), dos citocinas características de la inmunidad mediada por células Th1-dependiente; y la capacidad de secreción de

interleucina-4 (IL-4) e interleucina-5 (IL-5), dos citocinas características de la inmunidad mediada por anticuerpos. Los resultados indicaron que hubo una disminución en la secreción de IL-2 de aproximadamente el 28,6%, 48,6% y 55,7%, respectivamente, para cada una de las concentraciones de morfina evaluadas. De la misma forma, la morfina inhibió la secreción de IFN $\gamma$  en un 29,3, 46,5 y 65,7 por ciento, respectivamente. Contrariamente, el experimento mostró una inducción significativa en la secreción al medio de IL-4 (328,6%, 542,8% y 1185,7% respectivamente) y de IL-5 (68,7%, 131,25% y 193,75%, respectivamente) (32).

Para confirmar si los anteriores hallazgos podrían ser dependientes del receptor  $\mu$ , se efectuó otro estudio bajo las mismas condiciones pero empleando esta vez esplenocitos murinos (células del bazo) provenientes de animales *knockout* para el mencionado receptor. Se encontró que para los esplenocitos que expresaban normalmente el receptor  $\mu$  hubo una disminución en la secreción al medio de IFN $\gamma$  del 22, 60,5 y 63,2 por ciento respectivamente, para las concentraciones de morfina mencionadas y una estimulación en la secreción de IL-4 del 140, 270 y 350 por ciento; mientras que para los esplenocitos obtenidos de los ratones *knockout* no se modificó el patrón de secreción de estas citocinas. Estudios adicionales en este mismo trabajo mostraron que la morfina induce la actividad del promotor del gen de la IL-4, incrementándose significativamente las concentraciones intracelulares de ácido ribonucleico mensajero (ARNm), efecto que es inhibido por la naloxona, un antagonista de la morfina. También se evidenció que la morfina induce una translocación al núcleo del factor de transcripción NFAT (factor nuclear de célula T activada), el cual se une a secuencias en cis en el promotor del gen de la IL-4. Así mismo, se muestra una ligera inhibición en la translocación al núcleo del factor de transcrip-

ción NF- $\kappa$ B, cuyos elementos de respuesta se encuentran en los promotores de múltiples citocinas pro-inflamatorias como IL-2 e IFN $\gamma$ .

Los anteriores resultados fueron obtenidos empleando concentraciones de morfina que se encuentran dentro del rango de concentraciones plasmáticas terapéuticas normalmente alcanzadas en humanos para lograr efectos analgésicos, las cuales se sitúan entre 10 y 80 ng/ml (33,34). Es de anotar también que la morfina presenta una unión a proteínas plasmáticas de aproximadamente el 35 por ciento (35), lo cual es necesario tenerlo en cuenta al comparar las concentraciones utilizadas en los estudios *in vitro* con las concentraciones plasmáticas terapéuticas. De tal forma, en el plasma, la concentración de morfina libre no unida a proteínas y disponible para interactuar con los receptores estaría entre 3,5 y 28 ng/ml en contextos de analgesia terapéutica y superiores en preanestesia.

Adicionalmente, es necesario tener en cuenta otros factores como la vía de administración y la farmacocinética de la morfina y la heroína (diacilmorfina) para poder inferir y sugerir, a partir de las concentraciones empleadas en los estudios *in vitro*, la posibilidad del desarrollo de eventos toxicodinámicos en el sistema inmune. En la tabla 1 se muestran datos acerca de las concentraciones máximas de morfina alcanzadas luego de la administración del fármaco como tal o del profármaco heroína en humanos. Estos datos se presentan para que el lector tenga un punto de referencia sobre las concentraciones séricas alcanzadas en humanos y no pretenden ser un análisis completo farmacocinético. También es importante resaltar que dependiendo de la región, la pureza de la heroína varía entre el 11 y el 72 por ciento y un adicto puede inyectarse entre dos y cuatro veces al día, con dosis promedio diarias de 300-500 mg (36).



**Tabla 1.** Concentración máxima de morfina alcanzada luego de la administración del fármaco o del profármaco heroína

Sustancia	Dosis	Vía administración	Cmax (Morfina)	Tmax (minutos)	T <sup>1/2</sup> (minutos)	Ref.
Morfina	10 mg	i.v.	283 nM (80,86 ng/ml)	4,8	132	(34)
	10 mg	s.c.	262 nM (74,9 ng/ml)	15	132	(34)
Heroína (profármaco)	12,20 mg	i.v.	160 nM (44,57 ng/ml)	2,5	3,0 – 3,7	(67)
	10,5 mg	Oral, fumada.	119 nM (34 ng/ml)	2	5	(67)
	12 mg	Intranasal	67,55 nM (19,3 ng/ml)	23	4,1	(67)

*Cmax*: concentración máxima plasmática de morfina; *Tmax*: tiempo en el cual se alcanza la concentración máxima plasmática de morfina; *T<sup>1/2</sup>*: tiempo de vida media en plasma con respecto al compuesto administrado (morfina o heroína); *Ref*: referencia bibliográfica.

Cabe mencionar que la IL-2 es crítica en la inmunidad mediada por células y tiene como función principal inducir la expansión clonal y la proliferación de células T estimuladas con un antígeno y por otras señales accesorias; y, si bien está involucrada en la activación de células asesinas naturales, de las células T citotóxicas y de los macrófagos (37), también dispara mecanismos de retroalimentación negativa mediado por células T reguladoras (38). De tal forma, la inhibición en su secreción al medio por parte de los linfocitos T ayudadores explicaría la reducida actividad de las células NK vistas en los estudios clínicos, y también explicaría la disminución significativa en la capacidad proliferativa de los linfocitos T extraídos de adictos a la heroína, como se ilustra más adelante.

