



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SEDE SUR
DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA**

Efecto de la administración repetida de morfina o fentanilo sobre la activación del inflamasoma NLRP3 en la SGPA y el NDR de ratas Wistar y su relación con el desarrollo de tolerancia antinociceptiva

Tesis que presenta

César Javier Carranza Aguilar

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias en
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directoras de tesis: Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo y Dra. Claudia González Espinosa

Ciudad de México

Enero, 2021

Este trabajo se realizó en los laboratorios 10 y 11 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, bajo la tutoría de la Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo y de la Dra. Claudia González Espinosa. Se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca de doctorado No. 338376 y de los proyectos: SEP-Cinvestav 101 y CONACYT-ANR-188565. Durante la realización de este proyecto se realizó una estancia de investigación en el laboratorio de la Dra. Marisela Morales en el Instituto Nacional sobre el Abuso de Drogas (National Institute on Drug Abuse) en Baltimore, Estados Unidos contando con el apoyo del proyecto #16-INB-4 de NIDA/IRP.

*“Talent develops in tranquility,
character in the full current of human life”*

Goethe

Agradecimientos

A las doctoras Silvia L. Cruz Martín del Campo y Claudia González Espinosa. Gracias por su confianza, por creer en mí, por apoyarme y por brindarme las bases y el conocimiento para mi formación como doctor en ciencias. Este logro se debe a que aprendí de las mejores.

A los miembros de mi sínodo. La doctora Mónica Lamas y los doctores Vinicio Granados, Emilio Galván y Fernando Peña, porque sus comentarios y recomendaciones a lo largo de estos años me sirvieron para mejorar la investigación realizada durante mi doctorado.

A la doctora Marisela Morales y el doctor Carlos Mejías, quienes me recibieron en su laboratorio durante mi estancia en NIDA. Gracias por todo el apoyo que me brindaron.

A la M. en C. Araceli Hernández y al técnico en investigación Abraham Contreras. Muchas gracias por su ayuda en los experimentos. Fue un gusto trabajar a su lado.

A mis compañeros de laboratorio Ana Karen, Valeria, Frida, Aztlani, Gaby, Monse, Nadiecha, Zyanya e Iván, ya que, al desarrollar diversos temas y discutirlos en cada seminario, me ayudaron a enriquecer mi conocimiento y mi capacidad crítica.

A Lizette Osorio, Jimena López y Ricardo Sánchez a quienes tuve oportunidad de conocer durante su servicio social y tesis de licenciatura. Espero haber ayudado a su formación profesional. De ustedes aprendí la importancia de transmitir el conocimiento.

Especialmente gracias a mi familia, porque siempre me apoyan en todas mis decisiones. Sé que puedo contar con ustedes para todo y que siempre estarán ahí. Muchas gracias por animarme a seguir adelante y por enseñarme a ser una mejor persona cada día.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a los más peques de la familia: Mi hermana Diana, mis sobrinas Mireya y Yaeli y mis sobrinos Héctor, Cristian y Gael. De ustedes aprendí a enfrentar la vida de la mejor manera posible y con una actitud positiva.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
1. Introducción	1
1.1. Generalidades y efectos de los opioides.....	2
1.1.1. La morfina	3
1.1.2. El fentanilo	5
1.2. Mecanismo de acción de los opioides.....	7
1.3. Vías de transmisión del dolor	9
1.3.1. La sustancia gris periacueductal	10
1.3.2. El núcleo dorsal del rafe	12
1.4. Mecanismos propuestos de desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo de los opioides.....	13
1.5. Neuroinflamación	14
1.5.1. Microglía.....	15
1.5.2. Astrocitos.....	17
1.6. Relación entre la neuroinflamación, el dolor y los opioides	19
1.6.1. Mecanismos de activación de microglía y astrocitos.....	21
1.6.2. Evidencias de la activación del inflammasoma NLRP3 por opioides.....	22
1.7. Planteamiento del problema	26
2. Hipótesis.....	27

3. Objetivos.....	27
3.1. Objetivo general.....	27
3.2. Objetivos particulares.....	27
4. Materiales y métodos	28
4.1. Animales.....	28
4.2. Fármacos.....	28
4.3. Evaluación del efecto nociceptivo.....	29
4.4. Obtención de tejido cerebral	30
4.5. Inmunofluorescencia.....	30
4.6. Microscopía de epifluorescencia y confocal.....	32
4.7. Cuantificación de imágenes.....	33
4.8. Análisis estadístico	35
4.9. Diseño experimental.....	36
4.9.1. Experimento 1: Determinación de las dosis equianalgésicas de morfina o fentanilo.....	37
4.9.2. Experimento 2: Establecimiento de un modelo de neuroinflamación mediante la administración sistémica de LPS.....	37
4.9.3. Experimento 3: Inducción de tolerancia el efecto antinociceptivo de la morfina y el fentanilo	37
4.9.4. Experimento 4: Evaluación de la neuroinflamación en la SGPA y el NDR de ratas tratadas repetidamente con morfina o fentanilo.....	38
4.9.5. Experimento 5: Determinación de la localización y la activación del inflamasoma NLRP3 inducido por la administración repetida de morfina o fentanilo.....	38
4.9.6. Experimento 6: Efecto del bloqueo de los receptores opioides y del TLR4 sobre los efectos neuroinflamatorios de los opioides	38
4.9.7. Experimento 7: Efecto la minociclina sobre la tolerancia antinociceptiva producida por morfina o fentanilo	39
4.9.8. Experimento 8: Efecto del MCC950 sobre la tolerancia antinociceptiva y la neuroinflamación inducidas por morfina o fentanilo.....	39

5.	Resultados	40
5.1.	El fentanilo es más potente que la morfina para producir antinocicepción en ratas Wistar	40
5.2.	La morfina y el fentanilo producen diferentes grados de tolerancia a su efecto antinociceptivo después de su administración repetida	41
5.3.	El LPS induce la expresión de NLRP3 en microglía, astrocitos y neuronas de la SGPA y el NDR.....	43
5.4.	La administración repetida de morfina o fentanilo induce la activación del inflammasoma NLRP3 y el aumento en la activación de la microglía y los astrocitos en la SGPA y el NDR.....	44
5.5.	El NLRP3 inducido por la administración repetida de morfina o fentanilo se localiza en neuronas y astrocitos, pero no en microglía.....	46
5.6.	El NLRP3 inducido por la administración repetida de morfina y fentanilo se localiza en neuronas serotoninérgicas del NDR	47
5.7.	La administración repetida de morfina o fentanilo inducen la activación de caspasa-1 y GSDMD-N.....	48
5.8.	Los receptores opioides y TLR4 participan de manera diferencial en la neuroinflamación inducida por opioides	50
5.9.	La minociclina y el MCC950 retrasan el desarrollo de tolerancia antinociceptiva a morfina y fentanilo y evitan el desarrollo de hiperalgesia producido por fentanilo.....	51
5.10.	El fármaco MCC950 evita la oligomerización del inflammasoma NLRP3 producida por la administración repetida de morfina y fentanilo	53
6.	Discusión	55
6.1.	Existen diferencias entre la morfina y el fentanilo para producir tolerancia antinociceptiva y en su capacidad para producir neuroinflamación en el NDR, donde los efectos del fentanilo son más evidentes	56
6.2.	A diferencia de un reto inmunológico, la activación de NLRP3 inducida por la morfina o el fentanilo sucede específicamente en neuronas y astrocitos	59

6.3.	La activación del inflamasoma NLRP3 inducido por morfina o fentanilo produce piroptosis de neuronas serotoninérgicas.....	60
6.4.	Existe una participación diferencial de los receptores a opioides y el TLR4 en la neuroinflamación producida por morfina y fentanilo	62
6.5.	La activación de la vía receptor opioide-NF-kB-NLRP3 contribuye a la disminución del efecto antinociceptivo de la morfina y el fentanilo y al desarrollo de hiperalgesia producida por el fentanilo.....	63
6.6.	Mecanismos y vías adicionales que podrían estar involucrados en la activación del inflamasoma NLRP3 producida por la administración repetida de morfina o fentanilo.....	65
6.6.1.	Cambios en la vía de señalización canónica de los receptores opioides..	65
6.6.2.	Posible contribución de la hipoxia en la neuroinflamación producida por opioides.....	67
6.6.3.	Participación de la neurotransmisión serotoninérgica en los efectos neuroinflamatorios producidos por opioides	67
7.	Conclusiones.....	70
8.	Perspectivas.....	71
9.	Bibliografía.....	72
10.	Apéndice.....	91
10.1.	Cultivos primarios de microglía y astrocitos.....	91
10.2.	Artículos publicados	93

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación de opioides con actividad sobre el SNC.....	2
Figura 2. Algunos efectos producidos por la administración aguda y repetida de opioides.....	3
Figura 3. Mecanismo de acción del receptor μ opioide.....	8
Figura 4. Vías ascendente y descendente de la modulación del dolor.....	9
Figura 5. Sitios de acción de los opioides en la vía descendente de la transmisión del dolor.	11
Figura 6. Cambios morfológicos y funcionales de la microglía.....	16
Figura 7. Características morfológicas y funcionales de los astrocitos.....	18
Figura 8. Moduladores inflamatorios reportados en los diferentes niveles de las vías de la transmisión del dolor.....	19
Figura 9. Modulación de la función neuronal en respuesta a opioides mediante la liberación de mediadores inflamatorios de células gliales	20
Figura 10. Activación y ensamblaje del inflamasoma NLRP3.....	23
Figura 11. Características morfológicas de la muerte celular por piroptosis.....	24
Figura 12. Diseño experimental.....	36
Figura 13. Efecto antinociceptivo producido por la administración aguda de morfina o fentanilo.....	40
Figura 14. Efecto antinociceptivo producido por la administración repetida de morfina o fentanilo.....	42
Figura 15. Efectos neuroinflamatorios producidos por la administración aguda de LPS.....	43
Figura 16. Localización del inflamasoma NLRP3 en distintos tipos celulares de la SGPA/NDR.....	44

Figura 17. Activación del inflamasoma NLRP3 inducida por la administración repetida de morfina o fentanilo.....	45
Figura 18. Activación de la microglía y los astrocitos en respuesta a la administración repetida de morfina o fentanilo.....	46
Figura 19. Localización del inflamasoma NLRP3 en distintos tipos celulares del NDR.....	47
Figura 20. Localización del inflamasoma NLRP3 en neuronas serotoninérgicas inducido por la administración repetida de morfina o fentanilo	48
Figura 21. Expresión de las proteínas caspasa-1 y GSDMD-N en el NDR de ratas administradas repetidamente con morfina o fentanilo.....	49
Figura 22. Efecto de (-)-naloxona y (+)-naloxona sobre la neuroinflamación inducida por la administración repetida de morfina o fentanilo.....	50
Figura 23. Efecto de la minociclina o el MCC950 sobre los efectos nociceptivos producidos después de 19 administraciones de morfina o fentanilo	53
Figura 24. Efecto del MCC950 sobre la activación de NLRP3 inducida por la administración repetida de morfina o fentanilo.....	54
Figura 25. Cambios producidos en el efecto antinociceptivo y neuroinflamación producidos por la administración repetida de morfina o fentanilo.....	69
Figura 26. Cultivos primarios de células extraídas de la SGPA/NDR de ratas Wistar.....	92

Índice de tablas

Tabla 1. Características químicas y diferencias entre la morfina y el fentanilo.....	6
Tabla 2. Descripción de los anticuerpos utilizados.....	31
Tabla 3. Condiciones empleadas para la obtención de imágenes mediante microscopía de epifluorescencia y confocal.....	33
Tabla 4. Valores de Emax y área bajo la curva (ABC) correspondientes a la evaluación durante 120 minutos del curso temporal del efecto antinociceptivo.....	51

Abreviaturas

5-HT	5-hidroxitriptamina; serotonina
5-HT_{1A}	Receptor de 5-HT subtipo 1A
ABC	Área Bajo la Curva
AC	Adenilato Ciclasa
ADME	Asta dorsal de la médula espinal
AMP	Adenosín monofosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ASC	Proteína Adaptadora de los Receptores Tipo NOD. Proteína tipo speck asociada a apoptosis (<i>Apoptosis-associated speck-like protein</i>)
ATP	Adenosín trifosfato
CCK	Colecistocinina (<i>Cholecystokinin</i>)
CD11b	Molécula de diferenciación 11b (CD11b) (<i>Cluster of differentiation molecule 11b</i>)
CDR	Curva Dosis-Respuesta
CRE	Elemento de Respuesta a AMPc (<i>cAMP response element</i>)
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (<i>cAMP responsive element binding protein</i>)
CYP P450	Citocromo P450 (<i>Cytochrome P450</i>)
CYP3A4	Citocromo P450 subunidad 3A4
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño (<i>Damage-associated molecular patterns</i>)
DAPI	Ácido desoxirribonucleico 2-(4-amidinofenil)-1h-indol-6-carboxamida (<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DIC	Contraste de Interferencia Diferencial (<i>Differential interference contrast</i>)
ERK1/2	Cinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>)
ESID	Iluminación y detección conmutables electrónicamente (<i>Electronically switchable illumination and detection</i>)
GABA	Ácido γ -aminobutírico (γ -aminobutyric acid)
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
GIRK	Canal de rectificación entrante de potasio acoplado a proteína G (<i>G protein-gated inwardly-rectifying potassium</i>)
GRK	Cinasas de receptores acoplados a proteínas G (<i>G protein-coupled receptor kinases</i>)

GSDMD	Gasdermina D (<i>Gasdermin D</i>)
GSDMD-N	Extremo amino-terminal de la gasdermina D (<i>Gasdermin D N-terminal</i>)
HMGB1	Proteína de alta movilidad del grupo 1 (<i>High mobility group box 1 protein</i>)
IL-1β	Interleucina-1 β (<i>Interleukin-1β</i>)
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal (<i>c-Jun N-terminal kinases</i>)
LRR	Repetición rica en leucinas (<i>Leucine-rich repeat</i>)
M3G	Morfina 3 glucurónido (<i>Morphine-3-glucuronide</i>)
M6G	Morfina 6 glucurónido (<i>Morphine-6-glucuronide</i>)
MAPKs	Proteínas cinasas activadas por mitógenos (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MRVM	Médula rostral ventromedial
NDR	Núcleo dorsal del raquí
NeuN	Antígeno de núcleos neuronales (<i>Neuronal nuclear antigen</i>)
NF-κB	Factor nuclear kappa B (<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NLRP3	Proteína receptora tipo NOD 3 (<i>Nod-like receptor protein 3</i>)
NLRs	Receptores tipo NOD (<i>NOD-like receptors</i>)
NOD	Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>)
ORL-1	Receptor opioide tipo 1 (<i>Opioid receptor-like 1</i>)
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PFA	Paraformaldehído (<i>Paraformaldehyde</i>)
PKA	Proteína cinasa A (<i>Protein kinase A</i>)
SFB	Suero fetal bovino
SGPA	Sustancia Gris Periacueductal
SNC	Sistema Nervioso Central
TLR4	Receptor tipo Toll 4 (<i>Toll-like receptor</i>)
TPH-2	Triptófano hidroxilasa 2 (<i>Tryptophan hydroxylase 2</i>)
UDP-GT	Uridinadifosfato glucuroniltransferasa (<i>Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase</i>)

Resumen

La morfina induce neuroinflamación mediante la activación de receptores tipo NOD 3 (NLRP3) en las células gliales, pero se desconoce la capacidad de otros opioides para inducir neuroinflamación y su relación con el desarrollo de tolerancia analgésica. En este trabajo estudiamos los efectos de la morfina y el fentanilo sobre la activación del inflamasoma NLRP3 en células gliales y neuronales de la sustancia gris periacueductal (SGPA) y del núcleo dorsal del rafe (NDR), regiones involucradas en la regulación del dolor. Se utilizaron ratas Wistar macho que recibieron, por vía intraperitoneal, morfina (10 mg/kg) o fentanilo (0.1 mg/kg) 3 veces al día durante 7 días y se emplearon para determinar los efectos antinociceptivos de ambos compuestos. Dos horas después de la última administración, analizamos la oligomerización de NLRP3, la activación de caspasa-1 y la expresión de Gasdermina-D-N (GSDMD-N) en microglía (células positivas para CD11b), astrocitos (células positivas para GFAP) y neuronas (células positivas para NeuN). La administración repetida produjo tolerancia a ambos opioides, pero solo el fentanilo produjo hiperalgesia. La morfina y el fentanilo activaron el inflamasoma NLRP3, pero el efecto del fentanilo fue más pronunciado en el NDR que en la SGPA. La oligomerización del NLRP3 inducida por opioides se hizo evidente en astrocitos y neuronas serotoninérgicas (positivas para TPH-2). Ambos opioides aumentaron la inmunorreactividad de GFAP y CD11b y la activación de caspasa-1 y GSDMD, lo que indica la muerte de las células por piroptosis. El antagonista del receptor opioide (-)-naloxona, pero no el antagonista del receptor TLR4 (+)-naloxona, previno la activación de la microglía y la oligomerización de NLRP3. Solo la (+)-naloxona previno la activación de los astrocitos. El agente anti-inflamatorio minociclina y el inhibidor de NLRP3 MCC950 retrasaron la tolerancia a la antinocicepción inducida por morfina y fentanilo y previnieron la hiperalgesia inducida por fentanilo. El MCC950 también previno la oligomerización de NLRP3 inducida por opioides. En conclusión, la morfina y el fentanilo inducen diferencialmente la activación del inflamasoma NLRP3 y la piroptosis en células específicas del NDR por un mecanismo que involucra la activación de los receptores opioides en las neuronas y del receptor TLR4 en astrocitos. Este efecto está involucrado en la tolerancia antinociceptiva inducida por opioides y la hiperalgesia inducida por fentanilo después de administraciones repetidas.

Abstract

Morphine promotes neuroinflammation after NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) oligomerization in glial cells, but the capacity of other opioids such as fentanyl to induce neuroinflammation and its relationship to the development of analgesic tolerance is unknown. Here, we studied the effects of morphine and fentanyl on NLRP3 inflammasome activation in glial and neuronal cells in the periaqueductal gray (PAG) and the dorsal raphe nucleus (DRN), regions involved in pain regulation. Male Wistar rats received i.p. injections of morphine (10 mg/kg) or fentanyl (0.1 mg/kg) 3x daily for 7 days and were tested for nociception. Two hours after the last (19th) administration, we analyzed NLRP3 oligomerization, caspase-1 activation and gasdermin D-N (GSDMD-N) expression in microglia (CD11b-positive cells), astrocytes (GFAP-positive cells), and neurons (NeuN-positive cells). Tolerance developed to both opioids, but only fentanyl produced hyperalgesia. Morphine and fentanyl activated NLRP3 inflammasome. This effect was more evident with fentanyl. NLRP3 activation occurred in astrocytes and serotonergic (TPH-2-positive) neurons, but fentanyl effects were more pronounced. Both opioids increased GFAP and CD11b immunoreactivity and caspase-1 and GSDMD activation, indicating pyroptotic cell death. The opioid receptor antagonist (-)-naloxone, but not the TLR4 receptor antagonist (+)-naloxone, prevented microglia activation, and NLRP3 oligomerization. Only (+)-naloxone prevented astrocytes' activation. The anti-inflammatory agent minocycline and the NLRP3 inhibitor MCC950 delayed tolerance to morphine and fentanyl antinociception and prevented fentanyl-induced hyperalgesia. MCC950 also prevented opioid-induced NLRP3 oligomerization. In conclusion, morphine and fentanyl differentially induce cell-specific activation of NLRP3 inflammasome and pyroptosis in the DRN through TLR4 receptors in astrocytes and opioid receptors in neurons, indicating that neuroinflammation is involved in opioid-induced analgesia and fentanyl-induced hyperalgesia after repeated administrations.

1. Introducción

La morfina y el fentanilo son opioides que se utilizan ampliamente en la clínica para el alivio del dolor. Ambos ejercen su efecto analgésico a través de la activación del receptor μ opioide localizado en fibras nociceptivas periféricas y en regiones del sistema nervioso central (SNC) que forman parte de la vía de la transmisión del dolor; en particular, la médula espinal, la sustancia gris periacueductal (SGPA) y el núcleo dorsal del raquídeo (NDR). Aunque estos fármacos son ligandos del mismo receptor, difieren en potencia y en su capacidad para generar tolerancia analgésica después de su administración repetida. Algunos cambios que subyacen al desarrollo de tolerancia analgésica se deben a la acción de mediadores neuroinflamatorios liberados de la microglía y los astrocitos que representan a las células inmunocompetentes residentes dentro del SNC. Los opioides pueden actuar en estas células mediante la activación del receptor μ opioide expresado en su membrana o mediante su unión al receptor de la inmunidad innata tipo Toll 4 (TLR4). Tanto la microglía como los astrocitos modulan diversas funciones neuronales mediante la liberación de la interleucina (IL) 1β . Esta citocina madura y se libera después de la activación del NLRP3, un complejo multiproteico intracelular denominado inflamasoma. La activación de este complejo puede inducir piroptosis, un tipo de muerte celular inflamatoria. Sin embargo, hasta ahora, no se han caracterizado las diferencias que podrían existir entre los diversos opioides en la activación de NLRP3 ni si éstas pudieran estar relacionadas con su distinta capacidad para inducir tolerancia analgésica. Por lo tanto, en este trabajo utilizamos un esquema de administración repetida de dosis equianalgésicas de morfina y fentanilo para comparar sus efectos neuroinflamatorios en la SGPA y el NDR, dos regiones importantes en la vía de la transmisión del dolor. Específicamente, evaluamos el papel de la piroptosis dependiente de NLRP3 en el desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo de la morfina y el fentanilo. Además, estudiamos la participación de los receptores opioides y TLR4 en los efectos neuroinflamatorios producidos por ambos opioides. A continuación, se presenta un panorama detallado de los antecedentes de este estudio.

1.1. Generalidades y efectos de los opioides

El opio es una sustancia que se extrae del exudado lechoso de la especie de amapola *Papaver somniferum* (Koob et al., 2014; Li et al., 2020). Esta sustancia y algunos alcaloides derivados se utilizan desde tiempos ancestrales para el alivio del dolor (Martínez y Ballesteros, 2019). A los compuestos como la morfina, la codeína y la tebaína, que se extraen como subproductos del opio, se les denomina “opiáceos”. El término “opioides” se utiliza para nombrar a cualquier compuesto natural o sintético con actividad en el SNC a través de la activación del sistema opioide endógeno (Reisfield et al., 2007). En la figura 1 se muestran ejemplos de esta clasificación.

El sistema opioide endógeno se encarga de regular diversas funciones fisiológicas como la nocicepción, la respuesta a estímulos recompensantes, la locomoción, el aprendizaje y la respuesta inmune, entre otras (Akil et al., 1984). Estas funciones se regulan mediante la liberación a demanda de opioides endógenos como la β -endorfina, la encefalina, la dinorfina y la nociceptina (Akil et al., 1984; Larhammar et al., 2015; Massotte y Kieffer, 1998).

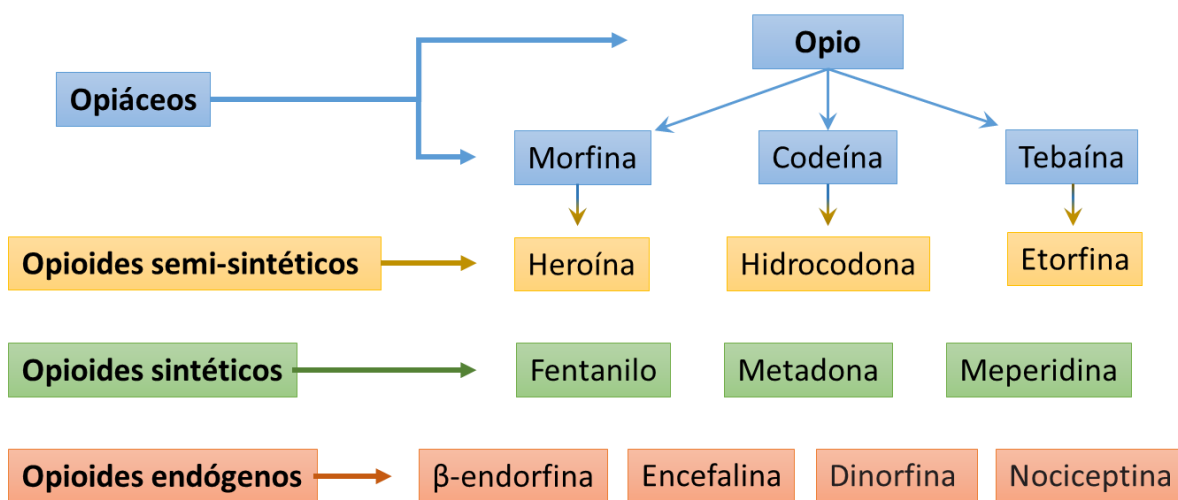


Figura 1. Clasificación de opioides con actividad sobre el SNC. Los opiáceos son sustancias que se extraen del opio, como la morfina, la codeína y la tebaína. Estas sustancias se pueden sintetizar para formar los opioides semi-sintéticos heroína, codeína y etorfina, respectivamente. Los opioides sintéticos incluyen al fentanilo, la metadona y la meperidina, entre otros. Los opioides endógenos β -endorfina, encefalina, dinorfina y nociceptina se producen en el organismo a partir de precursores específicos (Modificado de Koob et al., 2014).

Los opioides endógenos actúan en neuronas y otros tipos celulares a través de la activación de los receptores específicos tipo mu (μ), delta (δ), kappa (κ) y el receptor a nociceptina (ORL-1) (Massotte y Kieffer, 1998). Los opioides exógenos también se unen a receptores opioides, por lo que se utilizan principalmente para inducir analgesia (Massotte y Kieffer, 1998). Sin embargo, a pesar de que son sustancias controladas en la mayoría de países, también se comercializan como drogas de abuso (UNODC, 2019), lo que representa un alto riesgo para la salud. En la figura 2 se resumen algunos efectos generales de los opioides.

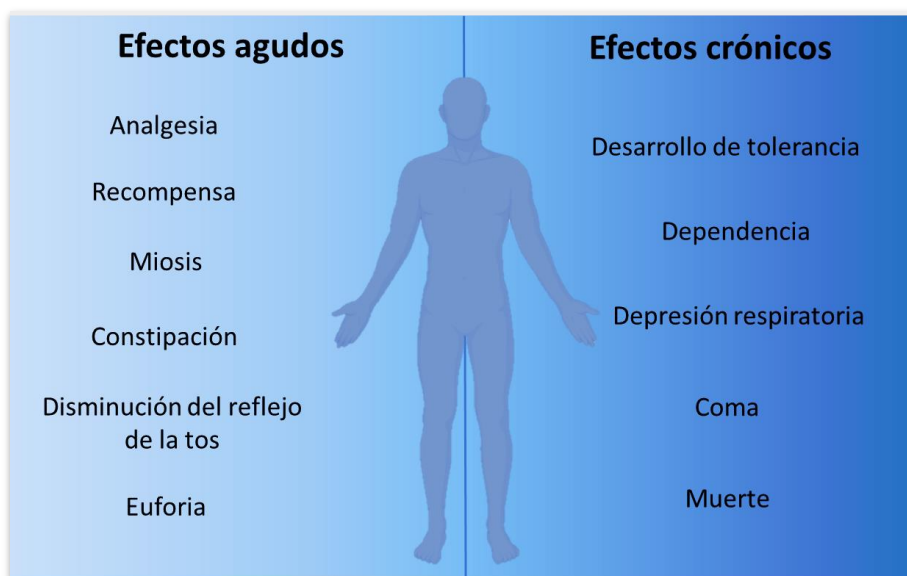


Figura 2. Algunos efectos producidos por la administración aguda y repetida de opioides. Los opioides producen alivio del dolor, pero también puede inducir efectos no deseados después de su uso repetido como tolerancia, dependencia, depresión respiratoria y la muerte.

1.1.1. La morfina

La morfina es el opioide más usado para tratar casi cualquier tipo de dolor intenso (Murphy et al., 2020). Sus efectos están asociados a la activación del receptor μ opioide, pero también tiene afinidad por los receptores δ y κ (MacKenzie et al., 2016). Este opioide atraviesa la barrera hematoencefálica de manera lenta en comparación con otros más liposolubles como el fentanilo (Chaves et al., 2017; Vallejo et al., 2011).

Los efectos de la morfina en el humano tienen una duración de entre 3-6 horas, dependiendo de la dosis y la vía de administración. La morfina se metaboliza mediante su conjugación con ácido glucurónico por la enzima uridina difosfo-glucoroniltransferasa 2B7 (UGT2B7). Esta reacción da como resultado la formación de los metabolitos secundarios morfina-3-glucuronido (M3G, 35-45 %) y morfina-6-glucuronido (M6G, 10-15 %); éste último con actividad analgésica. Por otra parte, el citocromo P450 (CYP) convierte una pequeña fracción de la morfina (5 % aproximadamente) en normorfina (DePriest et al., 2015). La excreción de la morfina sin cambios se da por vía renal mientras que los metabolitos se excretan por vía biliar (DePriest et al., 2015; MacKenzie et al., 2016).

En la clínica, la morfina se administra para el manejo del dolor abdominal, musculoesquelético, y el inducido por cáncer, artritis o infarto de miocardio. Puede administrarse por vía oral, sublingual, intravenosa, epidural e intratecal, dependiendo del tipo de dolor para el que se utilice; agudo o crónico (Murphy et al., 2020). Por ejemplo, durante los cuidados paliativos puede utilizarse la morfina sublingual, mientras que para el tratamiento del dolor severo se recomienda la administración aguda o crónica de morfina intravenosa (Coluzzi, 1998; Vahedi et al., 2019). Además, se ha reportado que se puede consumir de forma inhalada para aumentar su efecto y rendimiento como sustancia de abuso (Webster et al., 2017).

La administración aguda y repetida de la morfina puede producir efectos no deseados como la disminución de la frecuencia cardiaca, mareos, prurito, pérdida de memoria de corto plazo e inmunosupresión (Murphy et al., 2020). Además, el uso repetido de este opioide puede producir dependencia y tolerancia a su efecto analgésico (Al-Hashimi et al., 2013). Algunos opioides con propiedades farmacológicas semejantes a la morfina, como la metadona, la buprenorfina y el fentanilo, se pueden utilizar en dosis equianalgésicas cuando la morfina no es efectiva (DePriest et al., 2015).