Con respecto al IFN $\gamma$ , es tal vez la citocina más importante para la inmunidad mediada por células. Es producida principalmente por linfocitos T ayudadores Th1 y también por células T citotóxicas y células asesinas naturales. Esta citocina media el incremento en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II, estimulando la presentación de antígenos y la producción de otras citocinas por monocitos, activando sus funciones efectoras que incluyen adherencia,

fagocitosis, secreción, estallido respiratorio y producción de óxido nítrico. El resultado neto es la acumulación de macrófagos en el sitio de la respuesta inmune celular, combatiendo células infectadas con parásitos intracelulares. Así mismo, el IFN $\gamma$  estimula la actividad asesina de células NK y neutrófilos e inhibe la replicación viral (37). Por consiguiente, el hecho de que la morfina inhiba significativamente la secreción al medio de IFN $\gamma$  sugiere los mecanismos moleculares que pueden estar detrás de las observaciones clínicas con respecto a la susceptibilidad hacia infecciones virales en adictos al opio.

### Las características inmunológicas de individuos VIH+ que progresan hacia sida son similares a las de individuos seronegativos adictos al opio

Se ha investigado el efecto de la morfina sobre la función “anti-VIH” de las células T CD8<sup>+</sup>, las cuales poseen trascendentales efectos antivirales directos e indirectos. Si bien el mecanismo dominante de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> es ejercer un efecto citotóxico dependiente de antígeno sobre células infectadas con virus, existe un mecanismo no citotóxico ejercido a través de la liberación de factores solubles, por ejemplo IFN $\gamma$ , que actúan de manera paracrina, inhibiendo la

replicación del virus al interior de la célula infectada. Fue así como se evidenció mediante estudios *in vitro* empleando cultivos de líneas celulares humanas monocíticas y linfocíticas infectadas con el “VIH”, que la morfina en concentraciones entre el rango de 2,85 a 285 ng/ml, no solamente induce drásticamente la expresión del “VIH” sino que inhibe la acción represora de la expresión del virus ejercida por los factores solubles liberados por los linfocitos T CD8 activados, entre ellos IFN $\gamma$ . Estos eventos fueron antagonizados por la naloxona (39).

Hay que tener en mente que lo anterior no solamente puede ser válido para células infectadas con el “VIH”; puede ser perfectamente válido para cualquier virus. Por ejemplo, se ha demostrado que el receptor  $\mu$  de opiáceos se expresa en una línea celular de hepatoma humano y cuando estas células son transfectadas con el virus de la hepatitis humana tipo C (VHC) y expuestas a bajos niveles de morfina (0,028 ng/ml a 280 ng/ml), la concentración del ARN mensajero del VHC en el interior celular se triplica, efecto que es bloqueado por la naltrexona y por la beta-funaltrexamina, antagonistas de receptores de opiáceos (40).

Como se ha mencionado hasta el momento, la morfina no solamente puede alterar el patrón y la capacidad de expresión y secreción de citocinas en los inmunocitos, sino que también tiene la capacidad de impedir su acción paracrina una vez ellas han sido excretadas. A este respecto es importante recordar que desde el año 1993 se propuso la hipótesis acerca de que la progresión hacia “sida” de individuos “VIH positivos” estaba mediada por un cambio significativo en las características inmunes del individuo, declinando la respuesta Th1-dependiente y favoreciéndose una respuesta inmune Th2-dependiente (41,42). Desde ese año hasta el presente han sido múltiples las investigaciones

que han aportado evidencia soportando esta hipótesis (43-47). Por ejemplo, en una investigación se caracterizaron las células mononucleares provenientes de sangre periférica de 16 individuos sanos “VIH negativos”, 18 individuos “VIH positivos” asintomáticos y 14 individuos “VIH positivos” en etapa de “sida”, evaluando la capacidad de sus células para sintetizar IL-2, IL-4, IL-10 e IFN $\gamma$  luego de ser estimuladas *ex vivo*, determinando así la predominancia inmunológica Th1 o Th2. Se encontró que el porcentaje de células que expresan citocinas Th1 (IL-2 e IFN $\gamma$ ) disminuye a medida que la enfermedad progresa. El porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> funcionalmente capaces de producir IFN $\gamma$  disminuyó continuamente desde un 19,6 por ciento  $\pm$  3,0 en los individuos “VIH negativos” hasta un 14,0 %  $\pm$  1,8 en los individuos “VIH positivos” asintomáticos; y hasta un 10,6 por ciento  $\pm$  1,9 en los pacientes que desarrollaron sida (43).

Es importante tener en mente que los anteriores datos no corresponden a conteos celulares; ellos corresponden a la evaluación de la funcionalidad celular con respecto a su capacidad o no de sintetizar una determinada citocina, es decir, la fracción de un total de determinadas células que está expresando la citocina en cuestión. Cuando se comparó el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> que expresan IL-2 en los individuos sanos (32,2  $\pm$  5,5%) con el obtenido para los individuos con “sida” (9,6  $\pm$  1,5%) se observó una dramática disminución en el porcentaje de células T que expresan esta citocina. Una situación similar se presentó con las células T CD8<sup>+</sup> que expresan IL-2, disminuyendo desde un 17,1  $\pm$  3,5 por ciento en los individuos “VIH negativos” hasta un 7,5  $\pm$  1,4 por ciento en los individuos que desarrollaron “sida”.

La fracción de células T CD8<sup>+</sup> que sintetizan IFN $\gamma$  se incrementó dramáticamente a medida que la enfermedad progresa: 23,2 por ciento  $\pm$  4,2 en



individuos “VIH negativos”, 32,4% +/- 4,2 en individuos “VIH positivos” asintomáticos y 51,4% +/- 7,6 en “VIH positivos” en etapa de sida, reflejando una activación citotóxica compensatoria hacia las etapas finales del proceso.

Con respecto a los hallazgos para las citocinas de tipo Th2 en los individuos no infectados, el 3,0 por ciento +/- 0,5 de las células T CD4<sup>+</sup> fueron positivas para IL-4 mientras que aquellas que expresaban IL-10 fue menor del 1 por ciento. Para los individuos que progresan hacia “sida”, si bien la proporción de células T CD4<sup>+</sup> que expresan IL-4 fue similar a aquellas de individuos “VIH negativos”, la proporción de células T CD4<sup>+</sup> que expresan IL-10 pasó de ser de menos del 1 por ciento al 5,3% +/- 1,4. Para las células T CD8<sup>+</sup> no hubo una modificación significativa en su patrón de expresión de IL-4 o IL-10.

En este mismo trabajo, cuando se cuantificó la producción de citocinas en las células T CD4<sup>+</sup> de individuos que progresaron hacia “sida” se encontró que tanto la síntesis de IFN $\gamma$  como la de IL-2 estaba drásticamente disminuida y la síntesis de IL-10 significativamente incrementada.

Ahora bien, si la IL-2 tiene un papel fundamental en la expansión clonal de linfocitos estimulados por un antígeno, es de esperar que la respuesta proliferativa de linfocitos extraídos a partir de individuos adictos a opiáceos esté significativamente alterada. A este respecto otro grupo de investigadores (48) estudió diversos aspectos de la respuesta inmune en adictos a la heroína no infectados con el “VIH”. En primer lugar se evaluó la proliferación de los linfocitos obtenidos a partir de estos individuos bajo condiciones *ex vivo* mediante la estimulación con fitohemaglutinina, un mitógeno específico de células T y la posterior cuantificación de la incorporación de timidina tritiada en el ADN celular, evaluando así su capacidad de expansión

clonal. Se encontró que la linfoproliferación se encuentra inhibida entre un 58,9 y un 71,6 por ciento con relación a la proliferación de los linfocitos obtenidos a partir de sangre periférica de individuos no drogadictos. Desafortunadamente, en este trabajo no se cuantificó la capacidad de secreción al medio de IL-2 e IFN $\gamma$  de las células provenientes de los individuos drogadictos. Adicionalmente, para tener un punto de comparación y evaluar el posible efecto directo de la morfina sobre la linfoproliferación, se utilizó la misma técnica pero empleando linfocitos de individuos no drogadictos, los cuales fueron incubados con el mitógeno y diferentes concentraciones de morfina por 66 horas. En este caso la proliferación celular disminuyó en un 49 por ciento al emplear una concentración de morfina de 2,85 ng/ml. Estos efectos fueron antagonizados al tratar las células con naloxona antes de la adición de la morfina. El anterior estudio también mostró un número de células asesinas naturales (NK) circulantes significativamente menor (370 células / mm<sup>3</sup> aproximadamente) con relación a individuos no drogadictos (500 células / mm<sup>3</sup>). A pesar de que ellos no cuantificaron la funcionalidad de las células NK remanentes, este dato es importante en el sentido de que no sólo el número de células circulantes se encuentra disminuido, sino también es muy probable que la funcionalidad de estas células puede estar notablemente alterada, tal como lo mostraron los estudios clínicos arriba mencionados. Hallazgos similares de alteración en la linfoproliferación fueron evidenciados por otro grupo de investigadores en una cohorte diferente de individuos adictos al opio (49).

En un estudio clínico adicional (50) se evaluó la capacidad de síntesis de IFN $\gamma$  e IL-10 de las células sanguíneas totales obtenidas de adictos al opio y a la heroína. Luego de la estimulación con los mitógenos fitohemaglutinina y lipopolisacárido, se halló que en los individuos

adictos a la heroína, con un consumo diario entre 500 a 2.000 mg / día, hubo una disminución del 67,4 por ciento en la secreción al medio de IFN $\gamma$  con respecto a las células obtenidas a partir de individuos no drogadictos. De forma contraria, la secreción de IL-10 en los adictos a la heroína se incrementó en promedio en un 238,3 por ciento para células estimuladas con lipopolisacárido. Para las células estimuladas con fitohemaglutinina se observó una disminución en la secreción de IFN $\gamma$  del 64,2 por ciento y un incremento en IL-10 del 320 por ciento.

Llama la atención con lo descrito anteriormente la similaridad en la alteración del patrón de secreción de citocinas para los individuos que progresan hacia “sida” y aquella observada en los individuos consumidores de opiáceos. Dado que las estadísticas no siempre discriminan a los individuos “VIH positivos” no drogadictos, de los drogadictos, es válido cuestionar si la propaganda, intencionada o no, sobre el avance del sida obra como distractor sobre el flagelo de la drogadicción, sus causas y consecuencias.