1.1.2. El fentanilo

El fentanilo es un opioide sintético 50 a 100 veces más potente que la morfina (Suzuki y El-Haddad, 2017). Es un compuesto derivado de la familia de las piperidinas y es agonista total y selectivo del receptor μ opioide (Vardanyan y Hruby, 2014). El fentanilo atraviesa con facilidad la barrera hematoencefálica ya que es altamente liposoluble (Schaefer et al., 2017). Esta característica le permite producir un efecto analgésico que inicia en los primeros tres minutos después de su administración y tiene una duración de una a dos horas (DePriest et al., 2015; Kandasamy y Carlo, 2017). Se metaboliza por la enzima CYP3A4 produciendo los metabolitos hidroxifentanilo y norfentanilo, los cuales no tienen efectos tóxicos ni actividad sobre el SNC (Trescot et al., 2008; Vallejo et al., 2011). La eliminación de los sub-productos del fentanilo es por vía renal (DePriest et al., 2015).

En la clínica, el fentanilo se utiliza como sedante en cirugías de corta duración y como analgésico para tratar el dolor crónico en pacientes que desarrollaron tolerancia a otros opioides (Paix et al., 1995; Peng y Sandler, 1999). Se administra principalmente por vía intravenosa, intratecal e intramuscular para su efecto sedante, aunque en los últimos años se utiliza la vía de administración transdérmica en forma de parches, sublingual como película delgada e inhalada como aerosol (Peng y Sandler, 1999; Ramos-Matos et al., 2020). Este opioide también se utiliza como sustancia de abuso en todas sus formas de administración (Cruz et al., 2020).

La administración aguda de altas dosis de fentanilo puede producir efectos no deseados similares a los que causa la heroína como euforia, confusión, depresión respiratoria, náuseas, trastornos visuales, alucinaciones y delirio narcótico (Pichini et al., 2018). El uso prolongado del fentanilo puede producir pérdida de la memoria de corto plazo, rigidez muscular, dificultad para respirar por rigidez de los músculos de la pared torácica (tronco leñoso), estreñimiento, pérdida de la conciencia y, en casos de intoxicación severa, coma y muerte (Ramos-Matos et al., 2020). La mayoría de estos efectos se exacerban en presencia de otras sustancias de abuso como la heroína y la cocaína.

Varios reportes clínicos y pre-clínicos indican que la administración a largo plazo de fentanilo induce menor tolerancia a su efecto analgésico que la morfina y, en algunos casos, su uso repetido puede producir hiperalgesia, dependencia, síndrome serotoninérgico e inmunosupresión sistémica (Lyons et al., 2015; Rastogi et al., 2011; Sacerdote, 2008). En la tabla 1 se muestran algunas diferencias entre la morfina y el fentanilo.

Tabla 1. Características químicas y diferencias entre la morfina y el fentanilo

	<i>Morfina</i>	<i>Fentanilo</i>
<i>Naturaleza</i>	Derivado del opio	Sintético
<i>Selectividad</i>	Agonista μ , δ , κ	Agonista μ
<i>Dosis analgésica</i>	10 mg/kg	0.1 mg/kg
<i>Duración analgésica</i>	4-5 h	1-2 h
<i>Señalización preferencial</i>	Proteína G	β -arrestina
<i>Internalización del receptor</i>	+	+++
<i>Tolerancia analgésica por su administración repetida</i>	+++	+

+: menor magnitud; *+++*: mayor magnitud.

1.2. Mecanismo de acción de los opioides

Los opioides ejercen sus efectos mediante la activación de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas Gi/o (Al-Hasani y Bruchas, 2011). Cuando un agonista se une a su receptor, induce la disociación de la proteína Gi/o. El dímero $\beta\gamma$ se separa de la subunidad α y produce el bloqueo de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y la apertura de canales de rectificación entrante de K^+ (GIRK). El bloqueo de la entrada de calcio y la salida transitoria de potasio inducen hiperpolarización celular y disminución de la liberación de neurotransmisores (Khan et al., 2013; Lüscher y Slesinger, 2010). Por otra parte, la subunidad α de la proteína G inhibe la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC) lo que lleva a la disminución en la conversión del adenosín monofosfato cíclico (AMPC) a AMP. Esto evita la activación de la proteína cinasa A (PKA) lo que disminuye la activación del factor de transcripción CREB (*cAMP response element binding protein*). La inhibición de CREB evita su unión a elementos de respuesta a AMPC (CRE), y disminuye la transcripción de diversas proteínas. Adicionalmente, la activación del receptor opioide produce el reclutamiento de diversas proteínas reguladoras de su actividad, como las cinasas de los receptores acoplados a proteínas G (GRKs) y β -arrestinas. El reclutamiento de β -arrestina participa en la formación de vesículas de membrana que transportan a los receptores opioides hacia el interior de la célula. Una vez internalizado, el receptor puede señalizar hacia la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) o del factor de transcripción NF- κ B e inducir el aumento en la expresión de genes de proteínas pro-inflamatorias (Al-Hasani y Bruchas, 2011; Ho et al., 2009).

Los opioides pueden tener diferentes efectos debido a su capacidad para activar distintas vías de señalización actuando sobre el mismo receptor; a este fenómeno se le conoce como agonismo sesgado. Por ejemplo, mientras la morfina induce la señalización preferentemente hacia la vía mediada por la activación de las proteínas Gi/o, el fentanilo tiene señalización preferencial hacia el reclutamiento de β -arrestina (Bologna et al., 2017; McPherson et al., 2010; Molinari et al., 2010).

El sesgo en la señalización en las neuronas podría estar relacionado con la capacidad de cada opioide para internalizar al receptor (Zuo, 2005), inducir su reciclaje o degradación, y activar factores nucleares de transcripción como el NF- κ B o las MAPKs, como ERK, p38 y JNK (Allouche et al., 2014; Ho et al., 2009). En la figura 3 se detallan algunas de las características de la señalización del receptor μ opioide.

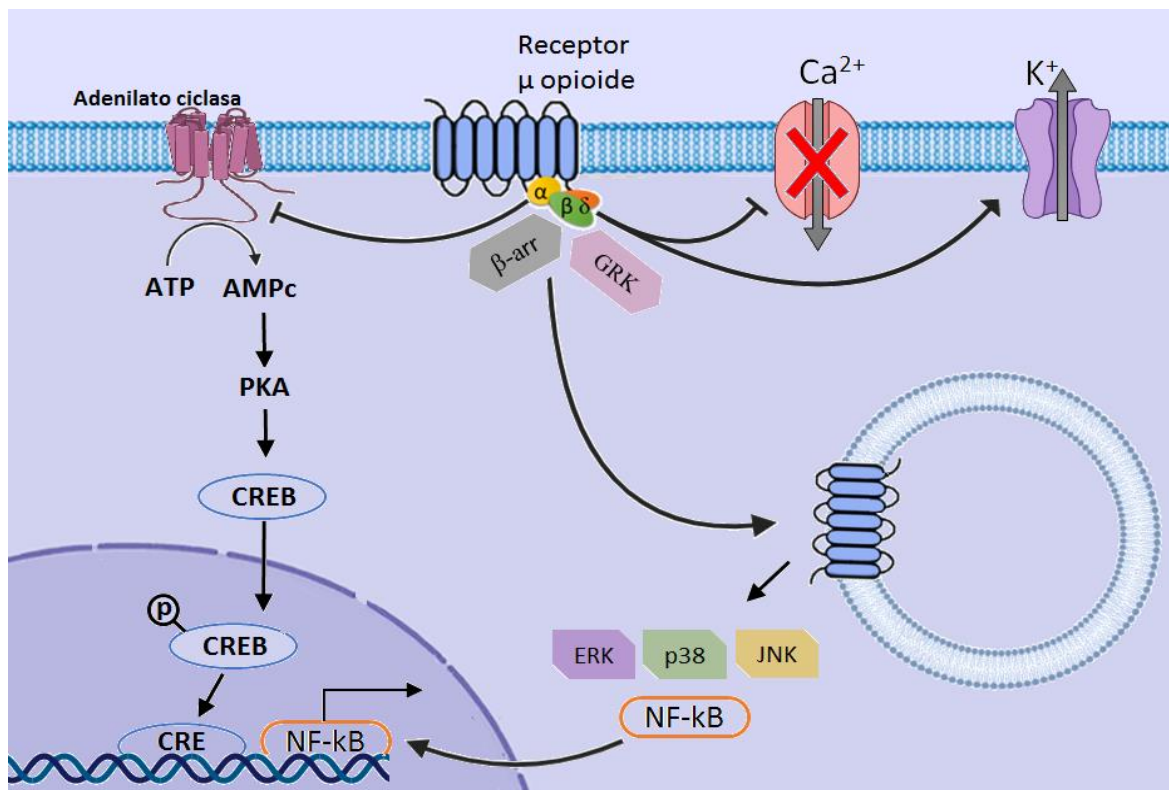


Figura 3. Mecanismo de acción del receptor μ opioide. La activación del receptor μ opioide induce la disociación de la proteína Gi/o. La subunidad α disminuye la síntesis de proteínas mediante la inhibición de la enzima adenilato ciclasa (AC). El complejo $\beta\gamma$ hiperpolariza la célula al activar canales GIRK y bloquear canales de Ca^{2+} . La internalización del receptor μ por β -arrestina (β -arr) lleva a la activación del factor de transcripción nuclear- κ B (NF- κ B) y de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) como ERK, p38 y JNK. ATP: Adenosín trifosfato; AMPc: Adenosín monofosfato cíclico; PKA: Proteína cinasa A; CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta a AMP; CRE: Elemento de respuesta a AMPc; GRK: Cinasas de receptores acoplados a proteínas G.

Los opioides ejercen su efecto analgésico al unirse al receptor μ opioide localizado en sitios pre- y post-sinápticos de fibras nociceptivas periféricas, del asta dorsal de la médula espinal (ADME), el tallo cerebral y la corteza (Sehgal et al., 2011). Además, estos receptores también se expresan en regiones supraespinales como la sustancia gris periacueductal (SGPA) y el núcleo dorsal del raquídeo (NDR), estructuras que forman parte de las vías de la transmisión del dolor (Bannister y Dickenson, 2020).

1.3. Vías de transmisión del dolor

Las vías de la transmisión del dolor se activan al estimular fibras nociceptivas periféricas (Yam et al., 2018). Los nociceptores se pueden activar mediante estímulos mecánicos, químicos o térmicos. El estímulo doloroso se transmite desde las neuronas sensoriales primarias hacia las neuronas de segundo orden localizadas en el ADME. Las neuronas de esta región envían, a su vez, proyecciones hacia estructuras supraespinales como el tálamo y la amígdala. En el tálamo, las neuronas proyectan hacia regiones somatosensoriales como la corteza del cíngulo anterior y la corteza de la ínsula (Fig. 4), que son regiones importantes para la percepción consciente del dolor (Sehgal et al., 2011).

Existen vías descendentes que modulan la transmisión ascendente del dolor (Bannister y Dickenson, 2020). Estructuras supraespinales como la amígdala, el hipotálamo y la corteza del cíngulo envían sus proyecciones hacia la SGPA. Aquí, las neuronas proyectan hacia el NDR y la médula rostral ventromedial (MRVM) que, a su vez, proyectan hacia la médula espinal donde pueden modular la transmisión del dolor (Bannister y Dickenson, 2016) (Fig. 4).

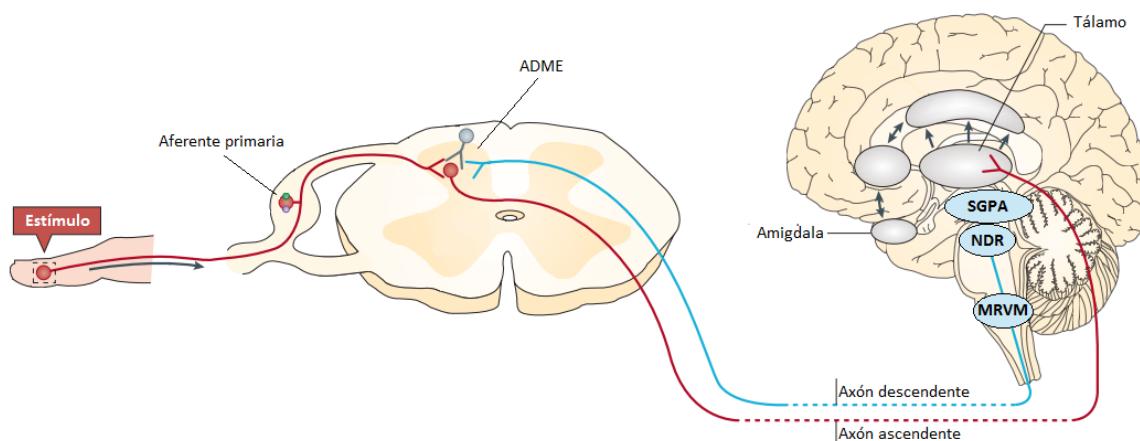


Figura 4. Vías ascendente y descendente de la modulación del dolor. Después de un estímulo a fibras nociceptivas periféricas, las neuronas primarias hacen sinapsis con neuronas en el asta dorsal de la médula espinal (ADME) que proyectan hacia estructuras supraespinales como el tálamo y la corteza. Estas estructuras envían sus proyecciones de manera descendente hacia la sustancia gris periacueductal (SGPA), el núcleo del rafé dorsal (NDR) y la médula rostral ventromedial (MRVM), regiones que modulan la transmisión del dolor mediante la liberación de serotonina y catecolaminas (Modificado de Parsadaniantz et al., 2015).

1.3.1. La sustancia gris periacueductal

La región ventrolateral de la SGPA es una estructura que recibe proyecciones de la médula espinal y de estructuras supraespinales como la corteza, la amígdala y el tálamo. Esta región cerebral tiene la función de mantener un balance entre la facilitación y la inhibición de la información nociceptiva (Benarroch, 2012).

Las proyecciones de la SGPA son en su mayoría glutamatérgicas, pero están localmente inhibidas por interneuronas GABAérgicas. La actividad neuronal de la SGPA se ve afectada principalmente por opioides endógenos que actúan sobre receptores μ opioides localizados en la superficie de las interneuronas GABAérgicas. Cuando disminuye el tono GABAérgico en la SGPA, por acción de opioides endógenos o exógenos, se activan las neuronas glutamatérgicas de esta región, lo que induce un aumento en la liberación de glutamato en varias regiones del SNC (Akerman et al., 2011; Benarroch, 2008).

El aumento en la actividad neuronal excitadora de la SGPA produce la activación de dos tipos de neuronas en la MRVM: células de apagado y células de encendido (Benarroch, 2012). Las células de apagado se activan por opioides a través de la desinhibición GABAérgica y liberan neurotransmisores inhibidores que bloquean los impulsos nociceptivos en la médula espinal. Por el contrario, las células glutamatérgicas de encendido tienen la función de facilitar la transmisión nociceptiva, pero pueden inhibirse directamente por opioides (Ossipov et al., 2010) (Fig. 5).

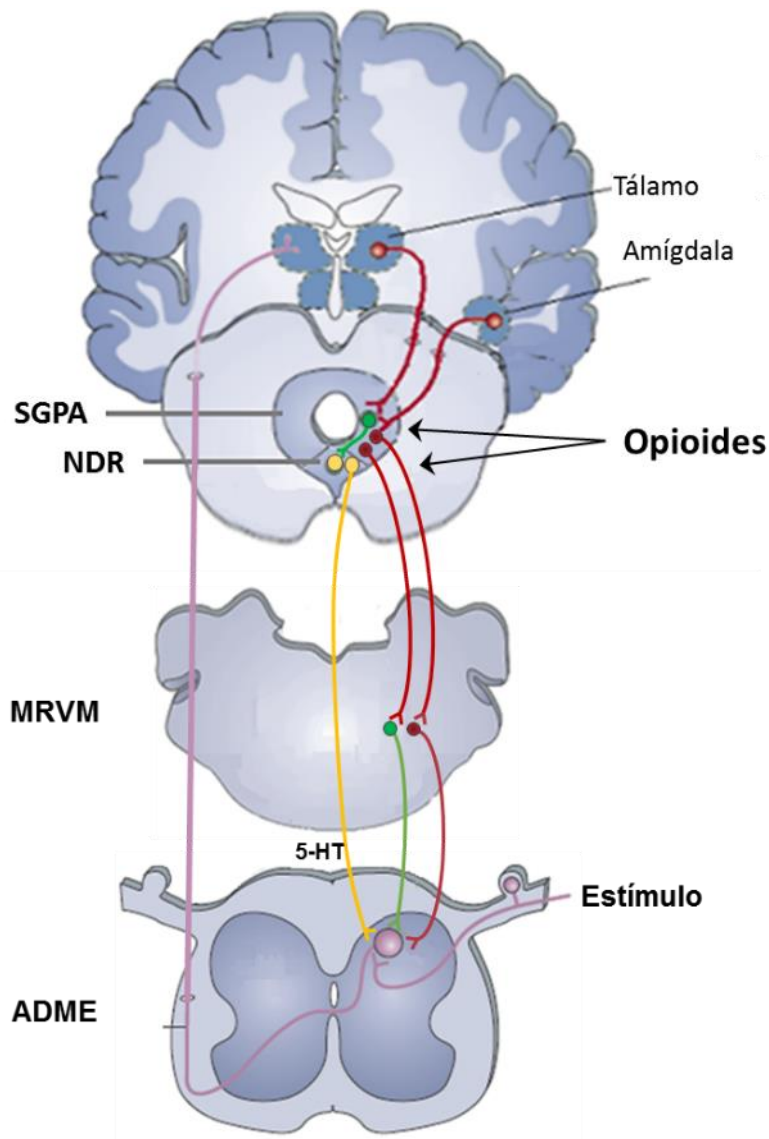


Figura 5. Sitios de acción de los opioides en la vía descendente de la transmisión del dolor. Los opioides inhiben el disparo de las interneuronas GABAérgicas localizadas en la sustancia gris periacueductal (SGPA). Esto permite que, después de un estímulo nociceptivo, estructuras como la amígdala y el tálamo activen neuronas glutamatérgicas (neuronas supraespinales mostradas en rojo). Estas neuronas activan a neuronas serotoninérgicas en el núcleo dorsal del rafe (NDR) (neuronas en amarillo) y noradrenérgicas de la médula rostral ventromedial (MRVM) (neuronas en verde). La serotonina (5-HT; 5-Hidroxitriptamina) y la noradrenalina inhiben la transmisión del dolor al actuar en el asta dorsal de la médula espinal (ADME). Por otra parte, los opioides activan a su receptor en neuronas excitadoras de la MRVM (neuronas espinales mostradas en rojo) lo que evita la facilitación del impulso nociceptivo (Modificado de Fields, 2004).

1.3.2. El núcleo dorsal del raqué

El NDR contiene aproximadamente el 90 % de las neuronas serotoninérgicas del SNC (Baker et al., 1991). Estas neuronas proyectan de manera descendente hacia el núcleo del raqué magno y la médula espinal para modular la transmisión de la información nociceptiva mediante la liberación de serotonina (5-HT) (Qing-Ping y Nakai, 1994). También, las neuronas serotoninérgicas envían proyecciones ascendentes que modulan la percepción del dolor actuando sobre el tálamo y la corteza cerebral (Qing-Ping y Nakai, 1994) (Fig. 5).

La serotonina es un neurotransmisor que modula la transmisión nociceptiva en el ADME mediante la activación de diferentes subtipos de receptores 5-HT (Bardin y Colpaert, 2004; Haleem, 2018). Se sabe que la activación de los receptores 5-HT_{1A} post-sinápticos, acoplados a proteínas Gi/o, inhibe el disparo de neuronas espinotalámicas excitadoras. Por su parte, la activación de receptores 5-HT_{1B/D} pre-sinápticos inhibe la liberación de neurotransmisores de aferentes primarias. Además, otros subtipos de receptores acoplados a proteínas Gq o canales iónicos como los 5-HT₂ o los 5-HT₃, respectivamente, pueden tener efectos pronociceptivos (Sommer, 2010). Esto indica que la neurotransmisión serotoninérgica tiene un control dual en la transmisión del dolor que depende del sitio de acción, el tipo celular y el tipo de receptor al que se une la serotonina.

Los efectos de los opioides sobre la neurotransmisión serotoninérgica son controversiales pero se sabe que la morfina y el fentanilo inducen la liberación de serotonina en la médula espinal y en el NDR (Grauer et al., 1992; Matos et al., 1992; Tao et al., 2003). Esto sugiere que los efectos de los opioides suceden, en parte, por la activación de receptores 5-HT (Liu et al., 2002). En específico, se ha demostrado que el bloqueo de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₃ reduce el efecto antinociceptivo de la morfina sistémica o intracerebral (Kawamata et al., 2002; Liu et al., 2002). También, la inhibición farmacológica de la recaptura de serotonina prolonga el efecto antinociceptivo de la morfina en ratas (Ozdemir et al., 2012). Estos datos resaltan la importancia de la serotonina en los efectos antinociceptivos de los opioides.

1.4. Mecanismos propuestos de desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo de los opioides

El uso repetido de opioides puede llevar al desarrollo de tolerancia a su efecto antinociceptivo (Bobeck et al., 2012; Molina-Martínez et al., 2014). Este es un fenómeno complejo que involucra diversas adaptaciones que resultan en la reducción en la eficacia analgésica del fármaco, por lo que se requiere la administración de dosis cada vez más altas para mantener un nivel constante de alivio del dolor o el efecto subjetivo deseado (Dumas y Pollack, 2008). Existen varios mecanismos involucrados en el desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo de los opioides:

Cambios a nivel de receptor: Uno de los mecanismos que explican el desarrollo de tolerancia a opioides es la disminución de la función del receptor μ opioide. Se sabe que la activación de este receptor induce el reclutamiento de GRKs y β -arrestinas, proteínas que regulan su función. El reclutamiento de estas proteínas produce el desacoplamiento de la proteína Gi/o del receptor (Sato et al., 2015) y, eventualmente, su internalización y degradación (Williams et al., 2013). Estos eventos tienen la función de detener la señalización evocada por la estimulación constante de opioides.

Cambios en la síntesis de proteínas: El uso repetido de opioides induce cambios en la síntesis de proteínas, entre estos cambios se encuentra el incremento en los canales de calcio dependientes de voltaje, la regulación negativa de canales de potasio de rectificación entrante, la regulación positiva del sistema de la enzima adenilato ciclasa y la estimulación de vías de activación de MAPKs. Estos cambios contrarrestan los efectos agudos de los opioides (Dumas y Pollack, 2008).

Activación de otros sistemas de neurotransmisión: La administración repetida de opioides induce la síntesis y liberación de péptidos con efecto pronociceptivo o “antiopioide” como la colecistocinina (CCK) (Cesselin, 1995). Este péptido ejerce sus efectos mediante la activación de receptores a CCKB (CCKBR). Esta activación produce la heterodimerización entre el CCKR y el receptor μ opioide lo que reduce la capacidad de unión de los ligandos opioides a su receptor. Además, la activación del

CCKBR produce incrementos en el calcio intracelular, un efecto opuesto al que inducen los opioides exógenos que podría contribuir a la tolerancia producida por la administración repetida de opioides (Yang et al., 2018).

Liberación de mediadores inflamatorios: Algunos estudios reportan que la administración repetida de opioides induce la liberación de mediadores inflamatorios como IL-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF) en diversas regiones cerebrales involucradas con la transmisión del dolor (Eidson y Murphy, 2019). Estos mediadores contribuyen a un fenómeno conocido como sensibilización central que se caracteriza por el aumento en la actividad de las neuronas que transmiten señales nociceptivas (Latremoliere y Woolf, 2009).

1.5. Neuroinflamación

La neuroinflamación se define como una respuesta inflamatoria que se produce dentro del cerebro y la médula espinal (Yang y Zhou, 2019). Este proceso es extremadamente complejo y tiene la función de restaurar la homeostasis del tejido nervioso al combatir infecciones, eliminar patógenos, eliminar restos celulares y reparar el tejido (Sochocka et al., 2017). Sin embargo, la neuroinflamación puede ser perjudicial para las células neuronales (Ji et al., 2018; Qin et al., 2007). La magnitud de la respuesta depende del tipo de molécula que la induce, la duración del estímulo y el contexto del tejido en el momento del daño (Yang y Zhou, 2019).

La respuesta neuroinflamatoria se caracteriza por la producción de citocinas, quimiocinas y especies reactivas de oxígeno (DiSabato et al., 2016) en las células inmunocompetentes localizadas dentro del SNC (microglía y astrocitos) (Yang y Zhou, 2019). Estas células monitorean el ambiente dentro del SNC para mantener la homeostasis del tejido, pero también reconocen dos tipos de moléculas: los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que se liberan durante el daño o la muerte celular, y los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que son estructuras que se encuentran en la superficie diversos patógenos (Kigerl et al., 2014; Land, 2018; Matzinger, 2002).

La activación de receptores de la inmunidad innata es la primera línea de defensa contra patógenos y sustancias que pueden amenazar la integridad del tejido nervioso (Kigerl et al., 2014). El reconocimiento de DAMPs y PAMPs está mediado por receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Un ejemplo es la activación de TLR4, un receptor que puede detectar PAMPs como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y DAMPs como la molécula HMGB1 o algunas proteínas de choque térmico. Una vez que se activan estos receptores, se desencadena una vía de señalización que converge en la activación de NF- κ B. Este factor de transcripción se transporta al núcleo e induce el aumento en la expresión de genes de citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-18) (Kumar, 2019). Durante la progresión de la inflamación, las células gliales liberan una gran cantidad de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas con la finalidad de reclutar células involucradas en la reparación del daño. Eventualmente, las células comienzan a secretar citocinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-10, TGF β) cuya función es aliviar el daño producido y disminuir la inflamación (Zhang y An, 2007).

1.5.1. Microglía

La microglía son las principales células inmunocompetentes residentes dentro del SNC (Ginhoux y Prinz, 2015). Son células de origen monocítico que migran al SNC en distintas etapas del desarrollo cerebral (Ginhoux et al., 2013). La microglía generalmente se encuentra en un estado de reposo o “vigilante” pero, en presencia de DAMPs o PAMPs, cambia su morfología a una forma reactiva cuya función se ha asociado con la respuesta al daño (Lacagnina et al., 2017). La activación de la microglía depende del estímulo que se detecta (Beynon y Walker, 2012). Existen dos principales estados de actividad de la microglía que se caracterizan por su fenotipo y su función (Patro et al., 2016; Vainchtein y Molofsky, 2020) (Fig. 6).

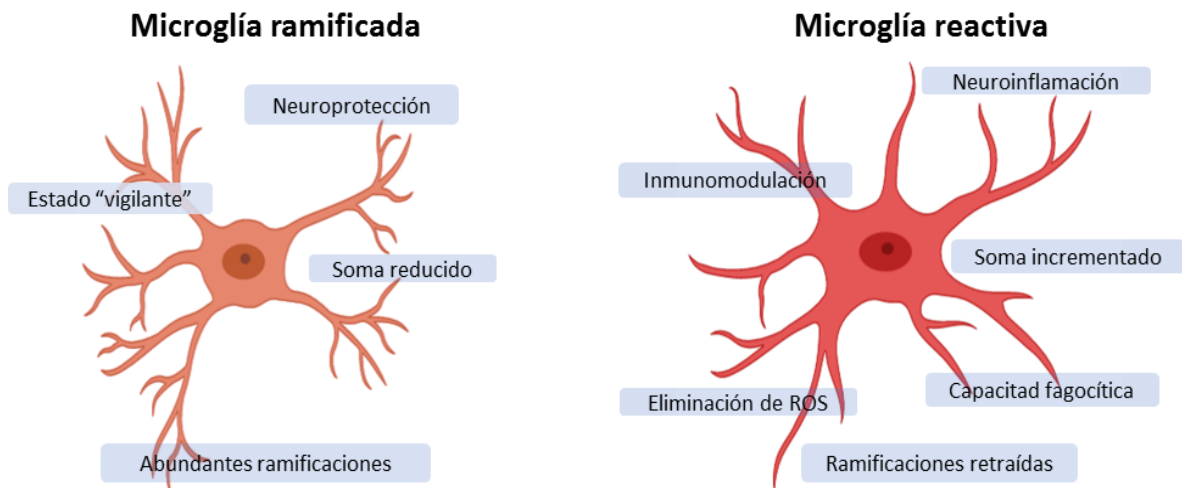


Figura 6. Cambios morfológicos y funcionales de la microglía. En condiciones basales, la microglía detecta cambios en su ambiente circundante mediante la extensión de sus ramificaciones. Cuando detecta un estímulo dañino, cambia su morfología y función a un estado reactivo, retrae sus ramificaciones y libera diversos mediadores inflamatorios.

Microglía ramificada: La morfología de la microglía en esta fase de actividad se caracteriza por la presencia de pequeños somas con numerosas ramificaciones cortas y finas que sirven para examinar el medio circundante. A esta fase se le conoce como "microglía en estado de reposo" pero se ha comprobado que este término no es adecuado ya que las células permanecen continuamente en búsqueda de señales de daño y tienen la capacidad de disminuir el impacto del daño cerebrovascular. Esto sugiere que, en esta fase, la microglía tiene un papel activo y protector (Nagayach et al., 2016).

Microglía reactiva: Una vez que se detecta un estímulo nocivo en el SNC, la microglía pasa por una serie de cambios morfológicos y funcionales. En una etapa temprana, la microglía reactiva aumenta su cuerpo celular y retrae ligeramente sus ramificaciones confiriéndoles un mayor volumen. En esta etapa es capaz de liberar diversos mediadores inflamatorios con la finalidad de contrarrestar eficazmente el estímulo dañino. Dependiendo de la progresión del daño, la activación crónica de la microglía puede generar un entorno pro-inflamatorio excesivo. En esta etapa, la microglía retrae completamente sus ramificaciones y adquiere una morfología ameboides. La función de estas células es mitigar la neuroinflamación y reparar el tejido (Henry et al., 2008; Nagayach et al., 2016).

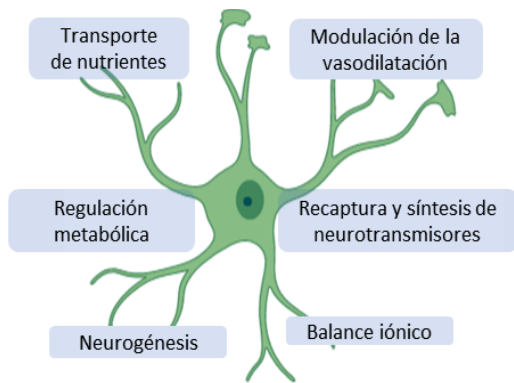
La microglía se puede detectar con el marcador de la proteína Iba-1 y de la integrina de membrana CD11b. El aumento en los niveles de Iba-1 indica que la microglía se encuentra en su estado reactivo y en este estado puede presentar cambios morfológicos evidentes. El marcador CD11b se utiliza para detectar a la microglía en sus diferentes fases y, el aumento en su expresión indica la presencia de microgliosis, un estado caracterizado por la proliferación y el aumento en la actividad pro-inflamatoria de la microglía (Gao et al., 2013; Korzhevskii y Kirik, 2016).

1.5.2. Astrocitos

Los astrocitos son células de origen neuronal cuya principal función es la modulación de la transmisión sináptica. Estas células están en contacto directo con las neuronas y juegan un papel fundamental en la sinapsis tripartita. Este concepto sugiere que existen tres componentes fundamentales involucrados en la transmisión sináptica: la neurona pre-sináptica, la neurona post-sináptica y los astrocitos. En este arreglo estructural de la sinapsis, la actividad neuronal puede verse influenciada por la liberación de gliotransmisores como glutamato y ATP de los astrocitos, en un mecanismo dependiente del incremento del Ca^+ intracelular (Perea et al., 2009).

Los astrocitos también regulan la concentración extracelular de neurotransmisores como el glutamato y pueden detectar cualquier cambio en la microcirculación cerebral ya que están en contacto directo con vasos sanguíneos (Anderson y Nedergaard, 2003; Chaboub y Deneen, 2012). Además, estas células contribuyen al buen funcionamiento neuronal ya que brindan soporte físico, control metabólico y pueden responder ante estímulos inmunológicos (Becerra-Calixto y Cardona-Gómez, 2017). Las diferentes funciones de los astrocitos dependen de su estado de actividad. Como se explica en la figura 7, los astrocitos se encuentran en dos diferentes estados: en condiciones fisiológicas y en estado reactivo.

Astrocitos en condiciones fisiológicas



Astrocitos reactivos

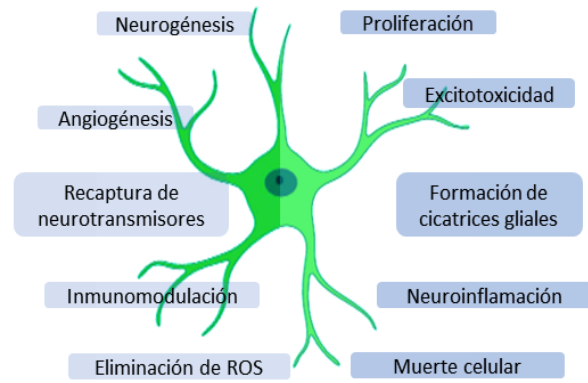


Figura 7. Características morfológicas y funcionales de los astrocitos. En condiciones fisiológicas los astrocitos contribuyen en el mantenimiento de la homeostasis celular mientras que, en su estado reactivo cumplen dos funciones: 1) la respuesta neuroprotectora a daño o a patógenos y 2) la neuroinflamación crónica (Basado en el esquema de Becerra-Calixto y Cardona-Gómez, 2017).

Astrocitos en condiciones fisiológicas: En condiciones basales, los astrocitos mantienen la homeostasis del tejido nervioso. Participan en el balance iónico, la recaptura y síntesis de neurotransmisores, la regulación metabólica, la modulación de la vasodilatación, el transporte de nutrientes y la inducción de neurogénesis (Kimelberg y Nedergaard, 2010).

Astrocitos reactivos: En condiciones de daño, los astrocitos pasan a su forma reactiva. En estas condiciones cumplen una doble función, la primera se caracteriza por proporcionar neuroprotección mediante la inducción de neurogénesis y angiogénesis, la recaptura de neurotransmisores, la inmunomodulación y la eliminación de especies reactivas de oxígeno. La segunda función sucede en contextos de daño o inflamación sostenida donde los astrocitos proliferan, forman cicatrices gliales, inducen neuroinflamación, producen excitotoxicidad e inducen muerte glial o neuronal (Becerra-Calixto y Cardona-Gómez, 2017; Trujillo-Estrada et al., 2019).

Los astrocitos presentan cambios morfológicos en sus diferentes fases que se pueden estudiar con el uso de marcadores específicos como el de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), una proteína que se localiza en filamentos del citoesqueleto. El aumento en la marca de GFAP funciona como indicador activación de los astrocitos, un fenómeno conocido como astrogliosis (Gao et al., 2013; Preston et al., 2019).

1.6. Relación entre la neuroinflamación, el dolor y los opioides

La neuroinflamación contribuye al aumento en la capacidad de las neuronas para transmitir las señales pronociceptivas. Este fenómeno se ha descrito en condiciones de dolor crónico, dolor inflamatorio y dolor neuropático (Ji et al., 2018; Latremoliere y Woolf, 2009). En general, se sabe que las citocinas y las quimiocinas, liberados de células gliales, modulan la sensibilidad neuronal en regiones del SNC relacionadas con la transmisión del dolor (Gonçalves Dos Santos et al., 2019) (Fig. 8). Se ha reportado que estos mediadores neuroinflamatorios se inducen por diferentes tipos de daño como la inflamación crónica, el daño al nervio, el daño a la médula espinal o algunos tratamientos farmacológicos (Grace et al., 2014; Milligan y Watkins, 2009).

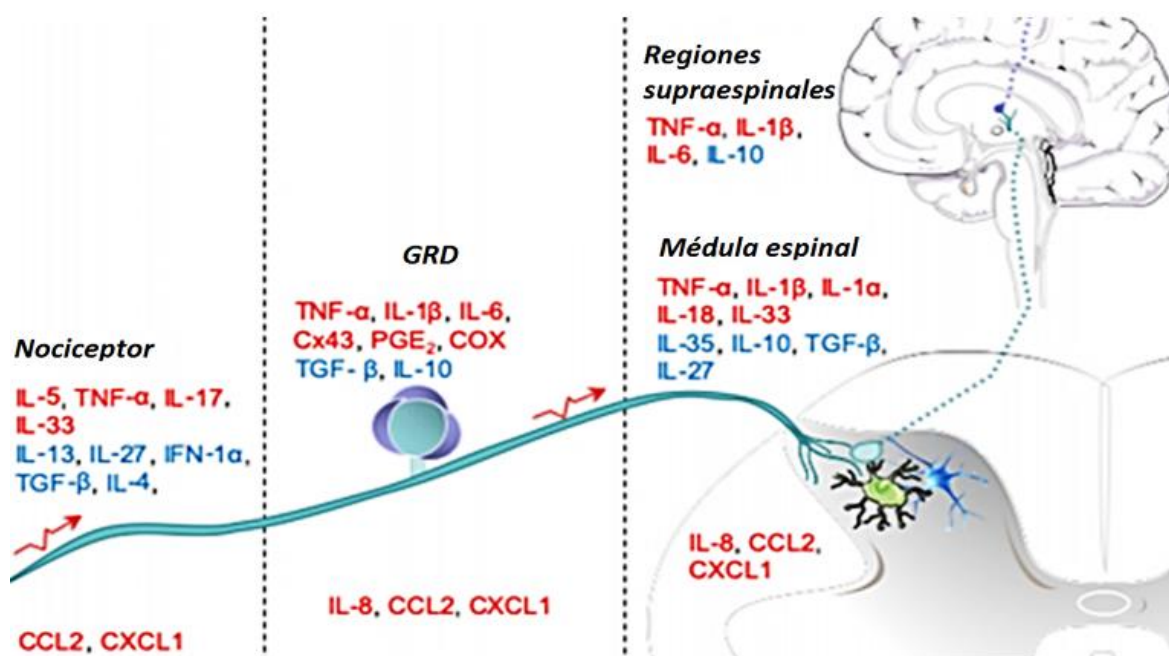


Figura 8. Mediadores inflamatorios reportados en los diferentes niveles de las vías de la transmisión del dolor. Después del daño o infección, las células del sistema inmune liberan mediadores pro-inflamatorios, tales como citocinas y quimiocinas, que pueden actuar en los nociceptores, el ganglio de la raíz dorsal (GRD), el asta dorsal de la médula espinal y en estructuras supraespinales que transmiten la señal nociceptiva. En este esquema se representan en rojo algunas citocinas y quimiocinas involucradas en efectos pronociceptivos y en azul las que se han reportado con efectos antinociceptivos. IL: Interleucina; TNF: Factor de necrosis tumoral; TGF-β: Factor de crecimiento transformante-β; CCL: ligando de quimiocinas con motivos CC (Modificado de Gonçalves dos Santos et al., 2020).

La administración aguda o repetida de opioides induce la activación de la microglía y los astrocitos en diversas regiones del SNC como la corteza, el núcleo accumbens, la amígdala, el ADME y la SGPA (Bajic et al., 2013; Fukagawa et al., 2013; Harada et al., 2013; Zeng et al., 2014; Zhang et al., 2012). Este efecto se ha visto acompañado de la liberación de la citocina pro-inflamatoria IL-1 β en el ADME (Zeng et al., 2014). La liberación glial de citocinas pro-inflamatorias inducida por morfina contribuye al desarrollo de tolerancia antinociceptiva e hiperalgesia mediante la sensibilización de neuronas que transmiten la señal nociceptiva (Lin y Lu, 2018) (Fig. 9).

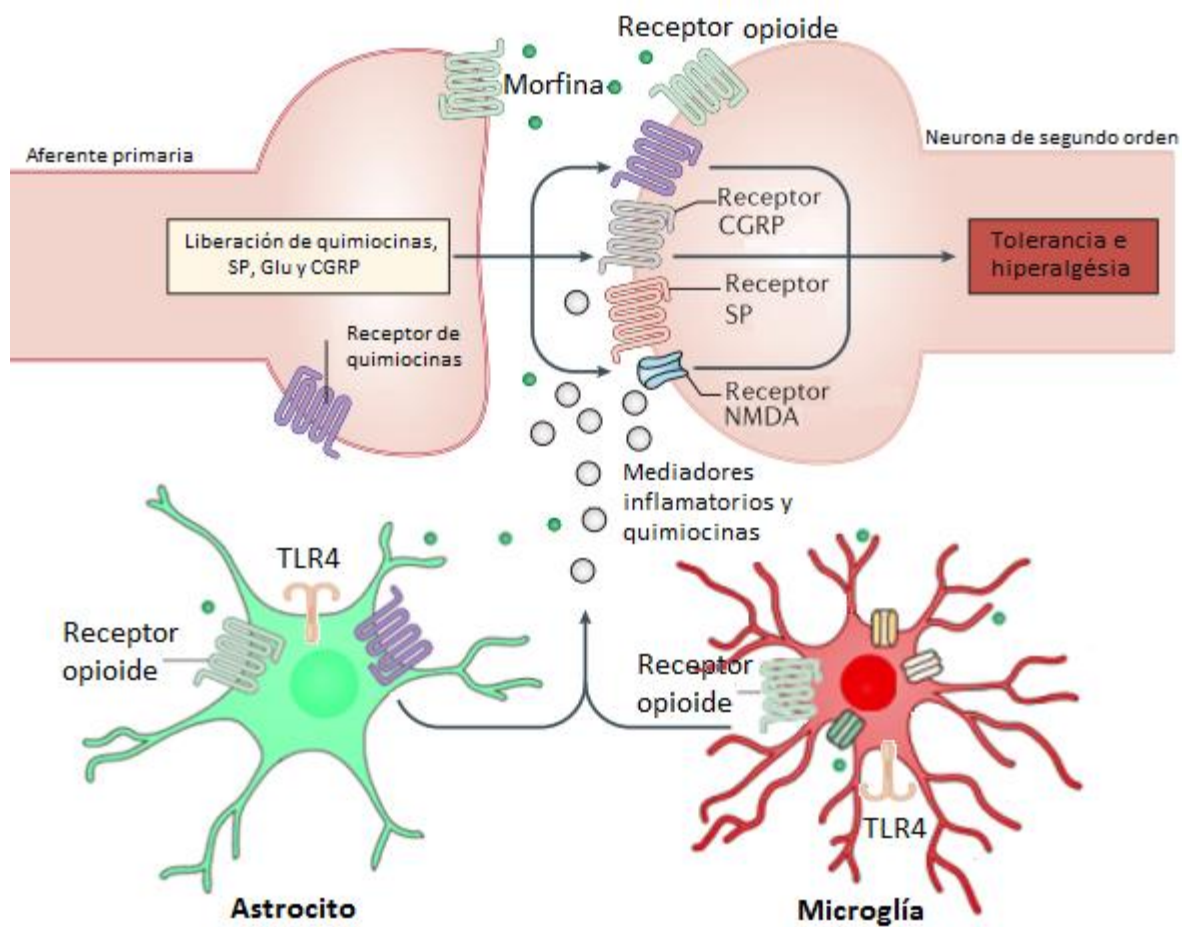


Figura 9. Modulación de la función neuronal en respuesta a opioides a través de la liberación de mediadores inflamatorios de células gliales. Las quimiocinas, el glutamato (Glu), la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) participan en la sensibilización neuronal. Entre los mecanismos propuestos que contribuyen al desarrollo de tolerancia e hiperalgesia producida por morfina se encuentra la activación de los receptores opioides y el receptor tipo Toll 4 (TLR4) localizados en la microglía y los astrocitos. Esta activación induce la liberación de mediadores inflamatorios que podrían amplificar y sostener la señal nociceptiva. NMDA: N-metil-D-aspartato (Modificado de Parsadaniantz et al., 2015).

Algunos estudios han investigado el uso de fármacos con actividad anti-inflamatoria para evitar algunos de los efectos de los opioides. En específico, se demostró que el antibiótico minociclina y la pentoxifilina disminuyen la activación glial y el desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo de la morfina (Fukagawa et al., 2013; Harada et al., 2013; Zhang et al., 2012). Estos estudios y otros reportes de la literatura sugieren que ambos fármacos ejercen su efecto anti-inflamatorio al inhibir la vía de activación de NF-kB (Liu et al., 2017; Nikodemova et al., 2006). Estos datos resaltan la importancia de la neuroinflamación mediada por el factor de transcripción NF-kB en el desarrollo de tolerancia analgésica inducida por opioides.

1.6.1. Mecanismos de activación de microglía y astrocitos por opioides

La microglía y los astrocitos expresan receptores opioides, por lo que son capaces de detectar opioides endógenos y exógenos (Hutchinson et al., 2010). Además, ambos tipos celulares expresan múltiples receptores del sistema inmune innato, entre los que destaca el TLR4 (Nicotra et al., 2012).

Algunos estudios sugieren que la activación de la microglía por la morfina depende de la señalización del receptor μ opioide ya que este efecto no se presenta en animales carentes de dicho receptor (Hu et al., 2002). Otros estudios señalan que la neuroinflamación producida por la morfina se debe a la activación de vías de la inmunidad innata mediante la unión del opioide al TLR4 localizado en la microglía y los astrocitos (Hutchinson et al., 2011, 2010). La activación de ambos tipos de receptores en las células gliales produce la liberación de mediadores inflamatorios que pueden modificar la función neuronal (Gonçalves Dos Santos et al., 2019).

Los receptores a opioides son estereoselectivos ya que permiten únicamente la unión de ligandos levógiros (-) pero no de los isómeros dextrógiros (+) (Hutchinson et al., 2011; Mucha y Herz, 1986). Tanto la morfina, como los demás opioides que se usan en la clínica tienen una conformación levógira (-), lo que indica que sus efectos suceden mediante la activación de receptores opioides.

Existe evidencia de que la forma isomérica dextrógira (+) del antagonista opioide naloxona (dextro-naloxona o (+)-naloxona) puede bloquear los efectos del LPS sobre el TLR4 sin afectar la señalización del receptor μ opioide (Wang et al., 2016). Por esta razón, el uso de la (+)-naloxona, como antagonista del receptor TLR4, representa una herramienta farmacológica importante para evaluar los mecanismos mediante los cuales actúan los opioides.

1.6.2. Evidencias de la activación del inflammasoma NLRP3 por opioides

Además del TLR4, se ha reportado que el tratamiento agudo o repetido con morfina aumenta la expresión de receptores intracelulares tipo NOD (NLRs) y de proteínas relacionadas con su formación y señalización (Mao et al., 2013; Tian et al., 2015).

Los NLRs son receptores intracelulares que contienen motivos repetidos ricos en leucinas (LRR) y dominios efectores que participan en la formación de un complejo similar a los apoptosomas denominado inflammasoma (Jin et al., 2014). Como se observa en el figura 10, los inflamasomas son complejos multiproteicos citoplasmáticos que se activan al detectar DAMPs y PAMPs (Guo et al., 2015). Los receptores tipo NOD se encuentran en el citoplasma, pero pueden asociarse a redes endolisosomales que transportan a sus ligandos hacia el interior de las células (Bonham y Kagan, 2014).

Uno de los inflamasomas que se ha relacionado con daño neuronal es el inflammasoma NLRP3 (Kim et al., 2017; Masters, 2013). La vía de señalización canónica del inflammasoma NLRP3 involucra dos fases: la primera ocurre cuando un receptor localizado en la membrana de las células detecta el estímulo dañino. Esta activación promueve una serie de señales que convergen en la activación de NF- κ B. La translocación de NF- κ B al núcleo induce el aumento en la transcripción de varias proteínas como el receptor intracelular NLRP3, la molécula adaptadora ASC, la enzima inactiva pro-caspasa-1 y la citocina inmadura pro-IL-1 β . La fase dos consiste en la detección intracelular de DAMPs o PAMPs y la oligomerización del complejo multiproteico NLRP3. Este complejo induce la activación de la caspasa-1 y la

conversión de pro-IL-1 β a su forma activa IL-1 β . Esta citocina se libera de la célula y provoca un estado pro-inflamatorio mientras que la activación de caspasa-1 induce la ruptura de la proteína citoplasmática gasdermina D (GSDMD). La porción amino terminal de esta proteína (GSDMD-N), ya libre, se une a la membrana de las células y se oligomeriza hasta formar poros membranales de aproximadamente 20-30 nm de diámetro (Fig. 10) (Lamkanfi y Dixit, 2010; Liu et al., 2018; Malik y Kanneganti, 2017; Shi et al., 2015).

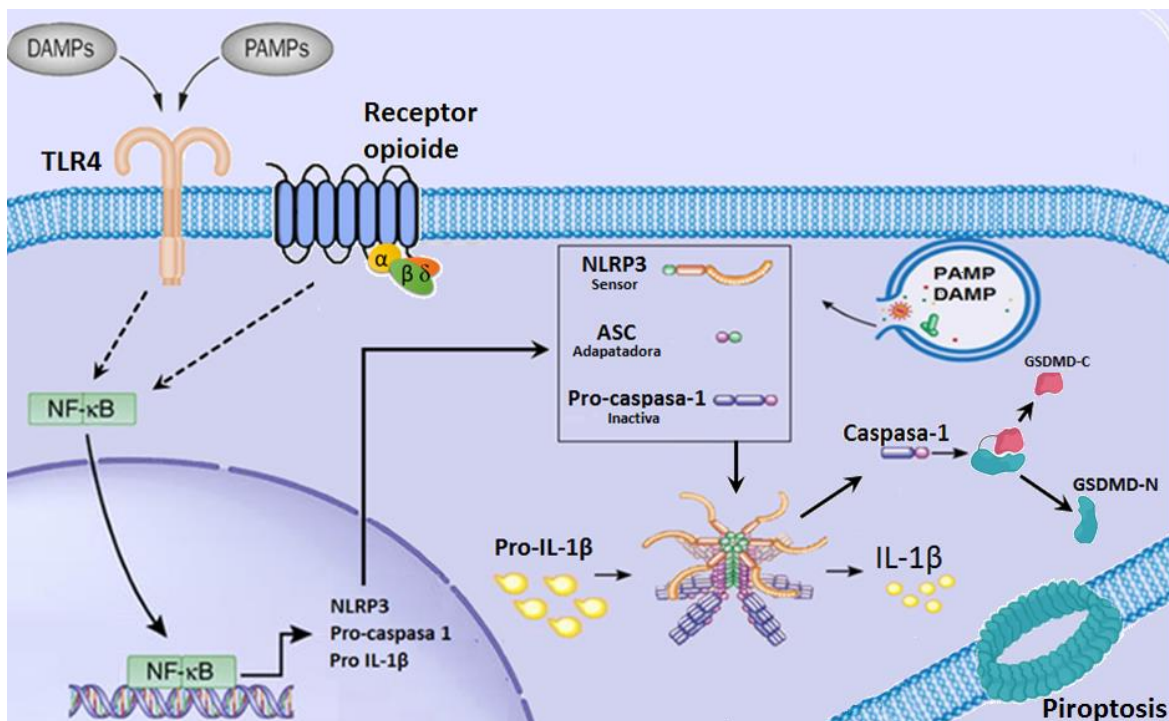


Figura 10. Activación y ensamblaje del inflamasoma NLRP3. Para la activación del inflamasoma se requieren dos señales: 1) La unión de patrones moleculares asociados a patógenos o a daño (PAMPs o DAMPs, respectivamente) a receptores opioides o tipo Toll 4 (TLR4), lo que produce la activación del factor de transcripción NF- κ B y el aumento en la transcripción de NLRP3, pro-caspasa-1 y pro-IL-1 β . 2) La unión de DAMPs o PAMPs al NLR, lo que induce el ensamblaje de NLRP3 con pro-caspasa-1 mediante la proteína ASC. El complejo multiproteico denominado inflamasoma NLRP3 participa en la maduración y liberación de IL-1 β , así como en la formación de la caspasa-1 a su forma activa, lo que lleva a la ruptura de la GSDMD, la polimerización de su porción amino terminal y la formación de poros de membrana. Estos efectos producen un tipo de muerte celular denominada piroptosis. NF- κ B: Factor de transcripción NF- κ B; NLRP3: Receptor tipo NOD 3; ASC: Proteína adaptadora de los receptores tipo NOD; GSDMD-C: Gasdermina D-Carboxilo terminal; GSDMD-N: Gasdermina D-Amino terminal; IL-1 β : Interleucina 1 β .

Además de la liberación de IL-1 β y DAMPs, la activación del inflamasoma NLRP3 induce un tipo de muerte celular inflamatoria denominado piroptosis (Guo et al., 2015; Shi et al., 2015). Este tipo de muerte celular es dependiente de la activación de caspasas y se caracteriza por el hinchamiento de la célula, lisis nuclear, formación de vesículas extracelulares, ruptura de la membrana celular y liberación del contenido citoplasmático al espacio extracelular (Bergsbaken et al., 2009) (Fig. 11).

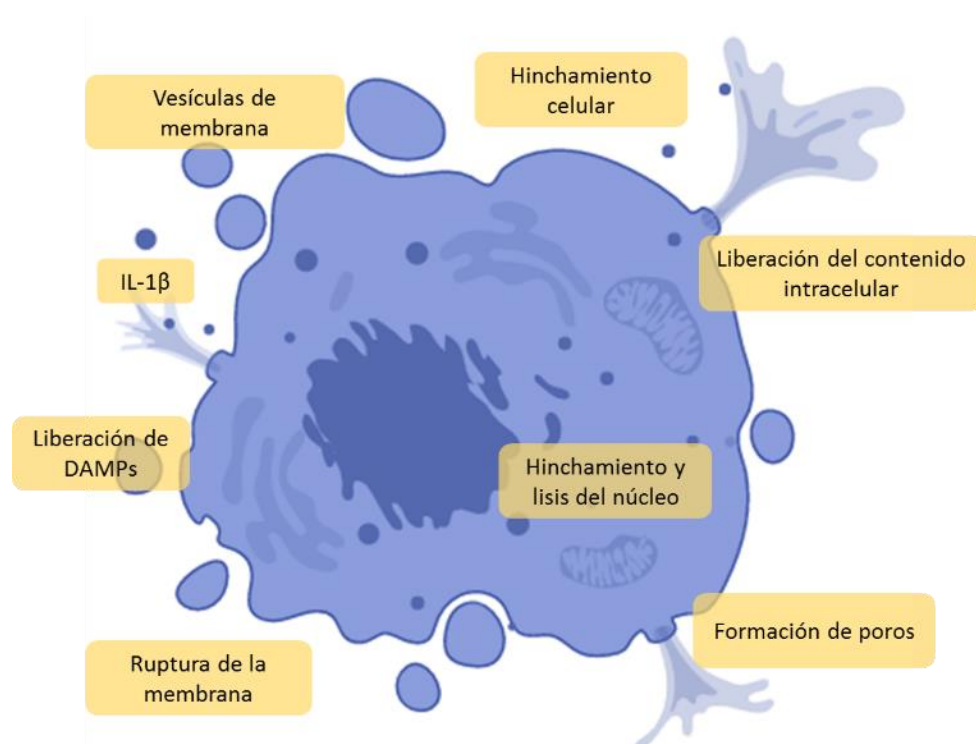


Figura 11. Características morfológicas de la muerte celular por piroptosis. El esquema muestra los principales cambios que suceden en la célula cuando se activa un inflamasoma NLRP3. IL-1 β : Interleucina 1 β ; DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño.

Existe evidencia de que la administración repetida de dosis analgésicas de morfina aumenta la expresión del ARNm de NLRP3, inducida por daño al nervio, en el ganglio de la raíz dorsal (Ellis et al., 2016; Grace et al., 2016). Además, en un modelo de tolerancia antinociceptiva en ratones, se demostró que la morfina aumenta la expresión de pro-caspasa-1, pro-IL-1 β , IL-1 β y la formación del inflamasoma NLRP3 en la médula espinal (Cai et al., 2016).

El uso de inhibidores de la activación del inflamasoma NLRP3 podría ser útil para estudiar el papel de este complejo multiproteico en los efectos producidos por la administración repetida de opioides. En este sentido, se ha demostrado que la administración sistémica de MCC950, un inhibidor específico de la oligomerización del inflamasoma NLRP3 (Coll et al., 2019), atenúa el dolor inflamatorio inducido por cáncer en ratas (Chen et al., 2019) y reduce la hiperalgesia asociada al aumento en la expresión de NF- κ B por LPS en ratones (Dolunay et al., 2017).

El efecto neuroinflamatorio de otros opioides, incluso más potentes que la morfina, está menos estudiado. Además, la participación de la neuroinflamación en el desarrollo de la tolerancia analgésica producida por la administración repetida de opioides no se comprende completamente. En este trabajo, estudiamos las diferencias que existen entre la morfina y el fentanilo para desarrollar tolerancia antinociceptiva y analizamos si están relacionadas con la capacidad de cada opioide para inducir la expresión de marcadores canónicos de neuroinflamación en el NDR y la SGPA de ratas. También, evaluamos la participación diferencial de los receptores opioides y TLR4 tanto en la piroptosis dependiente de NLRP3 como en la activación de microglía y astrocitos producidas por la administración repetida de morfina y fentanilo.

1.7. Planteamiento del problema

- La morfina y el fentanilo son agonistas del mismo receptor, pero difieren en su capacidad para generar tolerancia analgésica.
- La administración repetida de morfina induce neuroinflamación en regiones del SNC relacionadas con la transmisión de dolor.
- La administración de fármacos anti-inflamatorios atenúa el desarrollo de tolerancia a morfina.
- Se desconoce si otros opioides de importancia clínica, como el fentanilo, producen el mismo grado de neuroinflamación que la morfina y si estos efectos están relacionados con las diferencias de cada opioide para producir tolerancia analgésica.
- Dado que la morfina y el fentanilo activan principalmente al receptor μ opioide, pero difieren en algunas propiedades farmacológicas como la potencia, es razonable pensar que el fentanilo también producirá neuroinflamación, pero será más potente que la morfina para este efecto.

2. Hipótesis

La administración repetida de morfina o fentanilo inducirá de manera diferencial la activación del inflamasoma NLRP3 en distintos tipos celulares de la SGPA y del NDR de ratas y el grado de neuroinflamación producida estará relacionado con las diferencias de cada opioide para desarrollar tolerancia antinociceptiva.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Estudiar la activación del inflamasoma NLRP3 en microglía, astrocitos y neuronas de la SGPA y el NDR de ratas Wistar administradas repetidamente con morfina o fentanilo y su posible relación con el desarrollo de tolerancia antinociceptiva.

3.2. Objetivos particulares

1. Inducir tolerancia antinociceptiva en ratas Wistar mediante la administración repetida de dosis equianalgésicas de morfina o fentanilo.
2. Establecer un modelo de neuroinflamación como control positivo mediante la administración sistémica de LPS.
3. Evaluar la activación de NLRP3 en distintos tipos celulares de la SGPA y del NDR de ratas tolerantes a morfina o fentanilo.
4. Determinar la actividad del inflamasoma NLRP3 y la posible muerte celular por piroptosis mediante el análisis de la expresión de caspasa-1 y GSDMD-N.
5. Determinar el papel de los receptores opioides y TLR4, en la activación del inflamasoma NLRP3 producida por la administración repetida de morfina o fentanilo, mediante la administración de (-)-naloxona o (+)-naloxona.
6. Analizar si la inhibición de NF- κ B con minociclina o el bloqueo NLRP3 con MCC950 disminuye el desarrollo de tolerancia antinociceptiva y la activación de NLRP3 en ratas administradas repetidamente con morfina o fentanilo.

4. Materiales y métodos

4.1. Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de 200-250 gramos que se mantuvieron individualmente en cajas de plexiglás con libre acceso a comida y agua, con una temperatura ambiental de 23-25 °C y un ciclo invertido de luz/oscuridad de 12/12 h. Previo a la experimentación, los animales recibieron una habituación que consistió en transportarlos, una vez al día durante 3 días, del bioterio al lugar de trabajo y manipularlos de manera similar a lo establecido para cada experimento. Todos los procedimientos se aprobaron por el Comité de Ética Institucional del Cinvestav (Protocolos CICUAL, números 0021-12 y 0074-13) y se desarrollaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana de cuidado y manejo de animales (NOM-062-ZOO-1999).