La estadística de individuos VIH positivos sin discriminación de factores adicionales es usada para generar pánico en la población, señalando únicamente al virus como único responsable de la epidemia. De esta manera sugieren que la responsabilidad del sida depende únicamente de la conducta sexual del individuo y que si se contamina con el virus ya se está condenado a morir de sida. Sutilmente se deja entrever que padecer de sida es el precio a una conducta “libertina”, algo así como un castigo merecido a los descarriados sexuales.

Es necesario aclarar que el virus denominado “VIH” no posee una maquinaria bioquímica *per se* destinada a causar la muerte de la célula. Suficientes trabajos señalan que el virus posee secuencias en cis, en su genoma, que interactúan

con factores en trans, de la célula hospedera, que lo reprimen o lo estabilizan manteniéndolo inserto en el ADN celular, sin actividad replicativa. Igualmente, si existen condiciones de agresión celular, como la drogadicción, su maquinaria bioquímica y la de la célula lo induce a replicarse activamente y a salir de la célula que va a entrar en apoptosis para conquistar otra no afectada. En parte, por esto se les denomina virus “lentos”, a diferencia de los virus líticos, cuya maquinaria bioquímica está diseñada para frenar la actividad celular, replicarse activamente y lisis la célula, independientemente de las condiciones medioambientales en que esté la célula.

Es evidente que si la morfina endógena hace parte de los múltiples mecanismos reguladores que participan en los procesos de desactivación y homeostasis del sistema inmunológico, las consecuencias a este nivel por la administración de la molécula de manera exógena tendrá profundas influencias, no solo en el contexto clínico donde se manejan dosis “terapéuticas”, sino también en el contexto del individuo drogadicto, quien emplea dosis significativamente más altas y de forma crónica. Para agravar su situación, el drogadicto tiene serios problemas de malnutrición/desnutrición y, adicionalmente, otro factor que afecta al sistema inmune son los síndromes de abstinencia (51), cuando por una u otra causa el individuo no se puede administrar las drogas regularmente. Se ha demostrado en modelos *in vitro* y *ex vivo* con células humanas que la abstinencia, a través de mecanismos moleculares aún poco claros, inhibe también la respuesta inmune y potencia la expresión de virus como el VHC y el “VIH” al interior celular (52,53).

Con base en lo anterior, cualquier agente infeccioso, por más inofensivo que sea, al encontrar un panorama como este, con un sistema de defensa significativamente debilitado, con células asesinas naturales en la mitad de su capacidad



de respuesta, con linfoproliferación drásticamente reducida y fuera de eso con una capacidad alterada en su secreción de citocinas, será un microorganismo que fácilmente conquistará a su huésped. Tal como lo mencionan algunos investigadores (54), entre el 15 y el 40 por ciento de las personas que se infectan con el virus de la hepatitis C, su sistema inmune lo elimina; porcentaje que obviamente ha de caer a niveles muy inferiores cuando se trata de una población de individuos con un sistema de defensa drásticamente alterado, como es el caso del drogadicto. Vale la pena preguntarse si la alta prevalencia de infección con VHC entre drogadictos que emplean opiáceos por vía parenteral (55) se debe solamente a las prácticas “no estériles” de su administración, como normalmente se argumenta, o será relevante también la alteración en su sistema inmune que hace que el virus una vez en el organismo no pueda ser eliminado.

Llama la atención el hecho de que cuando se habla acerca de las drogas de abuso sólo se mencionan los efectos tóxicos de éstas sobre el sistema nervioso, sus propiedades adictivas y la incapacidad mental que genera en el individuo; sin embargo, nunca se mencionan los efectos tóxicos sobre otros sistemas y nunca se le dice a las personas que un síndrome de inmunodeficiencia puede ser “adquirido” sin que haya de por medio un agente infeccioso que ataque al sistema inmune, tal como sucedería con un consumidor crónico de opiáceos “VIH negativo”. Al respecto existe una semejanza en la alteración del patrón de secreción de citocinas para los individuos que progresan hacia “sida” y aquella observada en los individuos consumidores de opiáceos.

Es importante rescatar de los estudios mencionados en el presente artículo que un individuo, si bien puede tener un conteo celular de alguna población inmunocítica dentro de rangos “nor-

males”, ello no implica, de ninguna manera, que la funcionalidad de estas células esté también dentro de rangos “normales”, es decir que, aún cuando el número de células puede ser el adecuado, su función biológica, llámese capacidad citolítica, capacidad de síntesis de citocinas, etc, puede estar significativamente alterada. Por consiguiente la evaluación de la función inmune de un individuo no se puede juzgar solamente por sus conteos celulares.

### **La morfina también altera la funcionalidad de los neutrófilos**

Aun cuando no se conoce si la inhibición en la funcionalidad de las células asesinas naturales (NK) está mediada por receptores del subtipo  $\mu_3$ , sí se sabe que la inhibición en la capacidad fagocítica, el estallido respiratorio y la expresión de receptores del complemento en neutrófilos está mediada por este receptor, involucrando una vía de señalización dependiente de óxido nítrico (56,57). Ya se había observado que los péptidos opioides agonistas de los otros subtipos de receptores  $\mu$  y los agonistas de los receptores  $\delta$ , no inducían este tipo de señalización bioquímica (58). Otros estudios mostraron que la producción de óxido nítrico es antagonizable con naloxona (8).

De otro lado, tal como se expresó al comienzo de este artículo, los péptidos opioides tienen profundos efectos inmunomoduladores. Se ha observado experimentalmente que los agonistas de los receptores  $\delta$ , como por ejemplo metionina-encefalina, estimulan y potencian la respuesta inmune. Bajo condiciones *in vitro* se observó que al estimular células mononucleares humanas con el mitógeno fitohemaglutinina y el péptido opioide antes mencionado en una concentración entre  $1 \times 10^{-9}$  y  $1 \times 10^{-6}$  M se induce un incremento significativo en la producción de IL-2 y en la proliferación linfocitaria. La secreción al

medio de IFN $\gamma$  también aumentó significativamente empleando concentraciones del péptido entre  $1 \times 10^{-14}$  y  $1 \times 10^{-10}$  M (23). Es de anotar que la concentración de metionina-enkefalina en sangre periférica humana se encuentra en el rango de  $1 \times 10^{-12}$  M (59). De forma similar, en estudios *in vitro* se encontró que esta molécula incrementa significativamente la actividad de las células NK humanas. Estas investigaciones permitieron efectuar estudios clínicos con humanos, confirmando los hallazgos antes mencionados (23).

La morfina endógena juega un papel trascendental en los mecanismos de regulación negativa que regresan al sistema activado a sus condiciones basales (7,60), es decir, que la morfina endógena es la contraparte de los efectos del péptido opioide metionina-enkefalina. Pero no solamente la morfina endógena por sí misma tiene estos efectos, también su principal metabolito. El metabolismo de la morfina se lleva a cabo principalmente mediante reacciones de fase II, conduciendo a morfina-3-glucurónido (M3G) y a morfina-6-glucurónido (M6G) (34). Si bien el metabolito M3G es biológicamente inactivo, la M6G es más potente en sus efectos analgésicos que su compuesto origen y, fuera de ello, también presenta afinidad por los receptores  $\mu_3$  con acciones inmunorreguladoras similares a las de la morfina. Algunos estudios han sugerido la existencia de un receptor exclusivo para la M6G y se ha llegado a catalogar a esta molécula también como parte integrante del sistema opioide endógeno y como un nuevo factor endocrino periférico (61-63).

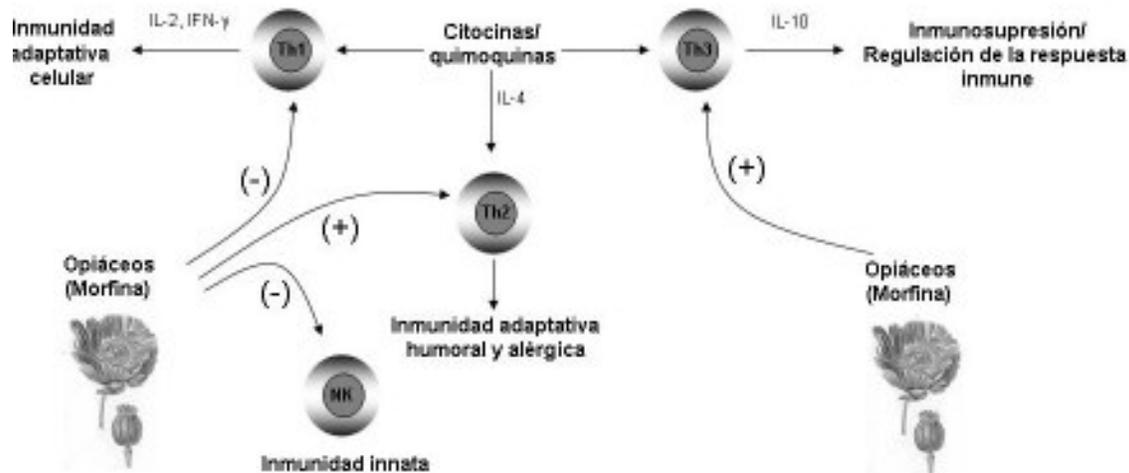
Es decir, que al administrar morfina exógena al organismo no solamente esta sustancia, por sí misma, ejerce efectos negativos sobre el sistema inmune, sino que también uno de sus principales metabolitos, la M6G, es biológicamente activa a este nivel, con una vida media en sangre de aproximadamente 3,6 horas (34).

## Conclusiones

Existe la suficiente evidencia experimental para sugerir que la morfina endógena o aquella administrada de manera exógena tiene un papel ampliamente inhibitorio sobre los mecanismos de activación de la respuesta inmune, ejerciendo una influencia significativa sobre la actividad de las células NK, la proliferación linfocitaria y la capacidad fagocítica de polimorfonucleares y monocitos. Así mismo, esta sustancia tiene la capacidad de modificar el balance Th1/Th2, inhibiendo la respuesta inmune mediada por células, crítica para hacer frente a virus y otro tipo de parásitos intracelulares (Figura 1). Es interesante la similitud entre los efectos inmunotóxicos generados en adictos al opio, "VIH negativos", con aquellos observados en pacientes no drogadictos "VIH positivos" que progresan hacia sida.