4.2. Fármacos

En este estudio se utilizaron clorhidrato de fentanilo y sulfato de morfina que fueron donados por el National Institute on Drug Abuse (NIDA) (Research Technology Branch, Research Triangle Institute, NC, USA) y por Laboratorios Psicofarma (Ciudad de México, México). El clorhidrato de (-)-naloxona, la minociclina y el MCC950 se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El clorhidrato de (+)-naloxona fue sintetizado y donado por el doctor Kenner C. Rice (Drug Design and Synthesis Section, Molecular Targets and Medications Discovery Branch, NIH Intramural Research Programs of NIDA y el National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism, NIAAA). La minociclina se disolvió en agua y se administró por vía oral (p.o.) en un volumen de 10 ml/kg. Los demás fármacos se disolvieron en solución salina estéril al 0.9 % y se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen final de 1 ml/kg.

4.3. Evaluación del efecto nociceptivo

Para medir el efecto anti o pronociceptivo de los tratamientos utilizados en este estudio, se realizó la prueba de latencia de retiro de la cola (*Tail-Flick test*) con un equipo Tail-Flick Unit (Modelo 7360, Ugo Basile, Italia). La prueba consiste en emitir un haz de luz sobre la base de la cola de la rata. La fuente es una lámpara de halógeno (8V, 50W) con un filtro que permite solamente el paso de luz infrarroja. El equipo detecta el movimiento y detiene el estímulo automáticamente cuando la rata retira la cola. El tiempo que transcurre entre el inicio del estímulo y el retiro de la cola se mide con un cronometro con sensibilidad de 0.1 s.

Los animales para experimentación se eligieron tomando como criterio que tuvieran un umbral de respuesta basal entre 5-6 s después de aplicar el estímulo térmico. Para establecer la latencia basal, se realizaron tres mediciones en intervalos de 20 minutos antes del tratamiento farmacológico. Los animales que respondieron fuera de este rango se descartaron. Una vez seleccionados los animales, se determinó el efecto nociceptivo producido por los diferentes tratamientos. El aumento en la latencia de respuesta por encima del nivel basal se consideró un efecto antinociceptivo mientras que la disminución en el tiempo de respuesta se consideró pronocicepción. El tiempo límite de estimulación fue de 15 segundos para evitar el daño tisular.

El curso temporal del efecto antinociceptivo se calculó como el porcentaje del máximo efecto posible (% MEP) mediante la siguiente fórmula:


$$MEP = \left(\frac{A - B}{15 - B} \right) \times 100$$

Donde A es la latencia basal antes del tratamiento (tiempo 0), B es la latencia después de administrar el fármaco y 15 es la latencia máxima posible de retiro de la cola (tiempo de corte). Adicionalmente, se determinó el área bajo la curva (ABC) mediante el método trapezoidal (Persky y Pollack, 2015) para evaluar el efecto antinociceptivo total durante el periodo de evaluación y el resultado se expresó como unidades de área bajo la curva.

4.4. Obtención de tejido cerebral

Al finalizar cada tratamiento farmacológico, tres animales de cada grupo experimental se anestesiaron con 0.2 ml de ketamina:xilacina (90:10 mg/kg, i.p.). Se perfundieron a través de la aorta ascendente con 250 ml de solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS, pH = 7.4) adicionada con heparina, a una velocidad de 30 ml/min. La solución salina se reemplazó de inmediato con 300 ml de paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS. Se extrajo el cerebro y se post-fijó durante 2 horas en PFA. Transcurrido este tiempo, se sustituyó al PFA por sacarosa al 30 % más polietilenglicol al 30 % en PBS. Los cerebros se criopreservaron en esta solución a una temperatura de -70 °C. Se realizaron cortes coronales de 30 micras de grosor utilizando un criostato (Zeiss, Modelo Hyrax C25). Se eligieron las secciones donde es posible observar todas las regiones de la SGPA y las regiones dorsal y ventral del NDR (Bregma -7.8 a -7.44). Para ubicar las regiones se utilizó como referencia el atlas “El cerebro de Rata en Coordenadas Estereotáxicas” (Paxinos y Watson, 2009). Las rebanadas obtenidas se almacenaron a 4 °C en sacarosa al 30 % hasta por 2 semanas.

4.5. Inmunofluorescencia

Para identificar los tipos celulares de interés y analizar la neuroinflamación producida por los tratamientos utilizados en este estudio, se detectaron distintas proteínas en la SGPA y el NDR mediante inmunofluorescencia.

Se obtuvieron tres rebanadas cerebrales de cada animal y se colocaron a temperatura ambiente durante 60 min. En seguida, las rebanadas se colocaron en solución de bloqueo (suero filtrado de burro, SFB, al 5 % y tritón al 0.2 % en PBS) durante 2 horas para evitar marcas inespecíficas. Una vez bloqueados los tejidos, se añadieron los anticuerpos primarios contenidos en una solución incubadora (SFB al 1 % y tritón al 0.1 % en PBS) y se colocaron en agitación constante durante 16 horas en una cámara de humedad a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se realizaron lavados con PBS y se realizó una segunda incubación con los anticuerpos secundarios durante 2 horas en condiciones de obscuridad a temperatura ambiente.

Al finalizar la incubación, se realizaron tres lavados con PBS para retirar el exceso de anticuerpos. Inmediatamente se agregó, durante 5 minutos, el marcador fluorescente de ácido desoxirribonucleico 2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida (DAPI; dilución 1:800) para la detección de núcleos celulares. Las rebanadas de tejido se colocaron en portaobjetos gelatinizados, se cubrieron con 10 µl de medio de montaje (ProLong® Antifade Kit, Invitrogen, ref. 7481) y se protegieron con un cubreobjetos. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente para su análisis posterior. En la tabla 2 se muestran los detalles de todos los anticuerpos empleados.

Tabla 2. Descripción de los anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Dilución	Compañía-Catálogo
Mouse anti-CD11b	1:300	Abcam-ab8879
Goat anti-GFAP	1:250	Abcam-ab53554
Mouse anti-NeuN	1:850	Sigma-Aldrich-MAB377
Mouse anti-TPH-2	1:300	Sigma-Aldrich-AMAb91108
Rabbit anti-NLRP3	1:1000	Aviva Systems-OABF00351
Mouse anti-Caspase-1	1:300	Biorbyt-ORB378615
Rabbit anti-GSDMD-N	1:300	Cell Signaling Technologies-93709
Anti-rabbit-A488	1:800	Invitrogen-A21206
Anti-mouse-A555	1:1000	Invitrogen-A31570
Anti-goat-A647	1:300	Invitrogen-A21447

4.6. Microscopía de epifluorescencia y confocal

De las rebanadas de cerebro empleadas para inmunofluorescencia, se obtuvieron imágenes de dos zonas cerebrales: 1) la región ventrolateral de la SGPA, región que participa en la modulación descendente del dolor producida por opioides; y 2) la región ventral del NDR, que es la región con mayor cantidad de somas de células serotoninérgicas.

Para analizar el número de células positivas a diferentes marcadores celulares se obtuvieron imágenes de 600 x 500 μm con un microscopio de epifluorescencia (Nikon, modelo Eclipse Ti-U; objetivo de 10x). Se emplearon los filtros estandarizados del microscopio Nikon para la detección de los espectros de luz emitidos por cada uno de los fluoróforos. Las imágenes se capturaron con el software NIS-Elements (Nikon Instruments Inc).

Para analizar el solapamiento de fluoróforos, se obtuvieron imágenes de alta resolución de 600 x 500 μm y de 40 x 40 μm ($z = 1 \mu\text{m}$) con un microscopio de barrido láser confocal (Zeiss LSM800, modelo AX10; objetivos de 10x y 40x, respectivamente). Las imágenes se capturaron utilizando el software ZEN Blue 3.1 (Carl Zeiss microscopy GmbH). Se utilizó un sistema de cuatro canales para la detección de diferentes fluoróforos, un diámetro de apertura de pinhole de 1 UA y un escaneo láser bidireccional. Para observar la morfología de las células se empleó la función ESID (*Electronically switchable illumination and detection*) que se utiliza para la detección mejorada del contraste de superficies transparentes y se indica como el contraste de interferencia diferencial (DIC, por sus siglas en inglés). En tabla 3 se resumen las características de los filtros del microscopio Nikon, las características utilizadas para microscopía confocal y los fluoróforos utilizados en este estudio.

Tabla 3. Condiciones empleadas para la obtención de imágenes mediante microscopía de epifluorescencia y confocal

	Microscopía de epifluorescencia					Microscopía confocal				
Fluoróforo	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Filtro estandarizado Nikon	Rango de transmisión (nm)	Color	Canal	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Rango de detección (nm)	Color
DAPI	358	461	DAPI	375-460	Azul	1	353	465	400-500	Azul
Alexa-488	495	519	FITC	480-535	Verde	2	493	517	492-560	Verde
Alexa-555	555	565	TRITC	540-605	Rojo	3	553	568	564-640	Rojo
Alexa-647	650	665	Texas Red	560-630	Rojo lejano	4	653	668	645-700	Magenta

4.7. Cuantificación de imágenes

El análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia y confocal se realizó con el software ImageJ (version 1.52n, National Institute of Health, USA) como se describe a continuación:

Número de células positivas. Para cuantificar el número de somas de células positivas a NLRP3, caspasa-1, CD11b, NeuN y TPH-2 se utilizaron imágenes compuestas con tres o cuatro fluoróforos. Las imágenes se separaron en sus diferentes canales y se cuantificó el número de objetos positivos por campo (600 x 500 μm) utilizando la función *Analyze Particles*, en el caso de imágenes de epifluorescencia, y *3D Object Counter*, en el caso de imágenes compuestas por secciones en z capturadas mediante microscopía confocal.

Intensidad de fluorescencia: Algunas de las proteínas analizadas en este estudio no se localizan de manera ubicua en el soma, sino que se encuentran en regiones celulares específicas. La proteína GFAP se localiza tanto en somas como en las prolongaciones de las células, mientras que la proteína GSDMD-N se localiza en diferentes regiones del soma (citoplasma o membrana) dependiendo de la fase de la piroptosis en la que se encuentra la célula. Para analizar la expresión de estas proteínas se midió la intensidad de fluorescencia media de cada fluoróforo. Para esto, las imágenes se convirtieron a escala de grises de 8 bits, se sustrajeron los píxeles del fondo y se estableció un umbral límite para resaltar las estructuras de interés donde se cuantificó la intensidad de fluorescencia media.

Sobrelapamiento de fluoróforos: Para analizar la localización espacial de dos diferentes proteínas, se calculó el coeficiente de correlación de Manders. Este coeficiente indica el grado de sobrelapamiento entre dos fluoróforos donde un valor cercano a 0 indica que no hay localización espacial entre ambos marcadores mientras que un valor de 1 indica el sobrelapamiento total de los dos fluoróforos (Aaron et al., 2018). Esta herramienta se utilizó para conocer la localización del inflamasoma NLRP3 en los diferentes tipos celulares mediante el análisis de correlación de fluoróforos correspondientes a las proteínas NLRP3/CD11b, NLRP3/GFAP, NLRP3/NeuN y NLRP3/TPH2. El coeficiente de Manders también se utilizó para estudiar la posible relación entre NLRP3 y caspasa-1, dos proteínas que oligomerizan para formar un inflamasoma.

4.8. Análisis estadístico

Las curvas dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de la morfina y el fentanilo se ajustaron mediante un análisis de regresión lineal de Probit (MedCalc Software bvba, versión 2019). A partir de estas curvas ajustadas, se calculó la dosis efectiva de cada opioide para producir el 50 % de su efecto antinociceptivo (DE_{50}) y su correspondiente intervalo de confianza (95 %, IC). Se realizó el curso temporal del efecto antinociceptivo y se calculó el porcentaje de máximo efecto posible (% MEP) y el área bajo la curva (ABC) que se presentan como la media \pm el error estándar de una $n = 8$. Se utilizó el análisis de variancia de una vía (ANOVA) seguida de una prueba de Tukey para comparaciones múltiples o una prueba de Dunnett para las comparaciones contra el control. Para evaluar el desarrollo de tolerancia a opioides en grupos que recibieron co-tratamientos se realizó el análisis de ANOVA de dos vías (factor 1: duración; factor 2: tratamiento). El desarrollo de hiperalgesia se analizó mediante una prueba de suma de rangos de Wilcoxon para una sola muestra donde los valores por debajo de 0 indicaron hiperalgesia. Para realizar el conteo de células positivas a diferentes marcadores, se utilizó un total de 9 imágenes tomadas de tres diferentes animales de cada grupo experimental. La localización espacial entre dos proteínas diferentes se analizó en 8-10 células por campo provenientes de tres cerebros diferentes para alcanzar un total de 24-30 células por cada grupo experimental. Se cuantificó el coeficiente de correlación de Manders y los resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. Se calculó el porcentaje de neuronas serotoninérgicas positivas a NLRP3 en los grupos tratados con morfina o fentanilo y se analizó con una prueba exacta de Fisher. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el software GraphPad Prism (Versión 8.0.2). Los datos se consideraron significativamente diferentes cuando la $p \leq 0.05$.

4.9. Diseño experimental

Se estudiaron las diferencias entre la morfina y el fentanilo en su capacidad para producir neuroinflamación y para desarrollar tolerancia a su efecto antinociceptivo, mediante una serie de experimentos que se presentan en el siguiente diagrama.

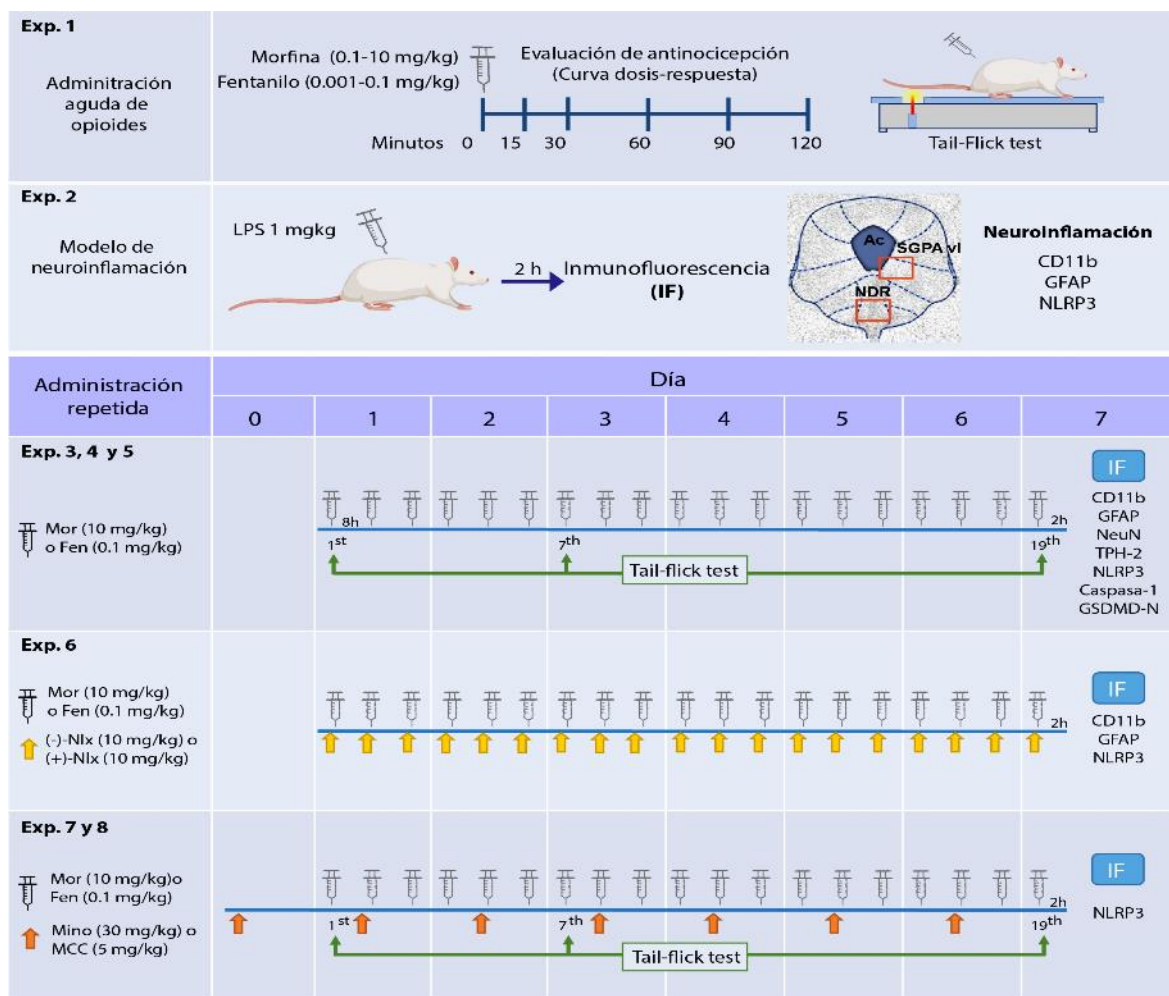


Figura 12. Diseño experimental. Experimentos diseñados para analizar la relación entre la neuroinflamación y el desarrollo de tolerancia a opioide. Exp. 1) Administración aguda de morfina (Mor) o fentanilo (Fen) para la determinación de la curva dosis-respuesta y el curso temporal del efecto antinociceptivo. Exp. 2) Administración aguda de LPS para la determinación de la activación de microglía (CD11b), astrocitos (GFAP) y NLRP3 en la SGPA y el NDR (recuadros en color naranja utilizando como referencia el acueducto). Exp. 3-5) Administración repetida (19x) de Mor o Fen para la inducción de tolerancia antinociceptiva y el análisis de la activación de microglía, astrocitos y de la actividad de NLRP3 (Caspasa-1, y GSDMD-N), en microglía, astrocitos, neuronas (NeuN) y neuronas serotoninérgicas (TPH-2). Exp.6) Co-tratamiento de Mor o Fen con (-)-Naloxona ((-)-Nlx) o (+)-Naloxona ((+)-Nlx) para la determinación del mecanismo de activación de microglía, astrocitos y NLRP3. Exp. 7 y 8) Co-tratamiento de Mor o Fen con minociclina (Mino) o MCC950 (MCC) para la evaluación del desarrollo de tolerancia antinociceptiva y la determinación de la activación del inflamasoma NLRP3.

4.9.1. Experimento 1: Determinación de las dosis equianalgésicas de morfina o fentanilo

Se realizaron curvas dosis-respuesta para determinar el efecto antinociceptivo producido por la administración aguda de opioides. Para esto se administraron dosis crecientes de morfina (0.1 - 10 mg/kg) o fentanilo (0.001 - 0.1 mg/kg) a grupos individuales de ratas (n = 8). Se midió el efecto antinociceptivo inmediatamente después de la administración y a los 15, 30, 60, 90 y 120 min mediante la prueba de latencia del retiro de la cola.

4.9.2. Experimento 2: Establecimiento de un modelo de neuroinflamación mediante la administración sistémica de LPS

Se estableció un control positivo de neuroinflamación mediante la administración aguda de 1 mg/kg de LPS por vía intraperitoneal. Este componente forma parte de la membrana externa de las bacterias Gram (-) y es un potente estimulador de la respuesta inmunológica al activar distintos receptores de la inmunidad innata (Rathinam et al., 2019). Dos horas después de la administración, se extrajo el cerebro y se analizó, mediante inmunofluorescencia, la expresión de los marcadores de neuroinflamación CD11b (microglía), GFAP (astrocitos) y la activación del inflammasoma NLRP3 en el NDR y la SGPA.

4.9.3. Experimento 3: Inducción de tolerancia el efecto antinociceptivo de la morfina y el fentanilo

Se diseñó un protocolo de administración repetida para inducir tolerancia al efecto antinociceptivo de los opioides. Para esto se utilizaron dos grupos de animales (n=8 cada uno), cada grupo se administró vía i.p. con morfina (10 mg/kg) o fentanilo (0.1 mg/kg), tres veces al día (cada ocho horas), durante siete días hasta llegar a 19 administraciones. El grupo control recibió el mismo número de administraciones, pero con solución salina al 0.9 %. Se midió el efecto antinociceptivo durante 120 min después de la 1^a, 7^a y 19^a administración.

4.9.4. Experimento 4: Evaluación de la neuroinflamación en la SGPA y el NDR de ratas tratadas repetidamente con morfina o fentanilo

Para evaluar si la administración repetida de opioides induce neuroinflamación, se extrajo el cerebro de tres animales dos horas después de la última administración de morfina o fentanilo. Se analizó, mediante inmunofluorescencia, la expresión de CD11b, GFAP y la activación del inflamasoma NLRP3 en el NDR y la SGPA. Los datos obtenidos se compararon con un grupo control tratado con solución salina al 0.9 % y con un control positivo de neuroinflamación administrado con LPS.

4.9.5. Experimento 5: Determinación de la localización y la activación del inflamasoma NLRP3 inducido por la administración repetida de morfina o fentanilo

Se determinó la localización del inflamasoma NLRP3 mediante un análisis de solapamiento entre NLRP3 y los marcadores de microglía (CD11b), astrocitos (GFAP) y neuronas (NeuN). En el NDR se evaluó el solapamiento entre NLRP3 y la proteína TPH-2 (triptófano hidroxilasa 2) que se expresa en estas células ya que es la enzima limitante de la síntesis de serotonina. Para determinar la actividad del inflamasoma NLRP3 se evaluó su solapamiento con caspasa-1. Además, se midió la inmunorreactividad de la proteína GSDMD-N para determinar si la activación de NLRP3 inducía piroptosis.

4.9.6. Experimento 6: Efecto del bloqueo de los receptores opioides y del TLR4 sobre los efectos neuroinflamatorios de los opioides

Para determinar el mecanismo de neuroinflamación, se administró (-)-naloxona para bloquear a los receptores opioides o (+)-naloxona para bloquear al receptor TLR4. La administración de estos antagonistas se realizó 20 minutos antes de cada administración de morfina o fentanilo. Dos horas después de la última administración de opioides, se extrajo el cerebro y se analizó la inmunorreactividad de CD11b, GFAP y NLRP3.

4.9.7. Experimento 7: Efecto la minociclina sobre la tolerancia antinociceptiva producida por morfina o fentanilo

Se analizó el papel de la neuroinflamación en el desarrollo de tolerancia antinociceptiva. Para esto se administró minociclina, un inhibidor de NF- κ B, a lo largo del tratamiento con opioides. Cada grupo experimental ($n = 8$) recibió minociclina (30 mg/kg/día, i.p.) comenzando un día previo a la primera administración de opioides y 60 minutos antes de la segunda administración diaria de morfina o fentanilo. Los grupos control recibieron solamente minociclina o solución salina. Se midió el efecto antinociceptivo durante 120 min después de la 1^a, 7^a y 19^a administración de opioides. Se siguió este esquema de administración de minociclina se ya que se ha demostrado que, aunque su tiempo de vida media es corto (3-4 h; Colovic and Caccia, 2003), retrasa la tolerancia antinociceptiva producida por la morfina en ratas con dolor neuropático (Zhang et al., 2015).

4.9.8. Experimento 8: Efecto del MCC950 sobre la tolerancia antinociceptiva y la neuroinflamación inducidas por morfina o fentanilo

Para estudiar la relación entre la activación del inflamasoma NLRP3 y el desarrollo de tolerancia antinociceptiva a morfina y fentanilo, se administró el fármaco MCC950, un potente inhibidor de la oligomerización de NLRP3 (Coll et al., 2015; Dempsey et al., 2017). Cada grupo experimental ($n = 8$) recibió una administración de MCC950 (5 mg/kg/día) comenzando un día previo a la primera administración de opioides y 60 minutos antes de la segunda administración diaria de morfina o fentanilo. Los grupos control recibieron un tratamiento repetido con MCC950 o solución salina. Se midió el efecto antinociceptivo durante 120 min después de la 1^a, 7^a y 19^a administración de morfina o fentanilo. Se extrajo el cerebro de las ratas dos horas después de la última administración de opioides y se analizó, mediante inmunofluorescencia, la activación de NLRP3 y la inmunorreactividad a CD11b y GFAP. La dosis y el esquema de administración de MCC950 se eligió porque, bajo estas condiciones, este fármaco reduce el dolor inflamatorio a través de la inhibición de la oligomerización de NLRP3 (Chen et al., 2019; Coll et al., 2019).

5. Resultados

5.1. El fentanilo es más potente que la morfina para producir antinocicepción en ratas Wistar

Para seleccionar la dosis de opioides a utilizar en los estudios de tolerancia, se hicieron curvas dosis-respuesta. La administración aguda de morfina o fentanilo produjo un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis. El efecto máximo de morfina se presentó al administrar 10 mg/kg y alcanzó su punto más alto después de 15 minutos; este efecto se mantuvo hasta los 120 minutos (Fig. 13a). El fentanilo produjo la máxima antinocicepción con 0.1 mg/kg, este efecto comenzó a los 15 minutos, se mantuvo hasta los 30 minutos y disminuyó significativamente a los 120 minutos (Fig. 13b). Dado que el fentanilo resultó ser 100 veces más potente que la morfina (0.1 mg/kg vs. 10 mg/kg, respectivamente) (Fig. 13c), se seleccionaron estas dosis para los siguientes experimentos.

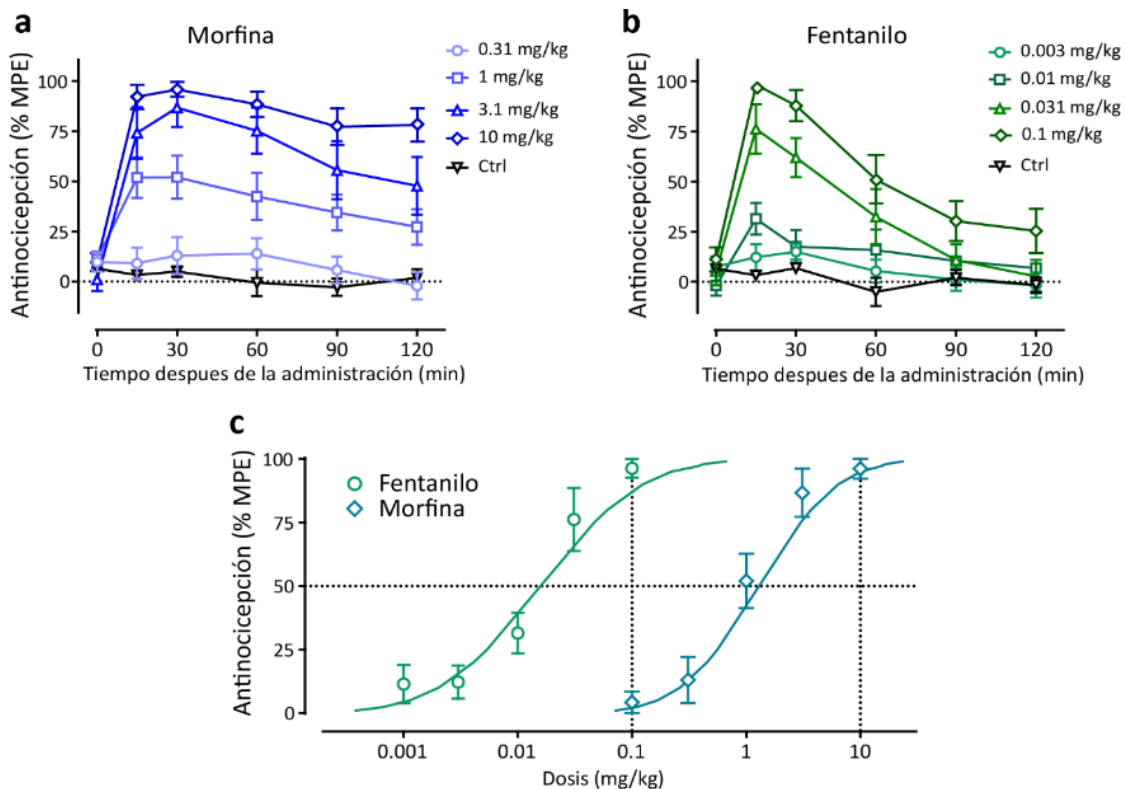


Figura 13. Efecto antinociceptivo producido por la administración aguda de morfina o fentanilo. a, b) Cursos temporales producidos por la administración de dosis crecientes de morfina o fentanilo. El control corresponde a la administración de solución salina al 0.9 %. **c)** Curva dosis respuesta del efecto máximo posible alcanzado por la administración de dosis crecientes de morfina o fentanilo. La curva se ajustó mediante un análisis de regresión lineal de Probit.

5.2. La morfina y el fentanilo producen diferentes grados de tolerancia a su efecto antinociceptivo después de su administración repetida

Una vez seleccionadas las dosis, se determinó el número de administraciones necesarias para desarrollar tolerancia a los opioides. Como se puede observar en el curso temporal, la duración del efecto antinociceptivo de la morfina disminuyó gradualmente después de 7 y 19 administraciones (Fig. 14a). Al comparar el efecto máximo observamos que en la última administración de morfina el efecto disminuyó hasta más del 50 % y esta disminución fue estadísticamente significativa ($F_{(2,27)} = 12.95$; $p = 0.0001$; Fig. 14b). El desarrollo de tolerancia es más evidente cuando se compararon los valores de ABC, en este caso se observó que los efectos de la morfina disminuyeron significativamente desde la séptima administración y este efecto fue más evidente después de 19 administraciones ($F_{(2,27)} = 36,3$; $p < 0.0001$; Fig. 14c).

La administración repetida de fentanilo disminuyó la duración del efecto antinociceptivo y se observó hiperalgesia 120 minutos después de la última administración ($p = 0.016$; prueba de suma de rangos de Wilcoxon para una sola muestra, Fig. 14d). No hubo diferencias estadísticas significativas entre la 1^a, 7^a y 19^a administración de fentanilo al comparar los valores de Emax ($F_{(2,27)} = 2,26$; $P = 0,12$; Fig. 14e), pero las diferencias fueron evidentes cuando se compararon los valores de ABC donde se observa una disminución en el efecto antinociceptivo del fentanilo después de 7 y 19 administraciones ($F_{(2,27)} = 12.75$; $p = 0.0001$; Fig. 14f).