Los efectos deletéreos ejercidos por los opiáceos en el sistema inmune pueden estar mediados por mecanismos directos a través de receptores específicos ubicados sobre la membrana de los inmunocitos, pero también pueden ser generados de forma indirecta mediante la activación de receptores para opiáceos ubicados en el sistema nervioso central. Si bien los estudios presentados han señalado a los receptores  $\mu$ , en particular al receptor  $\mu_3$ , como los responsables de la transducción de las señales que conllevan a los efectos inmunotóxicos descritos, otras investigaciones han aportado evidencia adicional sugiriendo que en los inmunocitos se encuentran receptores no clásicos, aún sin caracterizar, los cuales pueden estar mediando también este tipo de efectos para los opiáceos (64).

No obstante, cualquiera que sea el mecanismo molecular, para poder comprender los alcances de la morfina en el contexto inmunotoxicológico es de trascendental importancia tener siempre en mente que esta sustancia hace parte del sis-



**Figura 1.** Resumen de los efectos inmunotóxicos de los opiáceos naturales (morfina) o semisintéticos (heroína). *Th*: linfocitos T ayudadores; *NK*, células asesinas naturales.

tema opioide endógeno y que es una molécula señalizadora utilizada por las células del sistema inmune como parte de los mecanismos que regresan al sistema activado a sus condiciones basales. Por consiguiente, su administración exógena tendrá sin lugar a dudas drásticas y profundas consecuencias sobre la homeodinámica inmunológica y por consiguiente sobre los sistemas de defensa del individuo.

Finalmente, es muy interesante comparar los efectos bioquímicos inmunosupresores ejercidos por la morfina con aquellos ejercidos por la marihuana (65). Si bien la acción toxicodinámica en el sistema inmune se lleva a cabo a través de otros receptores, los efectos a este nivel son muy similares, ambas drogas alterando la linfoproliferación, modificando la expresión y secreción de citocinas y alterando la respuesta inmune mediada por células. Con base en lo anterior sería lógico esperar que en un individuo que consume opiáceos y marihuana se presenten sinergismos de suma o de potenciación con respecto a los efectos inmunosupresores de estas drogas, generándose un cuadro de inmunodeficiencia “adquirida”, independientemente de la

presencia de algún agente inmunosupresor microbiológico. La relación de los opiáceos con la infección, así como con la marihuana, ha sido ampliamente documentada (66).

## Referencias

1. **Budd K.** Pain management: is opioid immunosuppression a clinical problem? *Biomed Pharmacother.* 2006; 60: 310-7.
2. **Rogers TJ, Peterson PK.** Opioid G protein-coupled receptors: signals at the crossroads of inflammation. *Trends Immunol.* 2003; 24: 116-21.
3. **McCarthy L, Wetzel M, Sliker JK, Eisenstein TK, Rogers TJ.** Opioids, opioid receptors, and the immune response. *Drug Alcohol Depend.* 2001; 62: 111-23.
4. **Peterson PK, Molitor TW, Chao CC.** The opioid-cytokine connection. *J Neuroimmunol.* 1998; 83: 63-9.
5. **Sharp BM, McAllen K, Gekker G, Shahabi NA, Peterson PK.** Immunofluorescence detection of delta opioid receptors (DOR) on human peripheral blood CD4+ T cells and DOR-dependent suppression of HIV-1 expression. *J Immunol.* 2001; 167: 1097-102.
6. **Salzet M.** Neuroimmunology of opioids from invertebrates to human. *Neuro Endocrinol Lett.* 2001; 22: 467-74.