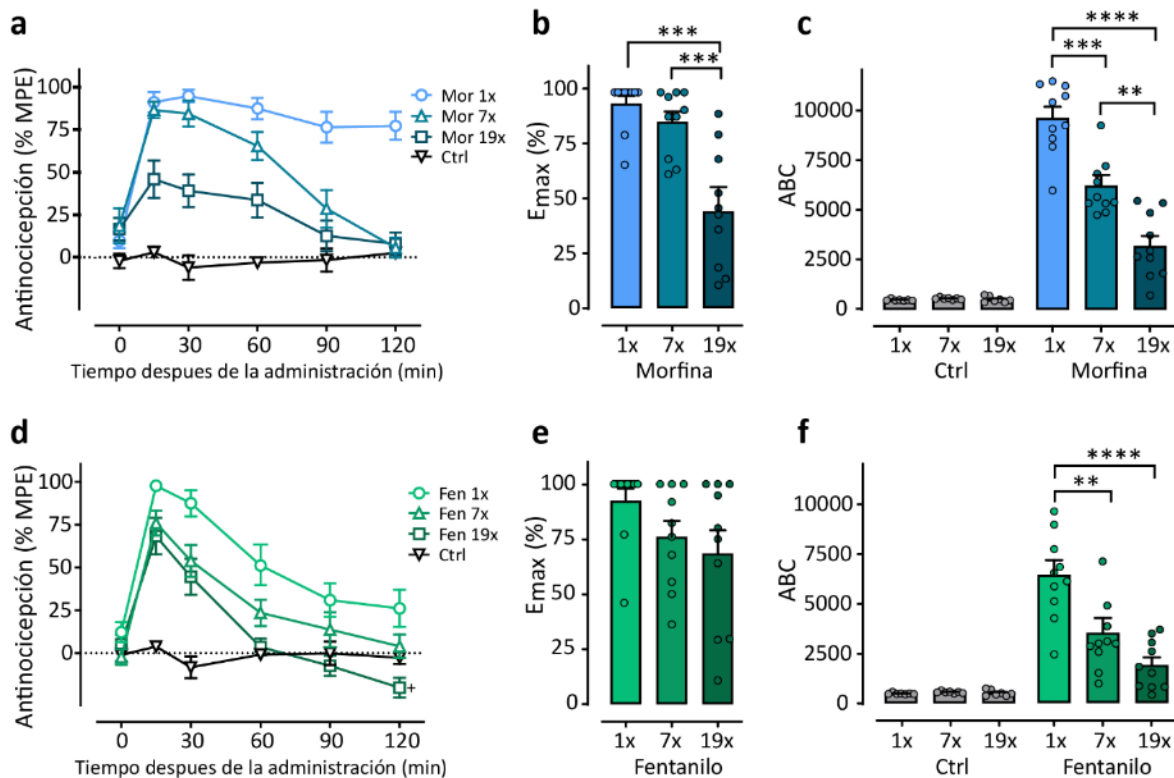


Figura 14. Efecto antinociceptivo producido por la administración repetida de morfina o fentanilo. **a, d)** Curso temporal del máximo efecto posible inducido por la administración aguda o repetida (1x, 7x y 19x) de morfina o fentanilo. **b, e)** Efecto máximo (Emax) producido por la administración aguda o repetida de morfina o fentanilo. **c, f)** Área bajo la curva (ABC) del efecto producido por la administración aguda o repetida de morfina o fentanilo. Cada punto en la curva representa la media \pm e.e. de una $n = 8$. El control corresponde a animales tratado con solución salina al 0.9 %. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey, $**p < 0.01$, $*** p < 0.001$, $****p < 0.0001$; $+p < 0.05$; prueba de suma de rangos de Wilcoxon para una sola muestra.

Tomando en cuenta estos resultados, decidimos analizar los efectos neuroinflamatorios dos horas después de 19 administraciones de opioides ya que es el punto donde se observaron las principales diferencias en el efecto antinociceptivo de la morfina y el fentanilo.

5.3. El LPS induce la expresión de NLRP3 en microglía, astrocitos y neuronas de la SGPA y el NDR

Previo a la evaluación de los efectos neuroinflamatorios producidos por morfina o fentanilo, se estableció un control positivo de neuroinflamación. La administración sistémica de 1 mg/kg de LPS produjo un aumento significativo en la activación del inflamasoma NLRP3 y en la inmunorreactividad de los marcadores de microglía (CD11b) y astrocitos (GFAP) tanto en la SGPA como en el NDR (Figs. 15a, e). Estas observaciones se confirmaron mediante la cuantificación del número de células positivas a NLRP3 (Figs. 8b, f) y CD11b (Figs. 15c, g), así como de la intensidad de fluorescencia media de GFAP (Fig. 15d, h).

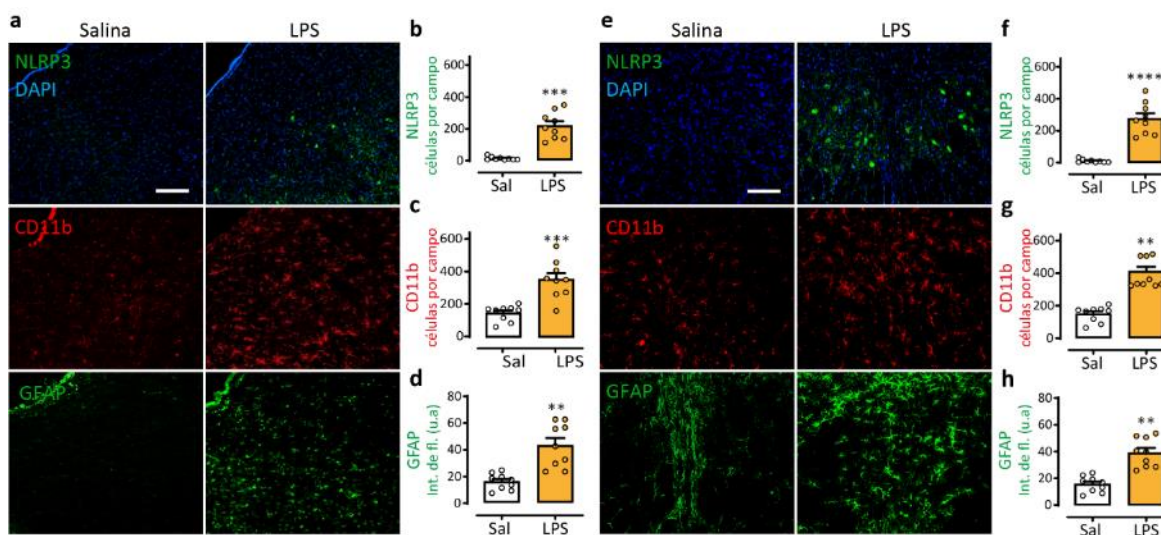


Figura 15. Efectos neuroinflamatorios producidos por la administración aguda de LPS. a, e) Imágenes representativas que muestran la inmunorreactividad a NLRP3, CD11b y GFAP en la SGPA (a) y el NDR (e) de animales que recibieron LPS o solución salina. En la esquina superior de las imágenes del panel a se observa el acueducto. Barra de escala: 100 μm **b, f)** Conteo del número de células positivas a NLRP3. **c, g)** Conteo del número de células positivas a CD11b. **d, h)** Intensidad de fluorescencia media (Int. de fl.) producida por GFAP. Cada barra representa la media ± e.e. de una $n_{\text{rebanadas/animales}} = 9$. Los datos se analizaron mediante una prueba t de Student, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Para determinar los tipos celulares que expresaron el inflammasoma NLRP3 inducido por LPS, se realizó un análisis de inmunofluorescencia. Como se observa en la figura 16a, la administración aguda de LPS induce la activación del inflammasoma NLRP3 en microglía, astrocitos y neuronas (CD11b, GFAP y NeuN, respectivamente). El análisis de sobrelapamiento de Manders indica que los tres tipos celulares expresan el inflammasoma NLRP3 y que en los astrocitos y las neuronas se observa un efecto significativamente mayor que en la microglía ($F_{2,48} = 302.2$; $p < 0.0001$; Fig. 16b).

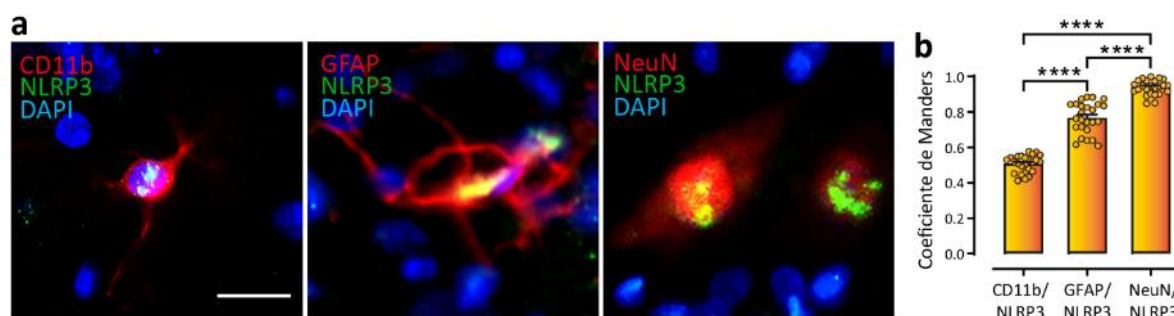


Figura 16. Localización del inflammasoma NLRP3 en distintos tipos celulares de la SGPA/NDR. a) Imágenes representativas de células individuales donde se muestra la co-localización de NLRP3 (verde) con CD11b, GFAP o NeuN (rojo). El núcleo celular se marcó con DAPI (azul). Barra de escala: 10 μm . **b)** Análisis de sobrelapamiento de Manders entre NLRP3 y CD11b, GFAP o NeuN. Cada barra representa la media \pm e.e. de una $n = 25$ células doble positivas para NLRP3 y los marcadores de cada tipo celular. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey, **** $p < 0.0001$.

5.4. La administración repetida de morfina o fentanilo induce la activación del inflammasoma NLRP3 y el aumento en la activación de la microglía y los astrocitos en la SGPA y el NDR

Una vez estandarizada la técnica de detección del inflammasoma NLRP3, se evaluó la activación de NLRP3, microglía y astrocitos en la SGPA y el NDR de ratas que recibieron morfina o fentanilo. Los grupos administrados repetidamente con morfina o fentanilo mostraron una gran cantidad de células positivas a NLRP3 tanto en la SGPA como en el NDR (Fig. 17a). Este incremento es estadísticamente significativo cuando se compara contra el control ($F_{2,16} = 19.06$; $p < 0.0001$; Fig. 17b y $F_{2,16} = 28.78$; $p < 0.0001$; Fig. 17c). En particular, en el NDR se observa que la cantidad de células positivas a NLRP3 inducidas por fentanilo es significativamente mayor que las inducidas por morfina (Fig. 17c).

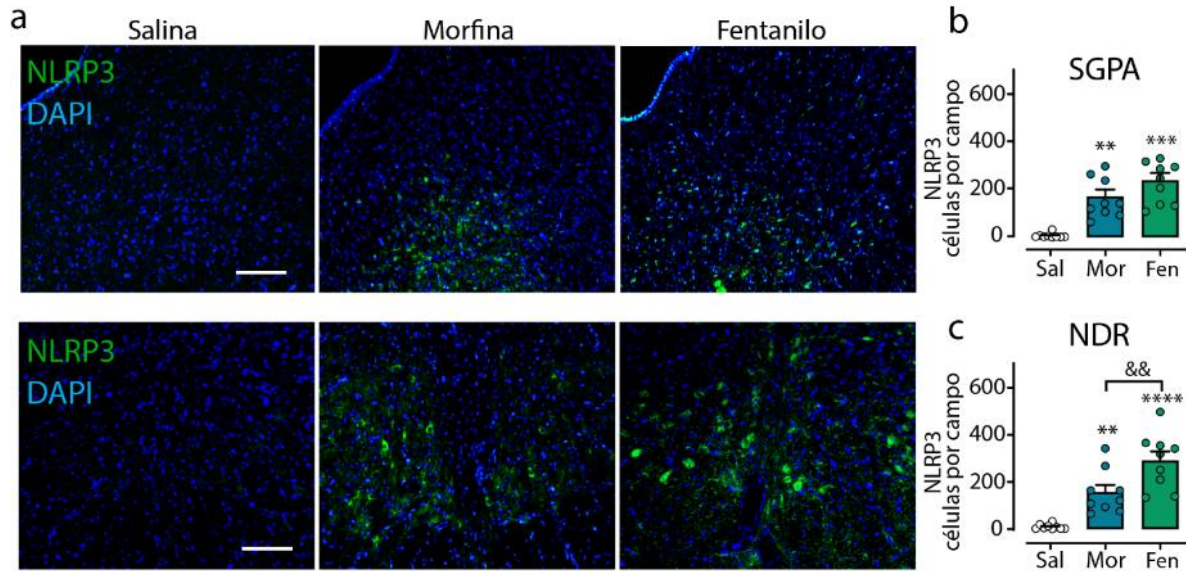


Figura 17. Activación del inflammasoma NLRP3 inducida por la administración repetida de morfina o fentanilo. a y b) Imágenes representativas de la inmunorreactividad a NLRP3 en la SGPA y el NDR de ratas que recibieron morfina, fentanilo o solución salina de manera repetida. El núcleo celular se marcó con DAPI. En la esquina superior de las imágenes superiores se observa el acueducto. Barra de escala: 100 μ m. **b y c)** Conteo del número de células positivas a NLRP3 en la SGPA y el NDR. Cada barra representa la media \pm e.e de $n_{\text{rebanadas/animales}} = 9$. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para comparaciones contra el control; && $p < 0.01$ para la comparación entre grupos.

Ya que las principales diferencias entre morfina y fentanilo para inducir la activación de NLRP3 se observan en el NDR, decidimos evaluar la expresión de microglía y astrocitos en esta región cerebral. Como se observa en la Fig. 18a, la administración repetida de morfina o fentanilo induce un incremento similar en el número de células positivas a CD11b ($F_{(2,16)} = 34.37$; $p < 0.0001$; Fig. 18b) y en la intensidad de fluorescencia de GFAP ($F_{(2,16)} = 35.99$; $p < 0.0001$; Fig. 18c).

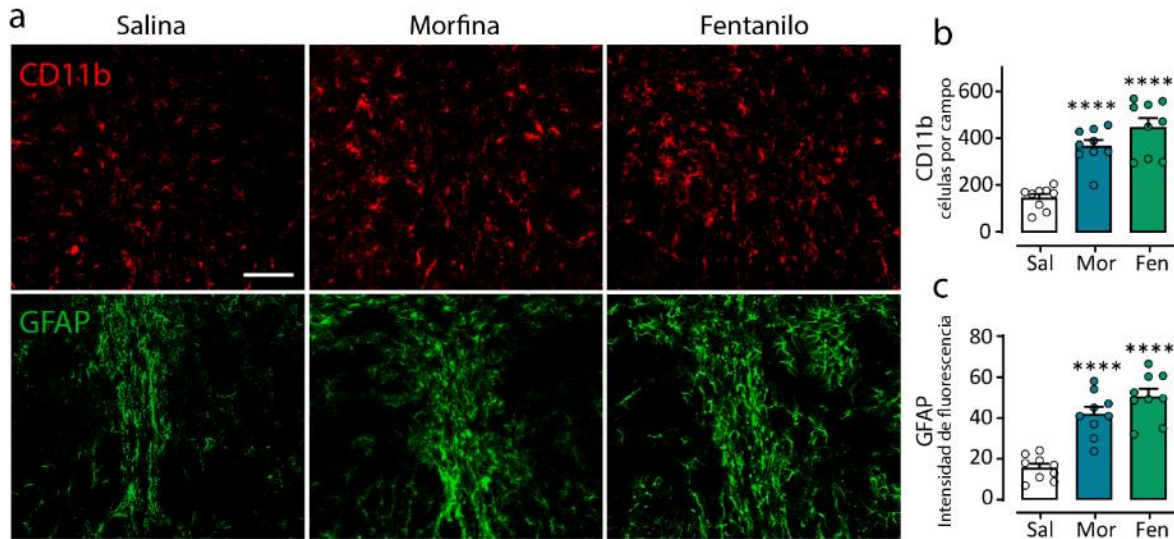


Figura 18. Activación de la microglía y los astrocitos en respuesta a la administración repetida de morfina o fentanilo. **a)** Imágenes representativas de la inmunorreactividad a CD11b y GFAP en el NDR de ratas que recibieron 19 administraciones de morfina, fentanilo o solución salina. Barra de escala: 100 μ m. **b)** Conteo del número de células positivas a CD11b. **c)** Intensidad de fluorescencia media producida por GFAP. Cada barra representa la media \pm e.e. del conteo de 9 rebanadas obtenidas de tres diferentes animales. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey, **** $P < 0.0001$.

5.5. El NLRP3 inducido por la administración repetida de morfina o fentanilo se localiza en neuronas y astrocitos, pero no en microglía

El siguiente objetivo de este trabajo fue determinar la localización de NLRP3 inducido por la administración repetida de morfina o fentanilo en los diferentes tipos celulares. Para esto, se realizó una doble inmunofluorescencia para determinar la expresión del inflammasoma y los marcadores específicos celulares. El inflammasoma NLRP3 inducido por la administración repetida de morfina o fentanilo se encontró dentro de células positivas a GFAP y NeuN, pero no en células positivas a CD11b (Fig. 19a). El tratamiento repetido con morfina o fentanilo no produjo un incremento significativo en el coeficiente de solapamiento de Manders cuando se analizó la correlación entre NLRP3 y CD11b ($F_{(2,48)} = 0.41$; $p = 0.67$; Fig. 19b). En contraste, tanto la morfina como el fentanilo produjeron un incremento significativo en el solapamiento del inflammasoma NLRP3 con el marcador específico de astrocitos ($F_{(2,48)} = 56.61$; $p < 0.0001$; Fig. 19c) y neuronas ($F_{(2,48)} = 330.5$; $p < 0.0001$; Fig. 19d), pero no de microglía. Los efectos del fentanilo son más evidentes en neuronas.

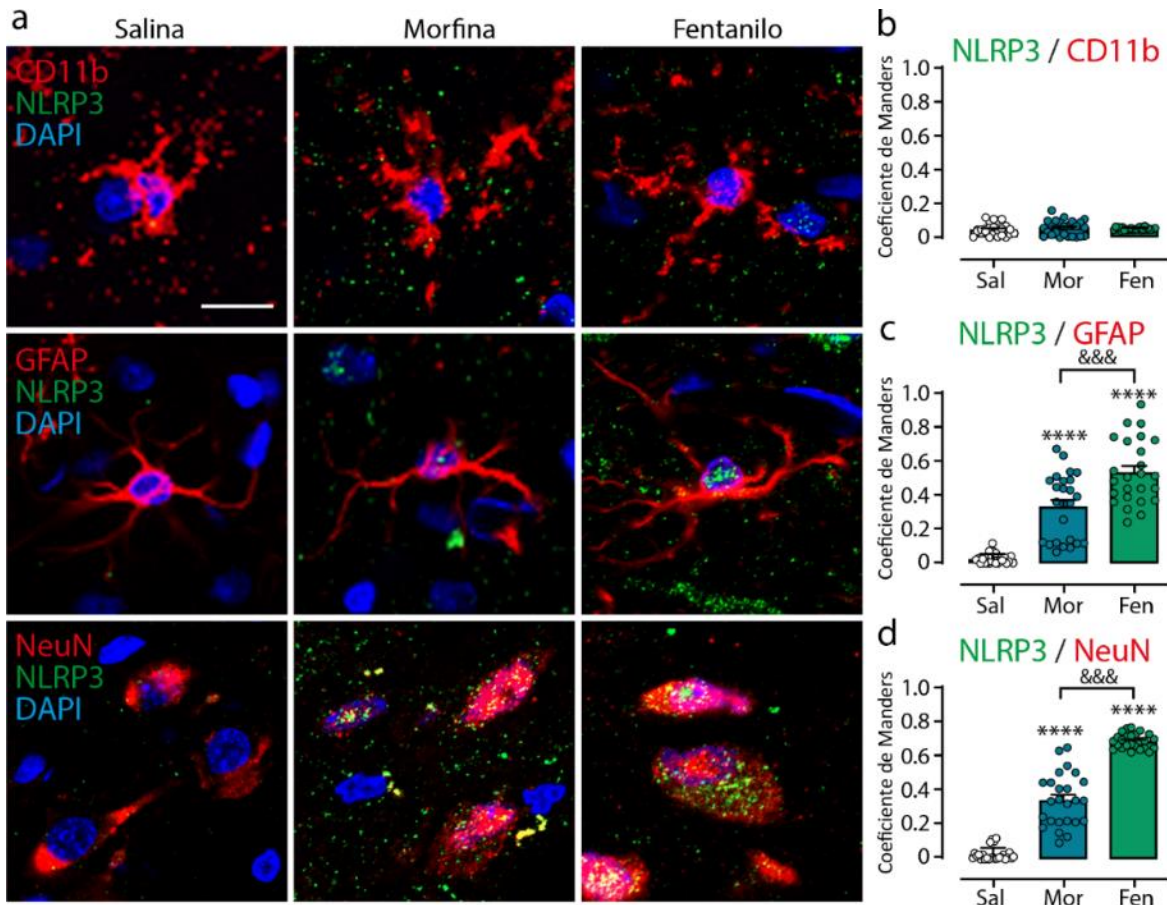


Figura 19. Localización del inflammasoma NLRP3 en distintos tipos celulares del NDR. a) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de NLRP3 y los marcadores de microglía (CD11b), astrocitos (GFAP) y neuronas (NeuN). Barra de escala: 10 μ m. b, c, d) Análisis de sobrelapamiento de Manders entre NLRP3 y CD11b, GFAP o NeuN. Cada barra representa la media \pm e.e. de una n = 25 células. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey, ****p < 0.0001 para comparaciones contra el control. &&&p < 0.001 para comparaciones entre grupos.

5.6. El NLRP3 inducido por la administración repetida de morfina y fentanilo se localiza en neuronas serotoninérgicas del NDR

Debido a que el NDR se constituye principalmente por neuronas serotoninérgicas, y la serotonina tiene un papel importante en la modulación del dolor, se realizó una doble inmunofluorescencia para NLRP3 y TPH-2, la enzima limitante en la síntesis de serotonina. La administración repetida de morfina o fentanilo indujo la activación del inflammasoma NLRP3 en neuronas serotoninérgicas (Fig. 20a). Del total de células que expresaron el inflammasoma NLRP3, la proporción de células positivas a TPH-2 fue más alta en el grupo que recibió fentanilo de manera repetida (579/836 células; 69.3 %) que en el grupo que recibió morfina (176/592 células; 29.7 %; p < 0.0001; Fig. 20b).

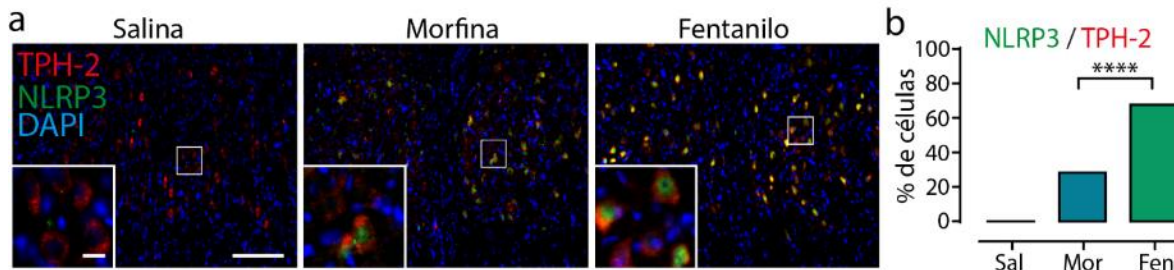


Figura 20. Localización del inflammasoma NLRP3 en neuronas serotoninérgicas inducido por la administración repetida de morfina o fentanilo. a) Imágenes representativas de la inmunorreactividad a NLRP3 en neuronas serotoninérgicas (TPH-2) en los grupos tratados repetidamente con morfina o fentanilo. Barra de escala: 100 μ m para imágenes completas y 10 μ m para las imágenes ampliadas. b) Proporción de neuronas serotoninérgicas que expresan el inflammasoma NLRP3. $n_{\text{morfina}} = 592$ células, $n_{\text{fentanilo}} = 863$ células obtenidas de nueve rebanadas de tres diferentes animales. **** $p < 0.0001$, prueba exacta de Fisher.

5.7. La administración repetida de morfina o fentanilo inducen la activación de caspasa-1 y GSDMD-N

Los experimentos anteriores permitieron demostrar la expresión del inflammasoma en respuesta a la administración repetida de morfina y fentanilo, principalmente en neuronas y astrocitos, pero no su funcionalidad. Para estudiar la funcionalidad del inflammasoma NLRP3, se evaluó la expresión de las proteínas caspasa-1 y GSDMD-N. La administración repetida de ambos opioides indujo un incremento en el número de células positivas a caspasa-1. Este incremento fue mayor en el grupo que recibió fentanilo ($F_{(2,24)} = 19.66$; $p < 0.0001$; Figs. 21a, b). El coeficiente de Manders indicó un alto grado de solapamiento entre NLRP3 y caspasa-1 que fue significativo cuando se comparó contra el control y que fue más evidente en el grupo de fentanilo ($F_{(2,72)} = 634.2$; $p < 0.0001$; Figs. 21c, d).

Para estudiar si la oligomerización del inflammasoma NLRP3 lleva a la muerte celular por piroptosis, se determinó la expresión de la proteína formadora de poros GSDMD-N en el NDR. La administración repetida de morfina y de fentanilo indujo la expresión de GSDMD-N ($F_{(2,24)} = 121.2$; $p < 0.0001$) pero el fentanilo tuvo mayor efecto (Figs. 21e, f).

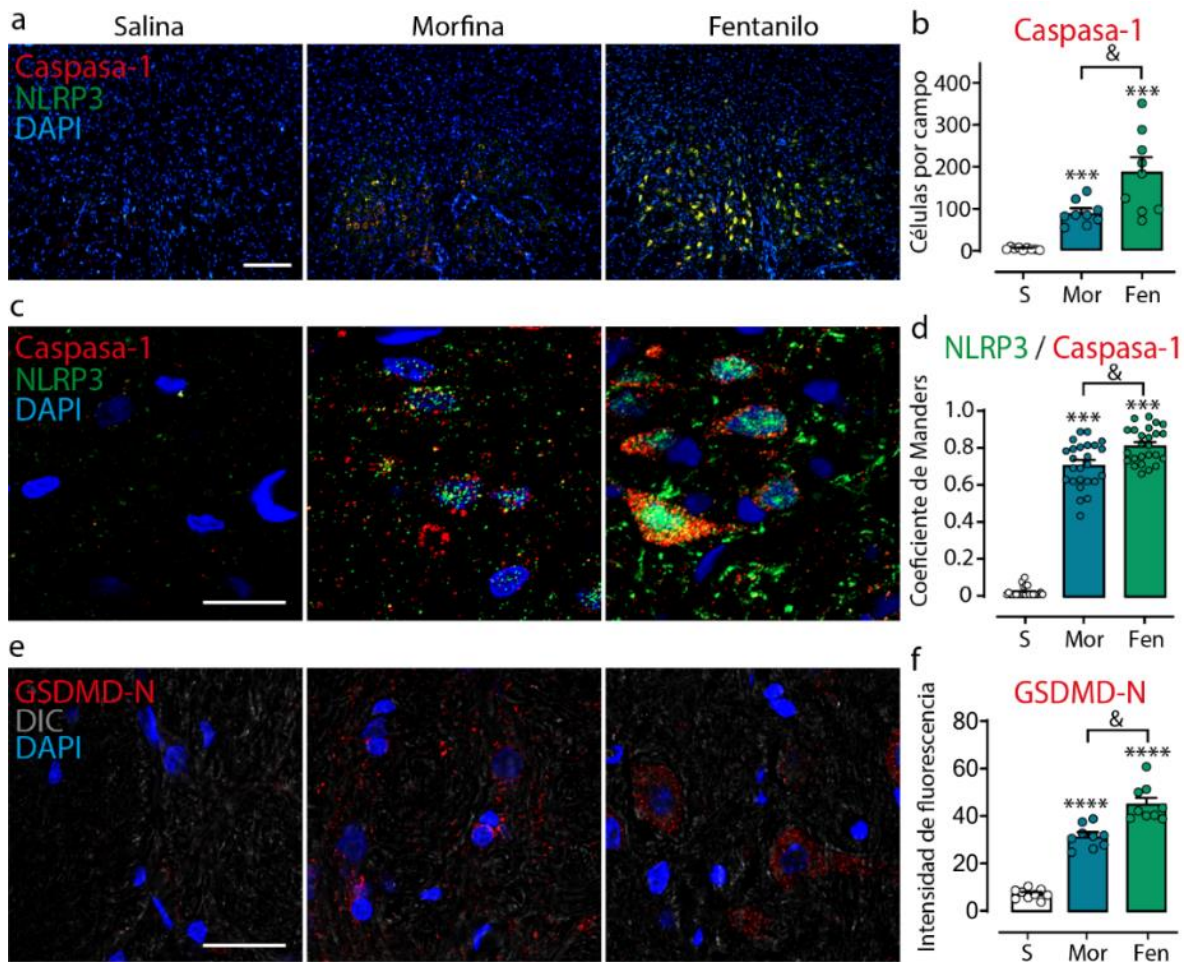


Figura 21. Expresión de las proteínas caspasa-1 y GSDMD-N en el NDR de ratas administradas repetidamente con morfina o fentanilo. **a)** Imágenes representativas la inmunorreactividad a NLRP3 y caspasa-1 en el NDR de ratas tratadas repetidamente con morfina, fentanilo o solución salina. Barra de escala: 100 μ m. **b)** Número de células positivas a caspasa-1. Cada barra representa la media \pm e.e. de una $n_{\text{rebanadas/animales}} = 9$. **c)** Imágenes representativas de células con inmunorreactividad a NLRP3 y caspasa-1 en el NDR. Barra de escala: 10 μ m. **d)** Coeficiente de sobrelapamiento de Manders entre caspasa-1 y NLRP3. Cada barra representa la media \pm e.e. de una $n = 30$ células. **e)** Imágenes representativas que muestran la inmunorreactividad a GSDMD-N y el contraste de interferencia diferencial (DIC) en el NDR. **f)** Intensidad de fluorescencia media de GSDMD-N. Cada barra representa la media \pm e.e. de una $n_{\text{rebanadas/animales}} = 9$. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para las comparaciones contra el control; & $p < 0.05$ para las comparaciones entre grupos experimentales.

5.8. Los receptores opioides y TLR4 participan de manera diferencial en la neuroinflamación inducida por opioides

Para identificar el papel de los receptores opioides y TLR4 en la neuroinflamación producida por el tratamiento repetido de morfina y fentanilo, se administró el antagonista opioide (-)-naloxona y el antagonista del TLR4 (+)-naloxona. Como se mencionó previamente, la administración repetida de morfina y fentanilo inducen el aumento en la expresión de NLRP3, CD11b y GFAP (Fig. 22), pero este experimento mostró que la administración del antagonista no selectivo de receptores opioides (-)-naloxona disminuyó el número de células positivas a NLRP3 y CD11b, mientras que el bloqueo de TLR4 con (+)-naloxona no tuvo efecto (Figs. 22a, b). En contraste, el incremento en la intensidad de fluorescencia de GFAP, se previno solamente con la administración de (+)-naloxona (Fig. 22c).

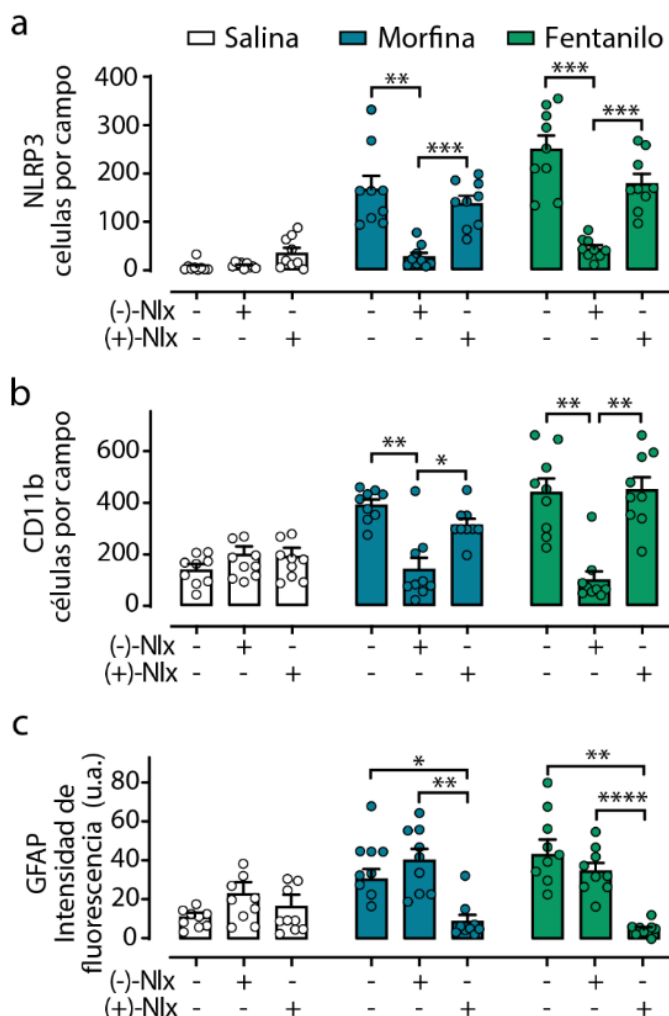


Figura 22. Efecto de (-)-naloxona y (+)-naloxona sobre la neuroinflamación inducida por la administración repetida de morfina o fentanilo. a, b) Número de células positivas a NLRP3 y CD11b en el NDR de animales que recibieron (-)-naloxona o (+)-naloxona 20 minutos antes de cada administración de morfina o fentanilo. c) Intensidad de fluorescencia media a GFAP en el NDR de animales que recibieron (-)-naloxona o (+)-naloxona 20 minutos antes de cada administración de opioides. Cada barra representa la media \pm e.e. de una $n_{\text{rebanadas/animales}} = 9$. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para las comparaciones entre grupos experimentales.

5.9. La minociclina y el MCC950 retrasan el desarrollo de tolerancia antinociceptiva a morfina y fentanilo y evitan el desarrollo de hiperalgesia producido por fentanilo

Para conocer el papel de la neuroinflamación producida por la morfina y el fentanilo sobre el desarrollo de tolerancia antinociceptiva producida por ambos opioides y sobre el desarrollo de hiperalgesia producida por fentanilo, se evitó el proceso neuroinflamatorio, previamente caracterizado, mediante dos aproximaciones experimentales: a) la administración del anti-inflamatorio minociclina; y b) el bloqueo de la oligomerización de NLRP3 por medio del inhibidor selectivo MCC950. En la Tabla 4 se muestran los valores de Emax y ABC para la 1^a, 7^a y 19^a administración de morfina o fentanilo en condiciones control o con el pretratamiento de minociclina o MCC950. Como puede observarse, ambos fármacos retrasaron el desarrollo de tolerancia antinociceptiva.

Tabla 4. Valores de Emax y área bajo la curva (ABC) correspondientes a la evaluación durante 120 minutos del curso temporal del efecto antinociceptivo					
Tratamiento	Emax (%)	ABC	Tratamiento	Emax (%)	ABC
Mor 1x	94.77 ± 3.6	9651 ± 554.3	Fen 1x	92.31 ± 5.6	6417 ± 729.4
Mor 7x	86.51 ± 4.7	6242 ± 537.2**	Fen 7x	75.97 ± 7.2	3512 ± 746&
Mor 19x	45.93 ± 11****	3196 ± 516****	Fen 19x	68.34 ± 10.6	1896 ± 383.8&&&&
Mino + Mor 1x	89.06 ± 5.1	8437 ± 982.6	Fen + Mino 1x	91.64 ± 5.8	6669 ± 842.5
Mino + Mor 7x	87.44 ± 6.9	8345 ± 780.6	Fen + Mino 7x	96.76 ± 1.7	6827 ± 751.2
Mino + Mor 19x	71.19 ± 10.2	5869 ± 955.7**	Fen + Mino 19x	84.41 ± 6.1	5266 ± 714.4
MCC + Mor 1x	100	10741 ± 331.1	Fen + MCC 1x	95.69 ± 3.2	8294 ± 613.4
MCC + Mor 7x	100	8950 ± 591.0	Fen + MCC 7x	82.87 ± 7.5	7711 ± 876.2
MCC + Mor 19x	85.15 ± 7.2	6119 ± 880.4**	Fen + MCC 19x	68.66 ± 13.7	4158 ± 652.2

Todos los datos están expresados como la media ± e.e. *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001 para la comparación contra Mor 1x; &P < 0.05, &&&P < 0.0001 para la comparación contra Fen 1x; Anova de dos vías seguida por la prueba de Dunnett.

Para hacer una comparación más clara de los efectos particulares de los dos inhibidores, en la Fig. 23 se presenta el curso temporal del efecto antinociceptivo observado en la 19^a administración de opioides en las tres condiciones experimentales. El grupo control (en verde) se tomó de la Fig. 13 y se presenta aquí con líneas punteadas para mostrar que la 19^a administración de morfina produjo menos del 50 % de su efecto antinociceptivo inicial, pero en presencia de minociclina o MCC950 alcanzó valores arriba de 70 % y 80 %, respectivamente ($F_{(2,23)} = 4.19$; $p = 0.028$; Figs. 23a, b). Esta reducción en el desarrollo de tolerancia también se observó en el ABC ($F_{(2,23)} = 4.69$; $p = 0.019$; Fig. 23c). Por otra parte, la minociclina y el MCC950 no modificaron el efecto antinociceptivo del fentanilo medido como Emax ($F_{(2,23)} = 0.7$; $p = 0.505$; Fig. 23d, e), pero sí como ABC ($F_{(2,23)} = 9.4$; $p = 0.001$; Figs. 23f). Además, la hiperalgesia producida por fentanilo, que se observó en animales sin pretratamiento, no se presentó en los que fueron administrados con minociclina o MCC950 ($p = 0.31$ and $p = 0.38$, respectivamente; prueba de suma de rangos de Wilcoxon para una sola muestra).

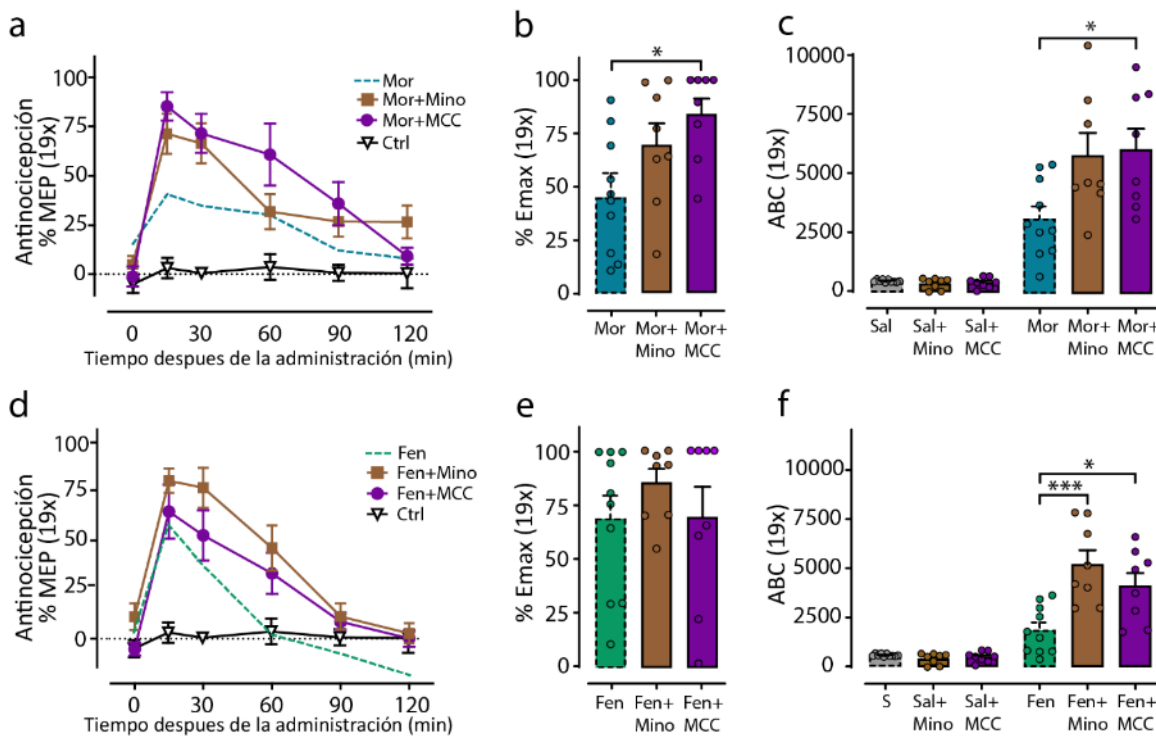


Figura 23. Efecto de la minociclina o el MCC950 sobre los efectos nociceptivos producidos después de 19 administraciones de morfina o fentanilo. a) Curso temporal del efecto nociceptivo producido por morfina sola o en combinación con minociclina (Mino) o MCC950 (MCC). **b, e)** Emax producido por morfina o fentanilo con o sin con-tratamiento con minociclina o MCC950. **c, f)** Área bajo la curva (ABC) correspondiente al efecto antinociceptivo producido por cada opioide a lo largo de dos horas de observación. Cada punto o barra corresponde a la media \pm e.e. de una $n = 8$. Anova de una vía seguida de una prueba de Tukey. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

5.10. El fármaco MCC950 evita la oligomerización del inflamasoma NLRP3 producida por la administración repetida de morfina y fentanilo

Una vez que encontramos que el MCC950 fue efectivo para disminuir el desarrollo de la tolerancia antinociceptiva producida por la administración repetida de opioides, evaluamos su efecto en la expresión de NLRP3 en el NDR de ratas administradas repetidamente con morfina o fentanilo. El MCC950 no tuvo efecto en el grupo control, pero previno significativamente el incremento en la activación de NLRP3 producida por morfina y fentanilo ($F_{(5,48)} = 24.22$; $p < 0.0001$; Figs. 24a, b). Además, el efecto inhibitorio de MCC950 fue más evidente en el grupo de fentanilo donde el número de células positivas a NLRP3 disminuyó un 72.8 % en comparación con el grupo de morfina donde la disminución fue del 64 %.

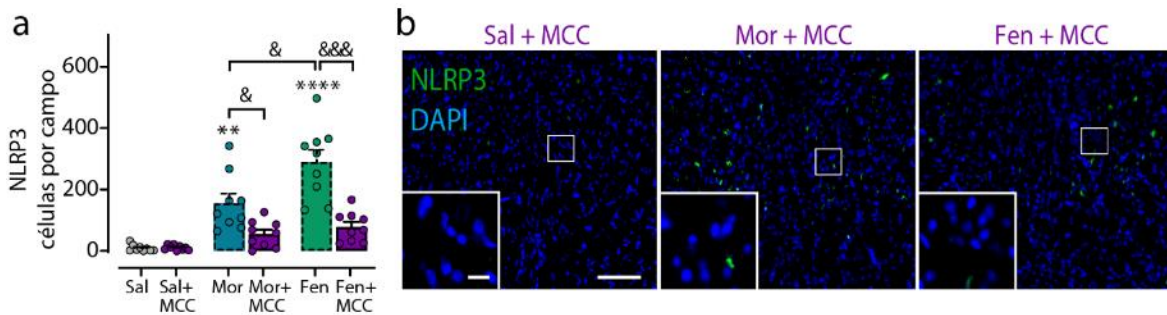


Figura 24. Efecto del MCC950 sobre la activación de NLRP3 inducida por la administración repetida de morfina o fentanilo. a) Cuantificación del número de células positivas a NLRP3. Las líneas punteadas representan la cuantificación de grupos que recibieron únicamente opioides, las líneas continuas representan a los grupos que recibieron MCC950 como co-tratamiento a lo largo de la administración con morfina o fentanilo. Cada barra representa la media \pm e.e. de una $n_{\text{rebanadas/animales}} = 9$. **b)** Imágenes representativas de la inmunorreactividad a NLRP3 en el NDR de ratas que recibieron MCC950 como co-tratamiento a lo largo de la administración con morfina o fentanilo. El núcleo celular se marcó con DAPI. Barra de escala: 100 μm para imágenes completas y 10 μm para el zoom. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ para la comparación contra el control; & $p < 0.05$, &&& $p < 0.001$ para la comparación entre grupos.

6. Discusión

Existe evidencia en la literatura de que la tolerancia al efecto antinociceptivo de la morfina se puede retrasar con fármacos con actividad anti-inflamatoria (Harada et al., 2013; Mika et al., 2009). Esto sugiere que la neuroinflamación participa en los efectos producidos por la administración repetida de morfina, pero no hay estudios que aborden los efectos neuroinflamatorios producidos por otros opiáceos de importancia clínica como el fentanilo. En este trabajo analizamos la activación del inflamasoma NLRP3 producida por la administración repetida de morfina o fentanilo en la SGPA y el NDR, dos estructuras importantes en la modulación del dolor. También, determinamos los tipos celulares que expresan el inflamasoma NLRP3 y estudiamos la piroptosis de neuronas serotoninérgicas. Finalmente, determinamos la relación que existe entre la activación del inflamasoma NLRP3 y el desarrollo de tolerancia antinociceptiva. Nuestros principales resultados son los siguientes:

1. La administración repetida de morfina o fentanilo produce diferentes grados de tolerancia. El efecto antinociceptivo de la morfina disminuye en duración y en eficacia mientras que el fentanilo mantiene su eficacia, pero la duración de sus efectos disminuye y produce hiperalgesia.
2. La administración repetida de morfina o fentanilo induce la activación del inflamasoma NLRP3 en la SGPA y el NDR. Las principales diferencias entre ambos opiáceos se presentan en el NDR, donde el efecto del fentanilo es más evidente. En esta región ambos opiáceos inducen la activación de microglía y astrocitos incrementando la expresión de los marcadores específicos CD11b y GFAP, respectivamente.
3. El inflamasoma NLRP3 inducido por la administración repetida de morfina o fentanilo se localiza en neuronas serotoninérgicas y en astrocitos, pero no en microglía.
4. La administración repetida de morfina y fentanilo induce piroptosis neuronal en el NDR.

5. Los receptores opioides y TLR4 participan de manera diferencial en la neuroinflamación inducida por opioides en el NDR. Los receptores opioides están involucrados en la activación de NLRP3 y la microgliosis, mientras que la activación de TLR4 es necesaria para inducir astrogliosis.
6. El bloqueo de la vía de activación de NF- κ B y de la oligomerización del inflamasoma NLRP3 evita el desarrollo de tolerancia antinociceptiva producida por morfina y fentanilo, y previenen el desarrollo de hiperalgesia producida por fentanilo.

A continuación, se discuten estos resultados.

6.1. Existen diferencias entre la morfina y el fentanilo para producir tolerancia antinociceptiva y en su capacidad para producir neuroinflamación en el NDR, donde los efectos del fentanilo son más evidentes

Una consecuencia derivada del uso repetido de opioides es el desarrollo de tolerancia a su efecto antinociceptivo. En este trabajo mostramos que el efecto antinociceptivo de la morfina disminuye en magnitud y duración mientras que el efecto del fentanilo se mantiene, pero induce hiperalgesia después de su administración repetida. Estos resultados son similares a reportes previos que mencionan que el fentanilo induce menor tolerancia analgésica que la morfina (Bobeck et al., 2012; Molina-Martínez et al., 2014). También, se ha reportado que bajo condiciones experimentales específicas, tanto la morfina como el fentanilo pueden producir hiperalgesia (Célèrier et al., 2000; Mao et al., 1995). En nuestro estudio, empleamos un esquema de administración de dosis equianalgésicas que nos permite observar el desarrollo de tolerancia antinociceptiva producida por morfina y fentanilo y la hiperalgesia únicamente en los animales administrados con fentanilo. Nuestros resultados coinciden con algunas observaciones clínicas que indican que el desarrollo de tolerancia analgésica e hiperalgesia dependen del esquema de administración y del opioide empleado (Hayhurst y Durieux, 2016).

Una vez establecidas las diferencias entre morfina y fentanilo para producir tolerancia antinociceptiva e hiperalgesia, propusimos la hipótesis de que ambos opioides podrían diferir en su capacidad para producir neuroinflamación en el NDR y la SGPA, dos regiones que modulan la transmisión del dolor. Para abordar esta idea, medimos la activación del inflamasoma NLRP3, de la microglía y de los astrocitos después de la última administración de opioides, cuando se observan las principales diferencias en tolerancia antinociceptiva entre la morfina y el fentanilo.

Nuestro principal hallazgo fue que la administración repetida de morfina o fentanilo induce la activación del inflamasoma NLRP3 en el NDR y la SGPA, pero el fentanilo lo hace en mayor magnitud que la morfina en el NDR. Un estudio reciente demostró que el bloqueo farmacológico del inflamasoma NLRP3 en la corteza de ratones evita el desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo producido por la administración de morfina (10 mg/kg, 7 días, s.c.). En ese mismo estudio, los autores demostraron que, en ratones carentes del gen *Nlrp3*, la morfina produce un menor grado de tolerancia antinociceptiva (Liu et al., 2020). Otro estudio demostró que el bloqueo del inflamasoma NLRP3, en la médula espinal de ratas con dolor neuropático, evita el desarrollo de tolerancia antinociceptiva producida por morfina en un efecto dependiente de la dosis (Cai et al., 2016). Con respecto al fentanilo, este es el primer estudio que muestra que este opioide induce la activación del inflamasoma NLRP3 y que lo hace en mayor magnitud que la morfina. Además, en dosis equianalgésicas y con los mismos esquemas de administración, ambos opioides producen tolerancia antinociceptiva, pero solo el fentanilo produce hiperalgesia. Estos resultados y los de la literatura sugieren que el grado de activación del inflamasoma NLRP3 inducida por la morfina o el fentanilo podría estar relacionado con las diferencias de cada opioide para producir tanto la tolerancia antinociceptiva como la hiperalgesia.

Se han sugerido varios mecanismos para explicar cómo la activación de inflamasomas puede contribuir al desarrollo de tolerancia a los efectos antinociceptivos de los opioides (Xu et al., 2017). Entre los más estudiados está la liberación glial de mediadores inflamatorios que podrían favorecer la transmisión de la información nociceptiva (Gustafson-Vickers et al., 2008; Mohan, 2016). En este sentido, nuestros

resultados mostraron que la administración repetida de morfina y fentanilo inducen astrogliosis y microgliosis en la SGPA y el NDR, lo que indica que los opioides producen neuroinflamación en ambas regiones. Se ha demostrado que la activación de la microglía y los astrocitos en la médula espinal de ratas correlaciona con la pérdida del efecto antinociceptivo de la morfina (10 mg/kg, 5 días) (Martyn et al., 2019; Raghavendra et al., 2002). Nuestros datos extienden estos hallazgos a otras regiones cerebrales y a otro opioide de relevancia clínica. Existe la posibilidad de que la neuroinflamación producida en regiones supraespinales contribuya a la pérdida del efecto antinociceptivo de los opioides, posiblemente mediante un mecanismo de sensibilización neuronal similar al que se ha observado con otros estímulos como el daño al tejido o la invasión de patógenos (Baral et al., 2019). Para comprobar esta hipótesis es necesario estudiar la actividad de los mediadores inflamatorios liberados de las células gliales inducidos por morfina y fentanilo, y los cambios que podrían generar en las neuronas que facilitan la transmisión nociceptiva.

La neuroinflamación producida por opioides, medida como la activación de la microglía, los astrocitos y el inflamasoma NLRP3, podría ser similar o no a la que produce un reto inmunológico; por eso administramos la endotoxina LPS, además de incluir este grupo experimental como un control positivo. La neuroinflamación producida por la morfina y el fentanilo fue similar en magnitud a la producida por el LPS, pero difirió en distribución espacial ya que los opioides producen neuroinflamación principalmente en el NDR mientras que el LPS la produce de manera generalizada. En este sentido, existe evidencia previa de que la gliosis inducida por morfina ocurre en áreas relacionadas con la transmisión del dolor como la SGPA y el ADME (Doyle et al., 2017; Harada et al., 2013; Posillico et al., 2015). Nuestros resultados aportan evidencia de que los efectos neuroinflamatorios diferenciales producidos por la morfina y el fentanilo también ocurren en el NDR, otra región importante en el control descendente de la transmisión del dolor. Además, estos resultados también indican que el LPS es un estímulo de gran intensidad que, aunque puede utilizarse como un control positivo de neuroinflamación, no es específico para cada tipo celular.

6.2. A diferencia de un reto inmunológico, la activación de NLRP3 inducida por la morfina o el fentanilo sucede específicamente en neuronas y astrocitos

En este estudio demostramos que las neuronas, los astrocitos y la microglía del NDR y la SGPA pueden expresar el inflamasoma NLRP3 en respuesta a un reto con LPS. Previamente, se reportó que el LPS induce la activación del inflamasoma NLRP3 en macrófagos y monocitos (Awad et al., 2017), células inmunológicas que derivan de los mismos precursores que la microglía (Ginhoux et al., 2010, 2013). Además, otras células no inmunológicas, como las neuronas, tienen la capacidad de expresar el inflamasoma NLRP3 cuando se encuentran en condiciones de daño (Debye et al., 2018; von Herrmann et al., 2018). Estos datos apoyan nuestro hallazgo en el sentido de que, bajo condiciones y estímulos específicos, las neuronas pueden responder al daño mediante la activación receptores tipos NOD y abren un campo nuevo de investigación sobre la función que el inflamasoma NLRP3 podría tener en las neuronas y las consecuencias de su activación en la neurotransmisión.

En el caso de la neuroinflamación producida por opioides, observamos que la administración repetida de morfina y fentanilo activa el inflamasoma NLRP3 en neuronas serotoninérgicas y en astrocitos, pero no en la microglía del NDR. En este mismo sentido, otro estudio demostró que la administración intratecal de 10 µg de morfina durante 7 días puede inducir la expresión de NF-κB en neuronas y astrocitos, pero no en la microglía de la médula espinal (Bai et al., 2014)- Estos datos indican que las acciones de la microglía son diferentes cuando se activa por opioides o por PAMPs como el LPS, y que los opioides, cuando se administran repetidamente, tienen sus efectos neuroinflamatorios principalmente en neuronas y astrocitos.

Nuestro grupo de investigación y otros autores han estudiado las acciones anti- y pro-inflamatorias de los opioides en varios tipos celulares dentro y fuera del SNC. En células cebadas del peritoneo de ratones, la morfina y el fentanilo tienen un efecto inmunosupresor cuando se administran de manera aguda, ya que previenen la liberación del TNF inducido por LPS (Molina-Martínez et al., 2014). Algo similar se observó en cultivos de microglía donde la morfina suprimió la liberación de

quimiocinas inducidas por la endotoxina (Hu et al., 2000). Por otra parte, se demostró que el fentanilo, administrado de manera aguda, activa NF- κ B en monocitos humanos (Compton et al., 2015). Con respecto a la administración repetida de opioides, algunas evidencias señalan que el fentanilo (4x, 60 μ g/kg, s.c., a intervalos de 15 min) activa la microglía e induce la liberación de citocinas pro-inflamatorias en ratas (Chang et al., 2018). En nuestro estudio, demostramos que el fentanilo administrado de manera repetida tiene mayor potencial que la morfina para inducir la activación del inflammasoma NLRP3 en el NDR y que este efecto se observa solamente en neuronas y astrocitos. Estos datos sugieren que los efectos pro-inflamatorios inducidos por opioides dependen del tipo celular en el cual actúen y que el fentanilo tiene un mayor efecto pro-inflamatorio dentro del SNC que el que produce la morfina.

6.3. La activación del inflammasoma NLRP3 inducido por morfina o fentanilo produce piroptosis de neuronas serotoninérgicas

La liberación de la citocina IL-1 β depende de la activación de inflammasomas y representa un factor importante en el desarrollo de tolerancia analgésica a la morfina (Eisenstein et al., 2006). Se ha demostrado que el antagonismo de ésta citocina aumenta y prolonga el efecto antinociceptivo producido por 4 mg/kg s.c. de morfina, además, la delección del receptor IL-1R, atenúa el desarrollo de tolerancia analgésica producido por la morfina (10 mg/kg s.c., durante 7 días) en ratones (Shavit et al., 2005). Para la liberación de IL-1 β , es necesaria la oligomerización de inflammasomas y la permeabilización de la membrana celular (Martín-Sánchez et al., 2016). Nuestros hallazgos mostraron que la administración repetida de morfina y fentanilo indujo la activación de caspasa-1 en los sitios donde se expresa el inflammasoma NLRP3 en el NDR. El alto grado de solapamiento entre las señales detectadas para estas dos proteínas sugiere que se produce la oligomerización del inflammasoma NLRP3 (Kelley et al., 2019). Sin embargo, se sabe que la formación del inflammasoma NLRP3 induce la liberación de mediadores inflamatorios y, dependiendo del daño, puede producir o no piroptosis por permeabilización de la membrana celular (Evavold et al., 2018; Zheng et al., 2020). Considerando esto, evaluamos la formación de poros membranales dependientes de la ruptura de la proteína GSDMD (Sborgi et al., 2016) en el NDR de

ratas tratadas repetidamente con morfina o fentanilo. Observamos un incremento en la inmunorreactividad de la porción N-terminal de la proteína GSDMD, que es la fracción de la proteína que se activa por caspasa-1 y oligomeriza para formar poros membranales (Shi et al., 2015). Estas evidencias indican que tanto la morfina como el fentanilo inducen la muerte celular por piroptosis en el NDR, en un mecanismo que requiere de la activación y oligomerización de NLRP3, pero las consecuencias de esta muerte celular no se conocen con detalle.

El proceso de muerte celular por piroptosis induce, en primer término, la liberación de citocinas que podrían tener efectos a nivel local (Evavold et al., 2018). Se ha demostrado que el incremento en la transcripción de IL-1 β en la médula espinal de ratas producido por la administración subcutánea de 10 mg/kg de morfina durante 5 días correlaciona con la pérdida de su efecto antinociceptivo (Martyn et al., 2019; Raghavendra et al., 2002). Otros autores demostraron que, en ratas, la administración de 1 μ g/kg de IL-1 β por vía intratecal (Reeve et al., 2000) o intracerebroventricular (Oka et al., 1993) produce hiperalgesia. Nuestros resultados indican que el fentanilo produce un mayor grado de piroptosis que la morfina. Existe la posibilidad de que el grado de neuroinflamación y piroptosis producido por ambos opioides esté relacionado con sus diferencias para producir hiperalgesia, pero se necesitan estudios adicionales para comprobarlo.

Una vez que se forman los poros membranales por la oligomerización de la GSDMD-N, la membrana de las células se rompe y permite la salida del contenido citoplasmático al espacio extracelular (Evavold et al., 2018). Nuestros resultados indican que la administración repetida de morfina y fentanilo inducen la formación de poros en la membrana de las neuronas serotoninérgicas del NDR. Considerando este resultado, existe la posibilidad de que la muerte de neuronas serotoninérgicas, por sí misma, contribuya a la pérdida del efecto antinociceptivo de la morfina y el fentanilo a través de la disminución en el tono serotoninérgico. En este sentido, se sabe que los agonistas μ opioides producen antinocicepción, en parte, mediante la liberación de serotonina directamente en la médula espinal y la activación de receptores inhibidores 5-HT_{1A} (Murphy et al., 2020; Qing-Ping y Nakai, 1994). Un estudio que

realizó Ozdemir y col. (2012) demostró que la inhibición de la recaptura de serotonina, evita el desarrollo de tolerancia producido por la administración repetida de 5 mg/kg de morfina en ratas. Considerando estas evidencias, la muerte de neuronas serotoninérgicas podría tener un impacto negativo en la cantidad de serotonina disponible y la magnitud de este efecto podría contribuir en el desarrollo de tolerancia antinociceptiva diferencial producida por la administración repetida de morfina o fentanilo. Nuestros resultados apoyan esta hipótesis al establecer que existe muerte de neuronas serotoninérgicas y que este efecto es mayor cuando se administra fentanilo que cuando se administra morfina.