7. **Stefano GB, Fricchione G, Goumon Y, Esch T.** Pain, immunity, opiate and opioid compounds and health. *Med Sci Monit.* 2005;11: MS47-53.
8. **Cadet P, Mantione KJ, Stefano GB.** Molecular identification and functional expression of mu 3, a novel alternatively spliced variant of the human mu opiate receptor gene. *J Immunol.* 2003; 170: 5118-23.
9. **Stefano GB, Hartman A, Bilfinger TV, Magazine HL, Liu Y, Casares F, et al.** Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation. *J Biol Chem.* 1995; 270: 30290-3.
10. **Cadet P.** Mu opiate receptor subtypes. *Med Sci Monit.* 2004; 10: MS28-32.
11. **Pan YX.** Diversity and complexity of the mu opioid receptor gene: alternative pre-mRNA splicing and promoters. *DNA Cell Biol.* 2005; 24: 736-50.
12. **Makman MH, Bilfinger TV, Stefano GB.** Human granulocytes contain an opiate alkaloid-selective receptor mediating inhibition of cytokine-induced activation and chemotaxis. *J Immunol.* 1995; 154: 1323-1330.
13. **Gintzler AR, Levy A, Spector S.** Antibodies as a Means of Isolating and Characterizing Biologically Active Substances: Presence of a Non-Peptide, Morphine-Like Compound in the Central Nervous System. *PNAS.* 1976; 73: 2132-2136.
14. **Gintzler AR, Gershon MD, Spector S.** A nonpeptide morphine-like compound: immunocytochemical localization in the mouse brain. *Science.* 1978;199: 447-448.
15. **Goldstein A, Barrett RW, James IF, Lowney LI, Weitz CJ, Knipmeyer LL, et al.** Morphine and Other Opiates from Beef Brain and Adrenal. *PNAS.* 1985; 82: 5203-5207.
16. **Stefano G, Digenis A, Spector S, Leung M, Bilfinger T, Makman M, et al.** Opiate-Like Substances in an Invertebrate, an Opiate Receptor on Invertebrate and Human Immunocytes, and a Role in Immunosuppression. *PNAS.* 1993; 90: 11099-11103.
17. **Zhu W, Cadet P, Baggerman G, Mantione KJ, Stefano GB.** Human white blood cells synthesize morphine: CYP2D6 modulation. *J Immunol.* 2005; 175: 7357-62.
18. **Boettcher C, Fellermeier M, Boettcher C, Dräger B, Zenk MH.** How human neuroblastoma cells make morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102: 8495-8500.
19. **Poeaknapo C, Schmidt J, Brandsch M, Dräger B, Zenk MH.** Endogenous formation of morphine in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 14091-6.
20. **Liu Y, Bilfinger TV, Stefano GB.** A rapid and sensitive quantitation method of endogenous morphine in human plasma. *Life Sciences.* 1996; 60: 237-243.
21. **Brix-Christensen V, Tonnesen E, Sánchez RG, Bilfinger TV, B. Stefano G.** Endogenous morphine levels increase following cardiac surgery as part of the antiinflammatory response? *International Journal of Cardiology.* 1997; 62: 191-197.
22. **Mantione KJ, Cadet P, Zhu W, Kream RM, Sheehan M, Fricchione GL, et al.** Endogenous morphine signaling via nitric oxide regulates the expression of CYP2D6 and COMT: autocrine/paracrine feedback inhibition. *Addict Biol.* 2008; 13: 118-23.
23. **Plotnikoff NP, Faith RE, Murgó AJ, Herberman RB, Good RA.** Methionine enkephalin: a new cytokine—human studies. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997; 82: 93-101.
24. **Lysle DT, Coussons ME, Watts VJ, Bennett EH, Dykstra LA.** Morphine-induced alterations of immune status: dose dependency, compartment specificity and antagonism by naltrexone. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993; 265: 1071-1078.
25. **Gaveriaux-Ruff C, Matthes HWD, Peluso J, Kieffer BL.** Abolition of morphine-immunosuppression in mice lacking the  $\mu$ -opioid receptor gene. *PNAS.* 1998; 95:6326-6330.
26. **Weber RJ, Gómez-Flores R, Sora I, Uhl G.** Loss of Morphine-induced Suppression of NK Cell activity and T-cell Functions in  $\mu$ -Opioid Receptor Knockout Mice. *Am. J. Immunol.* 2006; 2: 35-39.
27. **Yokota T, Uehara K, Nomoto Y.** Intrathecal morphine suppresses NK cell activity following abdominal surgery. *Can J Anaesth.* 2000; 47: 303-8.
28. **Yokota T, Uehara K, Nomoto Y.** Addition of noradrenaline to intrathecal morphine augments the postoperative suppression of natural killer cell activity. *J Anesth.* 2004;18: 190-5.
29. **Yeager MP, Colacchio TA, Yu CT, Hildebrandt L, Howell AL, Weiss J, et al.** Morphine inhibits spontaneous and cytokine-enhanced natural killer cell cytotoxicity in volunteers. *Anesthesiology.* 1995; 83:500-8.
30. **Lodoen MB, Lanier LL.** Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18: 391-8.
31. **French AR, Yokoyama WM.** Natural killer cells and