6.4. Existe una participación diferencial de los receptores a opioides y el TLR4 en la neuroinflamación producida por morfina y fentanilo

Estudios previos reportaron que los efectos neuroinflamatorios de la morfina se deben a la activación de receptores opioides y TLR4 (Hutchinson et al., 2011), que la morfina y el fentanilo tienen afinidad por TLR4 (Hutchinson et al., 2011; Wang et al., 2012) y que las células gliales y las neuronas expresan estos receptores (Hutchinson et al., 2010; Maduna et al., 2018; Nicotra et al., 2012). Con la finalidad de determinar el mecanismo mediante el cual los opioides producen neuroinflamación en el NDR, utilizamos (-)-naloxona, un antagonista no específico de los receptores opioides (Lewanowitsch y Irvine, 2003) y (+)-naloxona, un fármaco que no tiene afinidad por los receptores opioides pero actúa como antagonista del receptor TLR4 (Hutchinson et al., 2010; Wang et al., 2016). La (-)-naloxona previno la activación de la microglía y del inflammasoma NLRP3 inducida por la administración repetida de morfina y fentanilo, demostrando la participación de los receptores opioides en este efecto. En contraste, la (+)-naloxona previno el aumento en la inmunorreactividad de GFAP inducida por ambos opioides, lo que sugiere que los receptores TLR4 están involucrados en la astrogliosis inducida por la morfina y el fentanilo.

Nuestros resultados apuntan a que existe un efecto directo de los opioides sobre sus propios receptores localizados en las células gliales y neuronales del NDR. Por otro lado, existe la posibilidad de que el receptor TLR4 se active por productos liberados

por la piroptosis producida en esta región cerebral (Nyström et al., 2013). En este sentido, se ha reportado que, en condiciones de daño al nervio, la administración crónica de morfina puede inducir la liberación de DAMPs con actividad sobre el TLR4, como HMGB1 y proteínas de choque térmico (Grace et al., 2018; Qu et al., 2017; Yu et al., 2010). El hecho de que el bloqueo de TLR4 previene la astrogliosis mientras que el bloqueo de receptores opioides evita la activación de la microglía y del inflamasoma NLRP3, sugiere que los opioides tienen un efecto diferencial al actuar en células específicas que expresan estos tipos de receptores. Se necesitan más estudios para identificar los blancos celulares y moleculares específicos que llevan a la neuroinflamación inducida por el tratamiento prolongado con opioides.

6.5. La activación de la vía receptor opioide-NF-kB-NLRP3 contribuye a la disminución del efecto antinociceptivo de la morfina y el fentanilo y al desarrollo de hiperalgesia producida por el fentanilo

Uno de los principales mecanismos involucrados en la activación del inflamasoma NLRP3 es la activación del factor de transcripción NF-kB (Jo et al., 2016; Kelley et al., 2019). Para comprobar si la activación de este factor de transcripción favorece el desarrollo de tolerancia antinociceptiva a los opioides, administramos minociclina, un antibiótico con diversas acciones farmacológicas que tiene la capacidad de bloquear la vía de señalización de NF-kB (Liu et al., 2017; Nikodemova et al., 2006). Encontramos que la morfina y el fentanilo producen menos tolerancia antinociceptiva y que el fentanilo no produce hiperalgesia en animales que recibieron minociclina a lo largo del tratamiento, lo que sugiere que la activación de NF-kB desempeña un papel fundamental en el desarrollo de tolerancia a los efectos antinociceptivos de ambos opioides. Previamente, otros autores mostraron que la minociclina y la pentoxifilina, ambos inhibidores de NF-kB, atenúan la tolerancia antinociceptiva y evitan la activación de la microglía y los astrocitos producidas por la administración de morfina en ratones (Harada et al., 2013; Mika et al., 2009). Además, varias evidencias señalan que la estimulación de receptores opioides puede inducir la actividad transcripcional de NF-kB en un entorno neuronal (Ho et al., 2009; Nennig y Schank, 2017). En específico, la administración de 10 µg i.t. de morfina durante 7 días induce

la expresión de NF-kB en neuronas y astrocitos de la médula espinal y este efecto está relacionado con el desarrollo de tolerancia antinociceptiva en ratas (Bai et al., 2014). Otro estudio señala que, en cultivos de microglía, la morfina incrementa la actividad de NF-kB inducida por LPS mediante la activación del receptor μ opioide (Gessi et al., 2016). En nuestro estudio observamos que el bloqueo de los receptores opioides evita la activación del inflamasoma NLRP3 y que la inhibición de NF-kB atenúa la tolerancia antinociceptiva, por lo que podemos sugerir que la neuroinflamación producida por la activación de NF-kB contribuye a la pérdida del efecto antinociceptivo producido por la administración repetida de morfina o fentanilo en un mecanismo que podría iniciar con la activación de los receptores opioides.

La minociclina atenúa el desarrollo de tolerancia a opioides posiblemente al bloquear la vía de NF-kB y disminuir la neuroinflamación (Hameed et al., 2010; Möller et al., 2016). Por esta razón, podemos suponer que la activación de NF-kB inducida por la administración repetida de morfina y fentanilo conduce a la activación del inflamasoma NLRP3. Para investigar una relación directa entre la activación del inflamasoma NLRP3 y el desarrollo de tolerancia antinociceptiva a opioides, administramos MCC950, un inhibidor específico de la oligomerización del inflamasoma NLRP3 (Coll et al., 2019). La administración sistémica del MCC950 previno la activación del inflamasoma NLRP3 en el NDR inducida por la administración repetida de morfina o fentanilo. Previamente se demostró que el MCC950 (100 μ M, 6h) evita el aumento en los niveles de NLRP3, ASC y caspasa-1 inducidos por morfina (200 μ M, 6h) en cultivos de microglía (Liu et al., 2020). Nuestros apoyan este estudio y aportan evidencia de que el MCC950 también previene los efectos del fentanilo y ejerce sus efectos a nivel central cuando se administra sistémicamente. Además, nuestros resultados mostraron que el MCC950 retrasó el desarrollo de tolerancia antinociceptiva inducida por la morfina y el fentanilo y evitó la hiperalgesia producida por el fentanilo. Estudios previos demostraron que la administración sistémica de MCC950 reduce la neuroinflamación en modelos animales de daño cerebral (Dempsey et al., 2017; Xu et al., 2018) y atenúa el dolor inflamatorio inducido por cáncer en ratas (Chen et al., 2019). También, el

MCC950 ha sido efectivo en reducir la hiperalgesia en ratones inducida por LPS y asociada al aumento en la expresión de NF-kB (Dolunay et al., 2017). Estos datos sugieren que existe una estrecha relación entre la activación del inflamasoma NLRP3 y el aumento de algunos procesos nociceptivos como el desarrollo de tolerancia antinociceptiva y la hiperalgesia inducida por opioides.

6.6. Mecanismos y vías adicionales que podrían estar involucrados en la activación del inflamasoma NLRP3 producida por la administración repetida de morfina o fentanilo

Existen mecanismos y vías de señalización adicionales activadas por los opioides que, en conjunto, podrían contribuir a los efectos que hemos analizado a lo largo de este estudio. Sin embargo, hay pocos estudios que exploren estas aproximaciones. A continuación, se discute la posible participación de estos mecanismos en los efectos nociceptivos y neuroinflamatorios producidos por la morfina o el fentanilo.

6.6.1. Cambios en la vía de señalización canónica de los receptores opioides

Algunos efectos de la activación de la vía de señalización canónica de los receptores opioides podrían contribuir a la activación del inflamasoma NLRP3. Se sabe que la administración aguda de opioides activa los canales GIRK en las neuronas produciendo la salida transitoria de potasio, lo que contribuye a la hiperpolarización celular (Chan et al., 2017; Lüscher y Slesinger, 2010). Existe evidencia de que, en macrófagos y monocitos, la disminución en los niveles intracelulares de potasio es un factor necesario en la activación del inflamasoma NLRP3 (Jo et al., 2016). Ya que los opioides ejercen su efecto antinociceptivo, en parte, mediante la salida de potasio de las neuronas, es posible que este efecto contribuya a la activación del inflamasoma NLRP3 principalmente en este tipo celular. Sin embargo, en nuestro estudio también observamos la activación de NLRP3 en astrocitos, por lo que es necesario realizar estudios en cada tipo celular para determinar los cambios moleculares específicos que llevan a la activación del inflamasoma NLRP3.

Las diferencias entre la morfina y el fentanilo para activar al inflamasoma NLRP3 neuronal podrían deberse, entre otras cosas, a que el fentanilo tiene mayor capacidad que la morfina para internalizar al receptor μ opioide (Bao et al., 2018). Se sabe que el transporte de receptores membranales a endosomas puede inducir su reciclamiento o su degradación lisosomal (van Ijzendoorn, 2006). Un estudio de nuestro laboratorio mostró que, en células cebadas derivadas de la médula ósea, la morfina y el fentanilo producen la asociación del receptor μ opioide con diferentes tipos de endosomas. El fentanilo induce el tráfico del receptor μ opioide en endosomas tardíos y en endosomas de reciclamiento lento. Por su parte, la morfina induce una menor asociación entre el receptor μ opioide y los endosomas tardíos (Martínez-Cuevas, 2019, tesis de maestría). Estos datos sugieren que la morfina podría tener menor capacidad que el fentanilo para inducir el transporte de los receptores opioides a lisosomas. En las neuronas, los lisosomas tienen la función de disminuir los receptores membranales para atenuar la respuesta de los ligandos extracelulares (Gindhart y Weber, 2009). En este sentido, se sabe que diversos activadores del inflamasoma NLRP3 inducen la captura de partículas extracelulares en endosomas y su transporte a lisosomas. La desregulación lisosomal produce su ruptura y la liberación de catepsina B, una proteína que interactúa con el NLRP3 para activar a la caspasa-1 (Land, 2018). Además, existe evidencia de que los receptores tipo NOD están asociados a redes endosomales que transportan ligandos extracelulares al interior de las células donde pueden activar a los inflamasomas (Bonham y Kagan, 2014). Aunque este mecanismo podría explicar las diferencias entre la morfina y el fentanilo para activar al inflamasoma NLRP3, es necesario estudiar el tráfico vesicular del receptor μ opioide y del inflamasoma NLRP3 en las neuronas del NDR y su impacto en la inducción de piroptosis.

En este trabajo proponemos utilizar cultivos primarios de neuronas, microglía y astrocitos para explorar mecanismos específicos de neuroinflamación producidos en cada tipo celular. En el apéndice de esta tesis se explica el método estandarizado para el aislamiento de estos tipos celulares.

6.6.2. Posible contribución de la hipoxia en la neuroinflamación producida por opioides

La depresión respiratoria es uno de los síntomas más peligrosos producidos por la intoxicación con opioides ya que puede llevar a la muerte de los consumidores (Algera et al., 2019). En modelos animales se determinó, mediante amperometría de alta velocidad, que la depresión respiratoria inducida por opioides produce hipoxia cerebral generalizada y que el fentanilo es más potente que la morfina y otros opioides para producir este efecto (Kiyatkin, 2019; Solis et al., 2018). Un mecanismo de regulación de la hipoxia es el aumento en la expresión del factor inducible de hipoxia 1 (HIF-1 por sus siglas en inglés). Este factor de transcripción se activa cuando hay bajas concentraciones de oxígeno e incrementa la expresión de genes involucrados en la reparación del daño cerebral (Benizri et al., 2008). Sin embargo, se ha reportado que, en condiciones de baja oxigenación, el HIF-1 también promueve la expresión de genes que inducen varios tipos de muerte celular (Greijer y van der Wall, 2004; Jiang et al., 2018; Saikumar et al., 1998). Se ha propuesto que el aumento en los niveles de ROS puede inducir la acumulación de HIF-1 y conducir a la muerte celular por piroptosis dependiente de NLRP3 (Jiang et al., 2018). Aunque no está claro si HIF-1 está involucrado en la activación del inflammasoma NLRP3 inducido por opioides, el hecho de que la morfina y el fentanilo generen hipoxia cerebral sugiere la participación de este factor de transcripción en la piroptosis neuronal que producen ambos opioides. El marcaje de células aisladas o de los tejidos cerebrales con pimonidazol, que sirve para detectar células hipóxicas, puede ser una herramienta útil para determinar si la hipoxia producida por la morfina o el fentanilo participa en la activación del inflammasoma NLRP3.

6.6.3. Participación de la neurotransmisión serotoninérgica en los efectos neuroinflamatorios producidos por opioides

En este estudio observamos que el fentanilo tiene mayor capacidad que la morfina para inducir piroptosis neuronal. Este efecto se observó principalmente en el NDR, una región que contiene aproximadamente el 90 % de las neuronas serotoninérgicas

dentro del SNC (Baker et al., 1991). Como discutimos previamente, la disminución en el tono serotoninérgico producido por la muerte de neuronas del NDR podría contribuir al desarrollo de tolerancia a los efectos antinociceptivos de los opioides. Sin embargo, la muerte neuronal la observamos después de la administración repetida de morfina o fentanilo. No sabemos si la administración aguda de opioides, o por periodos más cortos de tiempo, podría modificar la liberación de serotonina ni el papel de la activación del inflammasoma NLRP3 neuronal en estos efectos.

En observaciones experimentales detectamos algunas conductas que podrían deberse al aumento en la liberación de serotonina. En específico, el fentanilo indujo conductas como: masticación, hiperactividad, movimientos ondulatorios de la cabeza, rigidez, entre otras (datos no mostrados). Se ha reportado que estas conductas podrían deberse a la inducción de un síndrome serotoninérgico en ratas (Haberzettl et al., 2013). En nuestro caso, estas conductas se presentaron después de tres días de administración y disminuyeron a los 5 días, aproximadamente. Algunas ratas administradas con morfina también presentaron estos signos, pero con menor intensidad. Se ha reportado que el fentanilo, a dosis clínicamente relevantes, puede inducir síndrome serotoninérgico en pacientes tratados con inhibidores de la recaptura de serotonina (Greenier et al., 2014; Koury et al., 2015). Por otra parte, en modelos animales, el fentanilo induce la liberación de serotonina cuando se administra directamente en el NDR de ratones (Tao et al., 2003) y aumenta las conductas tipo síndrome serotoninérgico en ratas (Kitamura et al., 2016). Estos datos sugieren que el fentanilo es un fármaco que puede modificar la neurotransmisión serotoninérgica al actuar directamente en las neuronas del NDR. Sin embargo, se necesitan estudios más enfocados para comprobar el curso temporal de liberación de serotonina inducida por la administración repetida de fentanilo que conduzca al desarrollo transitorio de síndrome serotoninérgico. También, es necesario determinar si la activación del inflammasoma NLRP3 contribuye los efectos serotoninérgicos observados en nuestro estudio.

En la figura 25 se presentan los principales resultados de este proyecto, donde se muestra que las diferencias entre la morfina y el fentanilo para desarrollar tolerancia antinociceptiva o hiperalgesia podrían estar relacionados con su capacidad para inducir piroptosis en el NDR, donde los efectos del fentanilo son más evidentes.

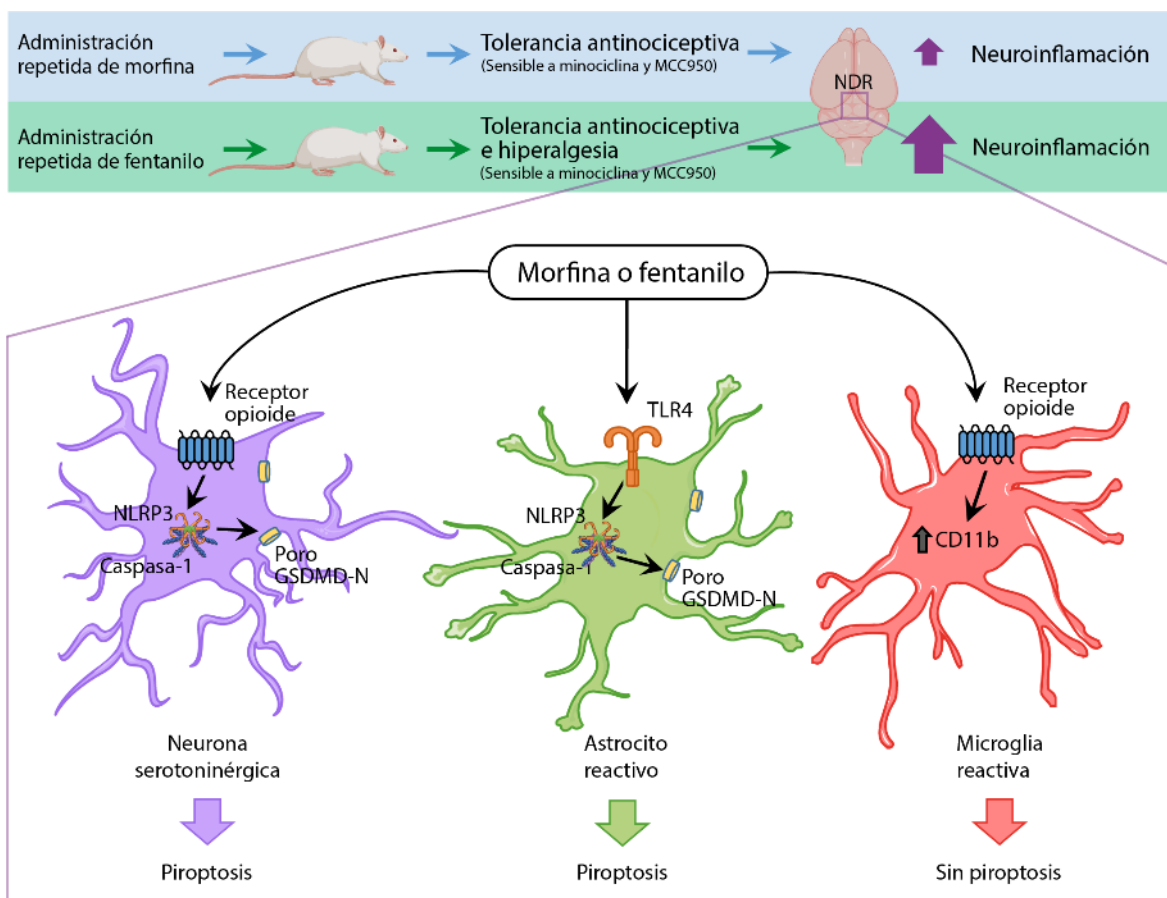


Figura 25. Cambios producidos en el efecto antinociceptivo y neuroinflamación producidos por la administración repetida de morfina o fentanilo. Después de la administración repetida de morfina o fentanilo, la activación de los receptores opioides en las neuronas serotoninérgicas o los receptores TLR4 en los astrocitos conduce a la oligomerización del inflamasoma NLRP3, la maduración de la caspasa-1 y la formación de poros de membrana dependiente de GSDMD. Estos eventos celulares conducen a la muerte de las células por piroptosis y al incremento en la activación microglial.

7. Conclusiones

- La administración repetida de fentanilo promueve una mayor activación del inflamasoma NLRP3 y piroptosis de neuronas serotoninérgicas que la morfina, por lo que este opioide puede provocar más efectos adversos relacionados con la neuroinflamación.
- El NDR es una región susceptible a la neuroinflamación producida por los opioides donde las principales células afectadas son las neuronas y los astrocitos debido la activación de los receptores opioides y TLR4, respectivamente.
- La morfina y el fentanilo producen diferentes grados de tolerancia a sus efectos antinociceptivos, los cuales se pueden evitar al disminuir sus efectos neuroinflamatorios, lo que indica que estos efectos podrían estar relacionados.

8. Perspectivas

- Determinar, en cultivos aislados de microglía, astrocitos y neuronas, las vías de señalización involucradas en la activación del inflamasoma NLRP3 inducida por opioides. Esta aproximación nos permitiría conocer blancos moleculares específicos en cada tipo celular y nos ayudaría a entender más la relación entre la neuroinflamación y los efectos no deseados de los opioides.
- Estudiar si la activación del inflamasoma NLRP3 neuronal inducida por opioides participa en el desarrollo de síndrome serotoninérgico, en la toxicidad serotoninérgica y en el desarrollo de trastornos involucrados con cambios en la transmisión serotoninérgica, por ejemplo, la depresión.
- Comprobar si la disminución en los niveles de oxígeno inducida por opioides participa en la activación del inflamasoma NLRP3 mediante el marcaje de células o tejidos hipóxicos con compuestos específicos, como el pimonidazol (hypoxiprobe).
- Ya que los opioides inducen muerte neuronal dependiente de NLRP3, es pertinente estudiar los mecanismos mediante los cuales la liberación de DAMPs podría sensibilizar a las neuronas glutamatérgicas que facilitan la transmisión del dolor.
- Debido a que existen diferencias entre la morfina y el fentanilo para internalizar a su receptor en endosomas y considerando que se ha reportado una relación entre la formación de endosomas y la activación de NLRP3, sería de interés estudiar si el tráfico vesicular del receptor μ opioide está involucrado en las diferencias que tienen los opioides para producir sus efectos neuroinflamatorios.
- Estudiar a nivel clínico la eficacia de la minociclina y de otros inhibidores de la piroptosis, en el desarrollo de tolerancia antinociceptiva y de otros efectos no deseados producidos por los opioides.

9. Bibliografía

- Aaron, J.S., Taylor, A.B., Chew, T.L., 2018. Image co-localization - co-occurrence versus correlation. *J. Cell Sci.* 131. <https://doi.org/10.1242/jcs.211847>
- Akerman, S., Holland, P.R., Goadsby, P.J., 2011. Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 570–584. <https://doi.org/10.1038/nrn3057>
- Akil, H., Watson, S.J., Young, E., Lewis, M.E., Khachaturian, H., Walker, J.M., 1984. Endogenous opioids: biology and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 7, 223–255. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.07.030184.001255>
- Al-Hasani, R., Bruchas, M.R., 2011. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signalling and behaviour. *Anesthesiology* 115, 1363–1381. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318238bba6>.Molecular
- Al-Hashimi, M., Scott, S.W.M., Thompson, J.P., Lambert, D.G., 2013. Opioids and immune modulation: more questions than answers. *Br. J. Anaesth.* 111, 80–88. <https://doi.org/10.1093/bja/aet153>
- Algera, M.H., Kamp, J., van der Schrier, R., van Velzen, M., Niesters, M., Aarts, L., Dahan, A., Olofsen, E., 2019. Opioid-induced respiratory depression in humans: a review of pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of reversal. *Br. J. Anaesth.* 122, e168–e179. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2018.12.023>
- Allouche, S., Noble, F., Marie, N., 2014. Opioid receptor desensitization: mechanisms and its link to tolerance. *Front. Pharmacol.* 5, 280. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00280>
- Anderson, C.M., Nedergaard, M., 2003. Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation. *Trends Neurosci.* 26, 340–344. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00141-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00141-3)
- Awad, F., Assrawi, E., Jumeau, C., Georgin-Lavialle, S., Cobret, L., Duquesnoy, P., Piterboth, W., Thomas, L., Stankovic-Stojanovic, K., Louvrier, C., Giurgea, I., Grateau, G., Amselem, S., Karabina, S.-A., 2017. Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One* 12, e0175336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175336>
- Bai, L., Zhai, C., Han, K., Li, Z., Qian, J., Jing, Y., Zhang, W., Xu, J.T., 2014. Toll-like receptor 4-mediated nuclear factor- κ B activation in spinal cord contributes to chronic morphine-induced analgesic tolerance and hyperalgesia in rats. *Neurosci. Bull.* 30, 936–948. <https://doi.org/10.1007/s12264-014-1483-7>

- Bajic, D., Commons, K.G., Soriano, S.G., 2013. Morphine-enhanced apoptosis in selective brain regions of neonatal rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 31, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.02.009>
- Baker, K.G., Halliday, G.M., Hornung, J.P., Geffen, L.B., Cotton, R.G., Törk, I., 1991. Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 42, 757–75. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90043-n](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90043-n)
- Bannister, K., Dickenson, A.H., 2020. Central nervous system targets: supraspinal mechanisms of analgesia. *Neurotherapeutics*. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00887-6>
- Bannister, K., Dickenson, A.H., 2016. What do monoamines do in pain modulation? *Curr. Opin. Support. Palliat. Care* 10, 143–8. <https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000207>
- Bao, F., Li, C.-L., Chen, X.-Q., Lu, Y.-J., Bao, L., Zhang, X., 2018. Clinical opioids differentially induce co-internalization of μ - and δ -opioid receptors. *Mol. Pain* 14, 174480691876949. <https://doi.org/10.1177/1744806918769492>
- Baral, P., Udit, S., Chiu, I.M., 2019. Pain and immunity: implications for host defence. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 433–447. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0147-2>
- Bardin, L., Colpaert, F.C., 2004. Role of spinal 5-HT_{1A} receptors in morphine analgesia and tolerance in rats. *Eur. J. Pain* 8, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2003.09.002>
- Becerra-Calixto, A., Cardona-Gómez, G.P., 2017. The role of astrocytes in neuroprotection after brain stroke: Potential in cell therapy. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 1–12. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00088>
- Benarroch, E.E., 2012. Periaqueductal gray: an interface for behavioral control. *Neurology* 78, 210–7. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31823fcdee>
- Benarroch, E.E., 2008. Descending monoaminergic pain modulation: Bidirectional control and clinical relevance. *Neurology* 71, 217–221. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000318225.51122.63>
- Benizri, E., Ginouvès, A., Berra, E., 2008. The magic of the hypoxia-signaling cascade. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1133–49. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7472-0>
- Bergsbaken, T., Fink, S.L., Cookson, B.T., 2009. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 99–109. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>

- Beynon, S.B., Walker, F.R., 2012. Microglial activation in the injured and healthy brain: what are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology. *Neuroscience* 225, 162–71. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.029>
- Bobbeck, E.N., Haseman, R.A., Hong, D., Ingram, S.L., Morgan, M.M., 2012. Differential development of antinociceptive tolerance to morphine and fentanyl is not linked to efficacy in the ventrolateral periaqueductal gray of the rat. *J. Pain* 13, 799–807. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2012.05.005>
- Bologna, Z., Teoh, J.P., Bayoumi, A.S., Tang, Y., Kim, I.M., 2017. Biased G protein-coupled receptor signaling: New player in modulating physiology and pathology. *Biomol. Ther.* 25, 12–25. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2016.165>
- Bonham, K.S., Kagan, J.C., 2014. Endosomes as platforms for NOD-like receptor signaling. *Cell Host Microbe* 15, 523–525. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.05.001>
- Cai, Y., Kong, H., Pan, Y.B., Jiang, L., Pan, X.X., Hu, L., Qian, Y.N., Jiang, C.Y., Liu, W.T., 2016. Procyanidins alleviates morphine tolerance by inhibiting activation of NLRP3 inflammasome in microglia. *J. Neuroinflammation* 13, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0520-z>
- Célèrier, E., Rivat, C., Jun, Y., Laulin, J.P., Larcher, A., Reynier, P., Simonnet, G., 2000. Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: Preventive effect of ketamine. *Anesthesiology* 92, 465–472. <https://doi.org/10.1097/0000542-200002000-00029>
- Cesselin, F., 1995. Opioid and anti-opioid peptides. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 9, 409–433. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.1995.tb00517.x>
- Chaboub, L.S., Deneen, B., 2012. Developmental origins of astrocyte heterogeneity: the final frontier of CNS development. *Dev. Neurosci.* 34, 379–88. <https://doi.org/10.1159/000343723>
- Chan, H.C.S., McCarthy, D., Li, J., Palczewski, K., Yuan, S., 2017. Designing Safer Analgesics via μ -Opioid Receptor Pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 1016–1037. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.08.004>
- Chang, L., Ye, F., Luo, Q., Tao, Y., Shu, H., 2018. Increased hyperalgesia and proinflammatory cytokines in the spinal cord and dorsal root ganglion after surgery and/or fentanyl administration in rats. *Anesth. Analg.* 126, 289–297. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002601>

- Chaves, C., Remiao, F., Cisternino, S., Decleves, X., 2017. Opioids and the blood-brain barrier: a dynamic interaction with consequences on drug disposition in brain. *Curr. Neuropharmacol.* 15. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170504095823>
- Chen, S.-P., Zhou, Y.-Q., Wang, X.-M., Sun, J., Cao, F., HaiSam, S., Ye, D.-W., Tian, Y.-K., 2019. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome as a potential target for cancer-induced bone pain. *Pharmacol. Res.* 147, 104339. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104339>
- Coll, R.C., Hill, J.R., Day, C.J., Zamoshnikova, A., Boucher, D., Massey, N.L., Chitty, J.L., Fraser, J.A., Jennings, M.P., Robertson, A.A.B., Schroder, K., 2019. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nat. Chem. Biol.* 15, 556–559. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0277-7>
- Coll, R.C., Robertson, A.A.B., Chae, J.J., Higgins, S.C., Muñoz-Planillo, R., Inserra, M.C., Vetter, I., Dungan, L.S., Monks, B.G., Stutz, A., Croker, D.E., Butler, M.S., Haneklaus, M., Sutton, C.E., Núñez, G., Latz, E., Kastner, D.L., Mills, K.H.G., Masters, S.L., Schroder, K., Cooper, M.A., O’Neill, L.A.J., 2015. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.* 21, 248–255. <https://doi.org/10.1038/nm.3806>
- Colovic, M., Caccia, S., 2003. Liquid chromatographic determination of minocycline in brain-to-plasma distribution studies in the rat. *J. Chromatogr. B* 791, 337–343. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00247-2](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00247-2)
- Coluzzi, P.H., 1998. Sublingual morphine: efficacy reviewed. *J. Pain Symptom Manage.* 16, 184–92. [https://doi.org/10.1016/s0885-3924\(98\)00046-3](https://doi.org/10.1016/s0885-3924(98)00046-3)
- Compton, P., Griffis, C., Breen, E.C., Torrington, M., Sadakane, R., Tefera, E., Irwin, M.R., 2015. Opioid treatment of experimental pain activates nuclear factor- κ B. *J. Opioid Manag.* 11, 115–125. <https://doi.org/10.5055/jom.2015.0261>
- Cruz, S.L., Perez-García, I.P., Carranza-Aguilar, C.J., 2020. El tratamiento del dolor y los opioides. *Ciencia* 71, 52–61.
- Debye, B., Schmölling, L., Zhou, L., Rune, G., Beyer, C., Johann, S., 2018. Neurodegeneration and NLRP3 inflammasome expression in the anterior thalamus of SOD1(G93A) ALS mice. *Brain Pathol.* 28, 14–27. <https://doi.org/10.1111/bpa.12467>
- Dempsey, C., Rubio Araiz, A., Bryson, K.J., Finucane, O., Larkin, C., Mills, E.L., Robertson, A.A.B., Cooper, M.A., O’Neill, L.A.J., Lynch, M.A., 2017. Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid- β and cognitive function in APP/PS1 mice. *Brain. Behav. Immun.* 61, 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.12.014>