- viral infections. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:45-51.
32. **Roy S, Balasubramanian S, Sumandeep S, Charboneau R, Wang J, Melnyk D, et al.** Morphine directs T cells toward T(H2) differentiation. *Surgery.* 2001; 130: 304-9.
  33. **Ford M, Delaney K, Ling L, Erickson T.** *Clinical Toxicology Philadelphia (Eds): W.B. Saunders Company;* 2001.
  34. **Stuart-Harris R, Joel SP, McDonald P, Currow D, Slevin ML.** The pharmacokinetics of morphine and morphine glucuronide metabolites after subcutaneous bolus injection and subcutaneous infusion of morphine. *Br J Clin Pharmacol.* 2000; 49: 207-14.
  35. **Shargel L, Yu A.** *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics.* Third edition. [Prentice-Hall International, I. ed.] 1993.
  36. National Highway Traffic Safety Administration. *Drugs and Human Performance FACT SHEETS – Morphine (and Heroin).* [Consultado: Septiembre 5 de 2008]. Disponible en: <http://www.nhtsa.dot.gov/People/injury/research/job185drugs/morphine.htm>.
  37. **Borish LC, Steinke JW.** 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111: S460-75.
  38. **Nelson BH.** IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol.* 2004; 172: 3983-8.
  39. **Wang X, Tan N, Douglas SD, Zhang T, Wang YJ, Ho WZ.** Morphine inhibits CD8+ T cell-mediated, noncytolytic, anti-HIV activity in latently infected immune cells. *J Leukoc Biol.* 2005; 78: 772-6.
  40. **Li Y, Zhang T, Douglas SD, Lai JP, Xiao WD, Pleasure DE, et al.** Morphine enhances hepatitis C virus (HCV) replicon expression. *Am J Pathol.* 2003; 163: 1167-75.
  41. **Clerici M, Shearer GM.** A TH1→TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today.* 1993;14: 107-11.
  42. **Clerici M, Shearer GM.** The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today.* 1994; 15: 575-81.
  43. **Klein SA, Dobbmeyer JM, Dobbmeyer TS, Pape M, Ottmann OG, Helm EB, et al.** Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. *Aids.* 1997; 11: 1111-8.
  44. **Meyaard L, Hovenkamp E, Keet IP, Hooibrink B, de Jong IH, Otto SA, et al.** Single cell analysis of IL-4 and IFN-gamma production by T cells from HIV-infected individuals: decreased IFN-gamma in the presence of preserved IL-4 production. *J Immunol.* 1996; 157: 2712-2718.
  45. **Becker Y.** The changes in the T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine balance during HIV-1 infection are indicative of an allergic response to viral proteins that may be reversed by Th2 cytokine inhibitors and immune response modifiers—a review and hypothesis. *Virus Genes.* 2004; 28: 5-18.
  46. **Ramalingam S, Kannangai R, Vijayakumar TS, Mathai D, Abraham OC, Subramanian S, et al.** Subtype & cytokine profiles of HIV infected individuals from south India. *Indian J Med Res.* 2005; 121: 226-34.
  47. **Vultaggio A, Lombardelli L, Giudizi MG, Biagiotti R, Mazzinghi B, Scaletti C, et al.** T cells specific for *Candida albicans* antigens and producing type 2 cytokines in lesional mucosa of untreated HIV-infected patients with pseudomembranous oropharyngeal candidiasis. *Microbes Infect.* 2008; 10: 166-74.
  48. **Govitrapong P, Suttitum T, Kotchabhakdi N, Uneklabh T.** Alterations of immune functions in heroin addicts and heroin withdrawal subjects. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 286: 883-9.
  49. **Sibiryak SV, Risberg VU, Yusupova RS, Kurchatova NN.** The Immune Status and Lymphocyte Apoptosis in the Opioid Addicts. *Russ J Immunol.* 2001;6:281-290.
  50. **Azarang A, Mahmoodi M, Rajabalian S, Shekari MA, Nosratabadi J, Rezaei N.** T-helper 1 and 2 serum cytokine assay in chronic opioid addicts. *Eur Cytokine Netw.* 2007; 18: 210-4.
  51. **Eisenstein TK, Rahim RT, Feng P, Thingalaya NK, Meissler JJ.** Effects of opioid tolerance and withdrawal on the immune system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2006; 1: 237-49.
  52. **Wang X, Douglas SD, Peng JS, Zhou DJ, Wan Q, Ho WZ.** An in vitro model of morphine withdrawal manifests the enhancing effect on human immunodeficiency virus infection of human T lymphocytes through the induction of substance P. *Am J Pathol.* 2006;169: 1663-70.
  53. **Wang CQ, Li Y, Douglas SD, Wang X, Metzger DS, Zhang T, et al.** Morphine withdrawal enhances hepatitis C virus replicon expression. *Am J Pathol.* 2005; 167: 1333-40.
  54. **Moore K, Dusheiko G.** Opiate abuse and viral replication in hepatitis C. *Am J Pathol.* 2005; 167: 1189-91.
  55. **Shepard CW, Finelli L, Alter MJ.** Global epi-

- miology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5: 558-67.
56. **Beilin B, Grinevich G, Yardeni IZ, Bessler H.** Tramadol does not impair the phagocytic capacity of human peripheral blood cells: [Le tramadol ne change pas la capacité phagocytaire des cellules du sang périphérique humain]. *Can J Anesth.* 2005; 52: 1035-1039.
  57. **Welters ID, Menzebach A, Goumon Y, Langefeld TW, Teschemacher H, Hempelmann G, et al.** Morphine suppresses complement receptor expression, phagocytosis, and respiratory burst in neutrophils by a nitric oxide and mu(3) opiate receptor-dependent mechanism. *J Neuroimmunol.* 2000; 111: 139-45.
  58. **Magazine HI, Liu Y, Bilfinger TV, Fricchione GL, Stefano GB.** Morphine-induced conformational changes in human monocytes, granulocytes, and endothelial cells and in invertebrate immunocytes and microglia are mediated by nitric oxide. *J Immunol.* 1996; 156: 4845-4850.
  59. **Valentine JL, Plotnikoff NP.** Distribution and uptake of methionine enkephalin into human blood cells. *FASEB JOURNAL.* 1988; 2: 4518.
  60. **Stefano GB, Goumon Y, Casares F, Cadet P, Fricchione GL, Rialas C, et al.** Endogenous morphine. *Trends Neurosci.* 2000; 23: 436-42.
  61. **Mantione KJ, Goumon Y, Esch T, Stefano GB.** Morphine 6beta glucuronide: fortuitous morphine metabolite or preferred peripheral regulatory opiate? *Med Sci Monit.* 2005; 11: MS43-46.
  62. **Glattard E, Muller A, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Stefano GB, Goumon Y.** Rethinking the opiate system? Morphine and morphine-6-glucuronide as new endocrine and neuroendocrine mediators. *Med Sci Monit.* 2006; 12: SR25-7.
  63. **Goumon Y, Muller A, Glattard E, Marban C, Gasnier C, Strub J-M, et al.** Identification of Morphine-6-glucuronide in Chromaffin Cell Secretory Granules. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 8082-8089.
  64. **Hutchinson MR, Somogyi AA.** Relationship between 4,5-epoxymorphinan structure and in vitro modulation of cell proliferation. *Eur J Pharmacol.* 2004; 494: 251-62.
  65. **Narváez G, Guerrero C.** Bases moleculares de la inmunotoxicología experimental de la marihuana. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb.* 2006; 54: 290-300.
  66. **Risdahl JM, Khanna KV, Peterson PK, Molitor TW.** Opiates and infection. *J Neuroimmunol.* 1998; 83: 4-18.
  67. **Cone EJ.** Recent discoveries in pharmacokinetics of drugs of abuse. *Toxicol Lett.* 1998; 102-103: 97-101.