- DePriest, A.Z., Puet, B.L., Holt, A.C., Roberts, A., Cone, E.J., 2015. Metabolism and Disposition of Prescription Opioids: A Review. *Forensic Sci. Rev.* 27, 115–45.
- DiSabato, D.J., Quan, N., Godbout, J.P., 2016. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J. Neurochem.* 139, 136–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>
- Dolunay, A., Senol, S.P., Temiz-Resitoglu, M., Guden, D.S., Sari, A.N., Sahan-Firat, S., Tunctan, B., 2017. Inhibition of NLRP3 inflammasome prevents LPS-induced inflammatory hyperalgesia in mice: contribution of NF- κ B, caspase-1/11, ASC, NOX, and NOS isoforms. *Inflammation* 40, 366–386. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0483-3>
- Doyle, H.H., Eidson, L.N., Sinkiewicz, D.M., Murphy, A.Z., 2017. Sex differences in microglia activity within the periaqueductal gray of the rat: A potential mechanism driving the dimorphic effects of morphine. *J. Neurosci.* 37, 3202–3214. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2906-16.2017>
- Dumas, E.O., Pollack, G.M., 2008. Opioid tolerance development: A pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective. *AAPS J.* 10, 537–551. <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9056-1>
- Eidson, L.N., Murphy, A.Z., 2019. Inflammatory mediators of opioid tolerance: Implications for dependency and addiction. *Peptides* 115, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.01.003>
- Eisenstein, T.K., Rahim, R.T., Feng, P., Thingalaya, N.K., Meissler, J.J., 2006. Effects of opioid tolerance and withdrawal on the immune system. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 1, 237–249. <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9019-1>
- Ellis, A., Grace, P.M., Wieseler, J., Favret, J., Springer, K., Skarda, B., Ayala, M., Hutchinson, M.R., Falci, S., Rice, K.C., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2016. Morphine amplifies mechanical allodynia via TLR4 in a rat model of spinal cord injury. *Brain. Behav. Immun.* 58, 348–356. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.08.004>
- Evavold, C.L., Ruan, J., Tan, Y., Xia, S., Wu, H., Kagan, J.C., 2018. The pore-forming protein gasdermin D regulates interleukin-1 secretion from living macrophages. *Immunity* 48, 35–44.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.013>
- Fields, H., 2004. State-dependent opioid control of pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 565–575. <https://doi.org/10.1038/nrn1431>
- Fukagawa, H., Koyama, T., Kakuyama, M., Fukuda, K., 2013. Microglial activation involved in morphine tolerance is not mediated by toll-like receptor 4. *J. Anesth.* 27, 93–97. <https://doi.org/10.1007/s00540-012-1469-4>

- Gao, Z., Zhu, Q., Zhang, Y., Zhao, Y., Cai, L., Shields, C.B., Cai, J., 2013. Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. *Mol. Neurobiol.* 48, 690–701. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8460-4>
- Gessi, S., Borea, P.A., Bencivenni, S., Fazzi, D., Varani, K., Merighi, S., 2016. The activation of μ -opioid receptor potentiates LPS-induced NF- κ B promoting an inflammatory phenotype in microglia. *FEBS Lett.* 590, 2813–2826. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12313>
- Gindhart, J.G., Weber, K.P., 2009. Lysosome and Endosome Organization and Transport in Neurons 581–587. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00733-6>
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., Merad, M., 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–5. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., Huber, T., 2013. Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 45. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00045>
- Ginhoux, F., Prinz, M., 2015. Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a020537. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020537>
- Gonçalves Dos Santos, G., Delay, L., Yaksh, T.L., Corr, M., 2019. Neuraxial cytokines in pain states. *Front. Immunol.* 10, 3061. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03061>
- Grace, P.M., Hutchinson, M.R., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2014. Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 217–231. <https://doi.org/10.1038/nri3621>
- Grace, P.M., Strand, K.A., Galer, E.L., Rice, K.C., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2018. Protraction of neuropathic pain by morphine is mediated by spinal damage associated molecular patterns (DAMPs) in male rats. *Brain. Behav. Immun.* 72, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.08.018>
- Grace, P.M., Strand, K.A., Galer, E.L., Urban, D.J., Wang, X., Baratta, M. V., Fabisiak, T.J., Anderson, N.D., Cheng, K., Greene, L.I., Berkelhammer, D., Zhang, Y., Ellis, A.L., Yin, H.H., Campeau, S., Ricei, K.C., Roth, B.L., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2016. Morphine paradoxically prolongs neuropathic pain in rats by amplifying spinal NLRP3 inflammasome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E3441–E3450. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602070113>

- Grauer, S.M., Tao, R., Auerbach, S.B., 1992. Morphine induces an increase in extracellular serotonin in the rat diencephalon. *Brain Res.* 599, 277–282. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90402-U](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90402-U)
- Greenier, E., Lukyanova, V., Reede, L., 2014. Serotonin syndrome: Fentanyl and selective serotonin reuptake inhibitor interactions. *AANA J.* 82, 340–345.
- Greijer, A.E., van der Wall, E., 2004. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J. Clin. Pathol.* 57, 1009–14. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.015032>
- Guo, H., Callaway, J.B., Ting, J.P.Y., 2015. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* 21, 677–687. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>
- Gustafson-Vickers, S.L., Van Lu, B., Lai, A.Y., Todd, K.G., Ballanyi, K., Smith, P.A., 2008. Long-term actions of interleukin-1 β on delay and tonic firing neurons in rat superficial dorsal horn and their relevance to central sensitization. *Mol. Pain* 4, 1744-8069-4–63. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-63>
- Haberzettl, R., Bert, B., Fink, H., Fox, M.A., 2013. Animal models of the serotonin syndrome: A systematic review. *Behav. Brain Res.* 256, 328–345. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.08.045>
- Haleem, D.J., 2018. Serotonin-1A receptor dependent modulation of pain and reward for improving therapy of chronic pain. *Pharmacol. Res.* 134, 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.06.030>
- Hameed, H., Hameed, M., Christo, P.J., 2010. The effect of morphine on glial cells as a potential therapeutic target for pharmacological development of analgesic drugs. *Curr. Pain Headache Rep.* 14, 96–104. <https://doi.org/10.1007/s11916-010-0093-y>
- Harada, S., Nakamoto, K., Tokuyama, S., 2013. The involvement of midbrain astrocyte in the development of morphine tolerance. *Life Sci.* 93, 573–578. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.009>
- Hayhurst, C.J., Durieux, M.E., 2016. Differential opioid tolerance and opioid-induced hyperalgesia: a clinical reality. *Anesthesiology* 124, 483–488. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000963>
- Henry, C.J., Huang, Y., Wynne, A., Hanke, M., Himler, J., Bailey, M.T., Sheridan, J.F., Godbout, J.P., 2008. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *J. Neuroinflammation.* <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-15>

- Ho, M.K.C., Su, Y., Yeung, W.W.S., Wong, Y.H., 2009. Regulation of transcription factors by heterotrimeric G proteins. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2, 19–31.
<https://doi.org/10.2174/1874467210902010019>
- Hu, S., Chao, C.C., Hegg, C.C., Thayer, S., Peterson, P.K., 2000. Morphine inhibits human microglial cell production of, and migration towards, RANTES. *J. Psychopharmacol.* 14, 238–243.
<https://doi.org/10.1177/026988110001400307>
- Hu, S., Sheng, W.S., Lokensgard, J.R., Peterson, P.K., 2002. Morphine induces apoptosis of human microglia and neurons. *Neuropharmacology* 42, 829–836.
[https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00030-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00030-8)
- Hutchinson, M.R., Shavit, Y., Grace, P.M., Rice, K.C., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2011. Exploring the neuroimmunopharmacology of opioids: An integrative review of mechanisms of central immune signaling and their implications for opioid analgesia. *Pharmacol. Rev.* 63, 772–810. <https://doi.org/10.1124/pr.110.004135>
- Hutchinson, M.R., Zhang, Y., Shridhar, M., Evans, J.H., Buchanan, M.M., Zhao, T.X., Slivka, P.F., Coats, B.D., Rezvani, N., Wieseler, J., Hughes, T.S., Landgraf, K.E., Chan, S., Fong, S., Phipps, S., Falke, J.J., Leinwand, L.A., Maier, S.F., Yin, H., Rice, K.C., Watkins, L.R., 2010. Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain. Behav. Immun.* 24, 83–95.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.08.004>
- Ji, R.R., Nackley, A., Huh, Y., Terrando, N., Maixner, W., 2018. Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain, *Anesthesiology*.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000002130>
- Jiang, Q., Stone, C., Geng, X., Ding, Y., 2018. Hypoxia-inducible factor-1 α and RIP3 triggers NLRP3 inflammasome in ischemic stroke. *Brain Circ.* 4, 191.
https://doi.org/10.4103/bc.bc_35_18
- Jin, H.S., Park, J.K., Jo, E.K., 2014. Toll-like receptors and NOD-like receptors in innate immune defense during pathogenic infection. *J. Bacteriol. Virol.* 44, 215–225.
<https://doi.org/10.4167/jbv.2014.44.3.215>
- Jo, E.-K., Kim, J.K., Shin, D.-M., Sasakawa, C., 2016. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell. Mol. Immunol.* 13, 148–59.
<https://doi.org/10.1038/cmi.2015.95>
- Kandasamy, J., Carlo, W.A., 2017. Pharmacologic therapies IV: other medications, en: *Assisted Ventilation of the Neonate*. Elsevier, pp. 366-379.e5.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39006-4.00034-X>

- Kawamata, T., Omote, K., Toriyabe, M., Kawamata, M., Namiki, A., 2002. Intracerebroventricular morphine produces antinociception by evoking gamma-aminobutyric acid release through activation of 5-hydroxytryptamine 3 receptors in the spinal cord. *Anesthesiology* 96, 1175–82. <https://doi.org/10.1097/00000542-200205000-00022>
- Kelley, N., Jeltama, D., Duan, Y., He, Y., 2019. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3328. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
- Khan, S.M., Sleno, R., Gora, S., Zylbergold, P., Laverdure, J.-P., Labbé, J.-C., Miller, G.J., Hébert, T.E., 2013. The expanding roles of G $\beta\gamma$ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacol. Rev.* 65, 545–77. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005603>
- Kigerl, K.A., de Rivero Vaccari, J.P., Dietrich, W.D., Popovich, P.G., Keane, R.W., 2014. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp. Neurol.* 258, 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.01.001>
- Kim, J.K., Jin, H.S., Suh, H.W., Jo, E.K., 2017. Negative regulators and their mechanisms in NLRP3 inflammasome activation and signaling. *Immunol. Cell Biol.* 95, 584–592. <https://doi.org/10.1038/icb.2017.23>
- Kimelberg, H.K., Nedergaard, M., 2010. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 7, 338–353. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.07.006>
- Kitamura, S., Kawano, T., Kaminaga, S., Yamanaka, D., Tateiwa, H., Locatelli, F.M., Yokoyama, M., 2016. Effects of fentanyl on serotonin syndrome-like behaviors in rats. *J. Anesth.* 30, 178–182. <https://doi.org/10.1007/s00540-015-2092-y>
- Kiyatkin, E.A., 2019. Respiratory depression and brain hypoxia induced by opioid drugs: Morphine, oxycodone, heroin, and fentanyl. *Neuropharmacology* 151, 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.02.008>
- Koob, G.F., Arends, M.A., Le Moal, M., 2014. Opioids, en: *Drugs, Addiction, and the Brain*. Elsevier, pp. 133–171. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386937-1.00005-2>
- Korzhevskii, D.E., Kirik, O. V., 2016. Brain microglia and microglial markers. *Neurosci. Behav. Physiol.* 46, 284–290. <https://doi.org/10.1007/s11055-016-0231-z>
- Koury, K.M., Tsui, B., Gulur, P., 2015. Incidence of serotonin syndrome in patients treated with fentanyl on serotonergic agents. *Pain Physician* 18, E27–30.
- Kumar, V., 2019. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *J. Neuroimmunol.* 332, 16–30. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.03.012>

- Lacagnina, M.J., Rivera, P.D., Bilbo, S.D., 2017. Glial and neuroimmune mechanisms as critical modulators of drug use and abuse. *Neuropsychopharmacology* 42, 156–177. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.121>
- Lamkanfi, M., Dixit, V.M., 2010. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe* 8, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.007>
- Land, W.G., 2018. About DAMPs, PAMPs, and MAMPs, en: *Damage-Associated Molecular Patterns in Human Diseases*. Springer International Publishing, Cham, pp. 191–217. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78655-1_11
- Larhammar, D., Bergqvist, C., Sundström, G., 2015. Ancestral vertebrate complexity of the opioid system. *Vitam. Horm.* 97, 95–122. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2014.11.001>
- Latremoliere, A., Woolf, C.J., 2009. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J. Pain* 10, 895–926. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.06.012>
- Lewanowitsch, T., Irvine, R.J., 2003. Naloxone and its quaternary derivative, naloxone methiodide, have differing affinities for μ , δ , and κ opioid receptors in mouse brain homogenates. *Brain Res.* 964, 302–305. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04117-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04117-3)
- Li, Y., Winzer, T., He, Z., Graham, I.A., 2020. Over 100 million years of enzyme evolution underpinning the production of morphine in the papaveraceae family of flowering plants. *Plant Commun.* 1, 100029. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100029>
- Lin, C.P., Lu, D.H., 2018. Role of neuroinflammation in opioid tolerance: Translational evidence from human-to-rodent studies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1099, 125–139. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1756-9_11
- Liu, Q., Su, L.-Y., Sun, C., Jiao, L., Miao, Y., Xu, M., Luo, R., Zuo, X., Zhou, R., Zheng, P., Xiong, W., Xue, T., Yao, Y.-G., 2020. Melatonin alleviates morphine analgesic tolerance in mice by decreasing NLRP3 inflammasome activation. *Redox Biol.* 34, 101560. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101560>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.-C., 2017. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2, 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Liu, Z.-Y., Zhuang, D.-B., Lunderberg, T., Yu, L.-C., 2002. Involvement of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in the descending anti-nociceptive pathway from periaqueductal gray to the spinal dorsal horn in intact rats, rats with nerve injury and rats with inflammation. *Neuroscience* 112, 399–407. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00038-6)

- Liu, Z., Wang, C., Rathkey, J.K., Yang, J., Dubyak, G.R., Abbott, D.W., Xiao, T.S., 2018. Structures of the gasdermin D C-terminal domains reveal mechanisms of autoinhibition. *Structure* 26, 778-784.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.03.002>
- Lüscher, C., Slesinger, P. a, 2010. Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 301–15. <https://doi.org/10.1038/nrn2834>
- Lyons, P.J., Rivosecchi, R.M., Nery, J.P., Kane-Gill, S.L., 2015. Fentanyl-induced hyperalgesia in acute pain management. *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.* 29, 153–160. <https://doi.org/10.3109/15360288.2015.1035835>
- MacKenzie, M., Zed, P.J., Ensom, M.H.H., 2016. Opioid pharmacokinetics-pharmacodynamics: clinical implications in acute pain management in trauma. *Ann. Pharmacother.* 50, 209–18. <https://doi.org/10.1177/1060028015625659>
- Maduna, T., Audouard, E., Dembélé, D., Mouzaoui, N., Reiss, D., Massotte, D., Gaveriaux-Ruff, C., 2018. Microglia express mu opioid receptor: insights from transcriptomics and fluorescent reporter mice. *Front. psychiatry* 9, 726. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00726>
- Malik, A., Kanneganti, T.D., 2017. Inflammasome activation and assembly at a glance. *J. Cell Sci.* 130, 3955–3963. <https://doi.org/10.1242/jcs.207365>
- Mao, J., Price, D.D., Mayer, D.J., 1995. Mechanisms of hyperalgesian and morphine tolerance: a current view of their possible interactions. *Pain* 62, 259–274. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(95\)00073-2](https://doi.org/10.1016/0304-3959(95)00073-2)
- Mao, X., Sarkar, S., Chang, S.L., 2013. Involvement of the NLRP3 inflammasome in the modulation of an LPS-induced inflammatory response during morphine tolerance. *Drug Alcohol Depend.* 132, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.12.022>
- Martín-Sánchez, F., Diamond, C., Zeitler, M., Gomez, A.I., Baroja-Mazo, A., Bagnall, J., Spiller, D., White, M., Daniels, M.J.D., Mortellaro, A., Peñalver, M., Paszek, P., Steringer, J.P., Nickel, W., Brough, D., Pelegrín, P., 2016. Inflammasome-dependent IL-1 β release depends upon membrane permeabilisation. *Cell Death Differ.* 23, 1219–31. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.176>
- Martínez-Cuevas, F.L., 2019. Diferencias en tráfico vesicular y señalización del receptor μ -opioide activado por morfina y fentanilo en células cebadas: posible participación del receptor TLR4. *Cinvestav, IPN.*
- Martínez, M.A., Ballesteros, S., 2019. Opium poisoning in modern times. An overview. *Forensic Sci. Int.* 302, 109848. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.06.006>

- Martyn, J.A.J., Mao, J., Bittner, E.A., 2019. Opioid tolerance in critical illness. *N. Engl. J. Med.* 380, 365–378. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1800222>
- Massotte, D., Kieffer, B.L., 1998. A molecular basis for opiate action. *Essays Biochem.* 33, 65–77. <https://doi.org/10.1042/bse0330065>
- Masters, S.L., 2013. Specific inflammasomes in complex diseases. *Clin. Immunol.* 147, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.12.006>
- Matos, F.F., Rollema, H., Brown, J.L., Basbaum, A.I., 1992. Do opioids evoke the release of serotonin in the spinal cord? An in vivo microdialysis study of the regulation of extracellular serotonin in the rat. *Pain* 48, 439–447. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90097-U](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90097-U)
- Matzinger, P., 2002. An innate sense of danger. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 961, 341–342. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb03118.x>
- McPherson, J., Rivero, G., Baptist, M., Llorente, J., Al-Sabah, S., Krasel, C., Dewey, W.L., Bailey, C.P., Rosethorne, E.M., Charlton, S.J., Henderson, G., Kelly, E., 2010. Mu opioid receptors: correlation of agonist efficacy for signalling with ability to activate internalization. *Mol. Pharmacol.* 78, 756–766. <https://doi.org/10.1124/mol.110.066613>
- Mika, J., Wawrzczak-Bargiela, A., Osikowicz, M., Makuch, W., Przewlocka, B., 2009. Attenuation of morphine tolerance by minocycline and pentoxifylline in naive and neuropathic mice. *Brain. Behav. Immun.* 23, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.07.005>
- Milligan, E.D., Watkins, L.R., 2009. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 23–36. <https://doi.org/10.1038/nrn2533>
- Mohan, S., 2016. Interleukin-1beta: a common thread between inflammation, pain and opioid tolerance. *Neuroimmunol. Neuroinflammation* 3, 201. <https://doi.org/10.20517/2347-8659.2016.37>
- Molina-Martínez, L.M., González-Espinosa, C., Cruz, S.L., 2014. Dissociation of immunosuppressive and nociceptive effects of fentanyl, but not morphine, after repeated administration in mice: Fentanyl-induced sensitization to LPS. *Brain. Behav. Immun.* 42, 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.06.011>
- Molinari, P., Vezzi, V., Sbraccia, M., Grò, C., Riitano, D., Ambrosio, C., Casella, I., Costa, T., 2010. Morphine-like opiates selectively antagonize receptor-arrestin interactions. *J. Biol. Chem.* 285, 12522–12535. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.059410>

- Möller, T., Bard, F., Bhattacharya, A., Biber, K., Campbell, B., Dale, E., Eder, C., Gan, L., Garden, G.A., Hughes, Z.A., Pearse, D.D., Staal, R.G.W., Sayed, F.A., Wes, P.D., Boddeke, H.W.G.M., 2016. Critical data-based re-evaluation of minocycline as a putative specific microglia inhibitor. *Glia* 64, 1788–1794.
<https://doi.org/10.1002/glia.23007>
- Mucha, R.F., Herz, A., 1986. Preference conditioning produced by opioid active and inactive isomers of levorphanol and morphine in rat. *Life Sci.* 38, 241–249.
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(86\)90309-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(86)90309-7)
- Murphy, P.B., Bechmann, S., Barrett, M.J., 2020. Morphine, StatPearls.
- Nagayach, A., Patro, N., Patro, I., 2016. Microglia in the physiology and pathology of brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B - Biol. Sci.* 86, 781–794.
<https://doi.org/10.1007/s40011-015-0585-y>
- Nennig, S.E., Schank, J.R., 2017. The role of NFκB in drug addiction: beyond inflammation. *Alcohol Alcohol* 52, 172–179.
<https://doi.org/10.1093/alcalc/agw098>
- Nicotra, L., Loram, L.C., Watkins, L.R., Hutchinson, M.R., 2012. Toll-like receptors in chronic pain. *Exp. Neurol.* 234, 316–329.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.09.038>
- Nikodemova, M., Duncan, I.D., Watters, J.J., 2006. Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and IκBα degradation in a stimulus-specific manner in microglia. *J. Neurochem.* 96, 314–323.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03520.x>
- Nyström, S., Antoine, D.J., Lundbäck, P., Lock, J.G., Nita, A.F., Högstrand, K., Grandien, A., Erlandsson-Harris, H., Andersson, U., Applequist, S.E., 2013. TLR activation regulates damage-associated molecular pattern isoforms released during pyroptosis. *EMBO J.* 32, 86–99. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.328>
- Oka, T., Aou, S., Hori, T., 1993. Intracerebroventricular injection of interleukin-1β induces hyperalgesia in rats. *Brain Res.* 624, 61–68.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90060-Z](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90060-Z)
- Ossipov, M.H., Dussor, G.O., Porreca, F., 2010. Central modulation of pain. *J. Clin. Invest.* 120, 3779–87. <https://doi.org/10.1172/JCI43766>
- Ozdemir, E., Gursoy, S., Bagcivan, I., Durmus, N., Altun, A., 2012. Zimelidine attenuates the development of tolerance to morphine-induced antinociception. *Indian J. Pharmacol.* 44, 215. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.93851>

- Paix, A., Coleman, A., Lees, J., Grigson, J., Brooksbank, M., Thorne, D., Ashby, M., 1995. Subcutaneous fentanyl and sufentanil infusion substitution for morphine intolerance in cancer pain management. *Pain* 63, 263–269. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(95\)00084-6](https://doi.org/10.1016/0304-3959(95)00084-6)
- Parsadaniantz, S.M., Rivat, C., Rostène, W., Réaux-Le Goazigo, A., 2015. Opioid and chemokine receptor crosstalk: A promising target for pain therapy? *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 69–78. <https://doi.org/10.1038/nrn3858>
- Patro, I., Nagayach, A., Sinha, S., Patro, N., 2016. General physiology and pathophysiology of microglia during neuroinflammation, en: Jana, N., Basu, A., Tandon, P.N. (Eds.), *Inflammation: the Common Link in Brain Pathologies*. Springer Singapore, Singapore, pp. 17–42. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1711-7_2
- Paxinos, G., Watson, C., 2009. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier/Academic.
- Peng, P.W.H., Sandler, A.N., 1999. A review of the use of fentanyl analgesia in the management of acute pain in adults. *Anesthesiology* 90, 576–599. <https://doi.org/10.1097/00000542-199902000-00034>
- Perea, G., Navarrete, M., Araque, A., 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32, 421–31. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.001>
- Persky, A.M., Pollack, G.M., 2015. *Foundations in pharmacokinetics*. University of North Carolina at Chapel Hill, Eshelman School of Pharmacy, North Carolina.
- Pichini, S., Solimini, R., Berretta, P., Pacifici, R., Busardò, F.P., 2018. Acute intoxications and fatalities from illicit fentanyl and analogues: an update. *Ther. Drug Monit.* 40, 38–51. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000465>
- Posillico, C.K., Terasaki, L.S., Bilbo, S.D., Schwarz, J.M., 2015. Examination of sex and minocycline treatment on acute morphine-induced analgesia and inflammatory gene expression along the pain pathway in Sprague–Dawley rats. *Biol. Sex Differ.* 6, 33. <https://doi.org/10.1186/s13293-015-0049-3>
- Preston, A.N., Cervasio, D.A., Laughlin, S.T., 2019. Visualizing the brain's astrocytes. pp. 129–151. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.02.006>
- Qin, L., Wu, X., Block, M.L., Liu, Y., Breese, G.R., Hong, J.-S., Knapp, D.J., Crews, F.T., 2007. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55, 453–462. <https://doi.org/10.1002/glia.20467>

- Qing-Ping, W., Nakai, Y., 1994. The dorsal raphe: An important nucleus in pain modulation. *Brain Res. Bull.* 34, 575–585. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(94\)90143-0](https://doi.org/10.1016/0361-9230(94)90143-0)
- Qu, J., Tao, X.-Y., Teng, P., Zhang, Y., Guo, C.-L., Hu, L., Qian, Y.-N., Jiang, C.-Y., Liu, W.-T., 2017. Blocking ATP-sensitive potassium channel alleviates morphine tolerance by inhibiting HSP70-TLR4-NLRP3-mediated neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* 14, 228. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0997-0>
- Raghavendra, V., Rutkowski, M.D., Deleo, J.A., 2002. The role of spinal neuroimmune activation in morphine tolerance/hyperalgesia in neuropathic and sham-operated rats. *J. Neurosci.* 22, 9980–9989. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-22-09980.2002>
- Ramos-Matos, C.F., Bistas, K.G., Lopez-Ojeda, W., 2020. Fentanyl, StatPearls.
- Rastogi, R., Swarm, R.A., Patel, T.A., 2011. Case scenario: opioid association with serotonin syndrome: implications to the practitioners. *Anesthesiology* 115, 1291–8. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31823940c0>
- Rathinam, V.A.K., Zhao, Y., Shao, F., 2019. Innate immunity to intracellular LPS. *Nat. Immunol.* 20, 527–533. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0368-3>
- Reeve, A.J., Patel, S., Fox, A., Walker, K., Urban, L., 2000. Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. *Eur. J. Pain* 4, 247–257. <https://doi.org/10.1053/eujp.2000.0177>
- Reisfield, MD, G.M., Bertholf, PhD, R.L., Wilson, MD, G.R., 2007. Opiates and opioids: What a difference a name makes. *J. Opioid Manag.* 3, 179. <https://doi.org/10.5055/jom.2007.0001>
- Sacerdote, P., 2008. Opioid-induced immunosuppression. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care* 2, 14–18. <https://doi.org/10.1097/SPC.0b013e3282f5272e>
- Saikumar, P., Dong, Z., Weinberg, J.M., Venkatachalam, M.A., 1998. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* 17, 3341–9. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202579>
- Sato, P.Y., Chuprun, J.K., Schwartz, M., Koch, W.J., 2015. The evolving impact of G protein-coupled receptor kinases in cardiac health and disease. *Physiol. Rev.* 95, 377–404. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2014>
- Sborgi, L., Rühl, S., Mulvihill, E., Pipercevic, J., Heilig, R., Stahlberg, H., Farady, C.J., Müller, D.J., Broz, P., Hiller, S., 2016. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *EMBO J.* 35, 1766–78. <https://doi.org/10.15252/embj.201694696>

- Schaefer, C.P., Tome, M.E., Davis, T.P., 2017. The opioid epidemic: a central role for the blood brain barrier in opioid analgesia and abuse. *Fluids Barriers CNS* 14, 32. <https://doi.org/10.1186/s12987-017-0080-3>
- Sehgal, N., Smith, H., Manchikanti, L., 2011. Peripherally acting opioids and clinical implications for pain control. *Pain Physician* 14, 249–258.
- Shavit, Y., Wolf, G., Goshen, I., Livshits, D., Yirmiya, R., 2005. Interleukin-1 antagonizes morphine analgesia and underlies morphine tolerance. *Pain* 115, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.02.003>
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., Shao, F., 2015. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 526, 660–665. <https://doi.org/10.1038/nature15514>
- Sochocka, M., Diniz, B.S., Leszek, J., 2017. Inflammatory response in the CNS: friend or foe? *Mol. Neurobiol.* 54, 8071–8089. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0297-1>
- Solis, E., Cameron-Burr, K.T., Shaham, Y., Kiyatkin, E.A., 2018. Fentanyl-induced brain hypoxia triggers brain hyperglycemia and biphasic changes in brain temperature. *Neuropsychopharmacology* 43, 810–819. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.181>
- Sommer, C., 2010. Serotonin in pain and pain Control, en: Müller, C.P., Jacobs, B.L.B.T.-H. of B.N. (Eds.), *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*. Elsevier, pp. 457–471. [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(10\)70096-5](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(10)70096-5)
- Suzuki, J., El-Haddad, S., 2017. A review: Fentanyl and non-pharmaceutical fentanyls. *Drug Alcohol Depend.* 171, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.11.033>
- Tamashiro, T.T., Dalgard, C.L., Byrnes, K.R., 2012. Primary microglia isolation from mixed glial cell cultures of neonatal rat brain tissue. *J. Vis. Exp.* e3814. <https://doi.org/10.3791/3814>
- Tao, R., Karnik, M., Ma, Z., Auerbach, S.B., 2003. Effect of fentanyl on 5-HT efflux involves both opioid and 5-HT 1A receptors. *Br. J. Pharmacol.* 139, 1498–1504. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705378>
- Tian, Y., Liu, M., Mao-Ying, Q.L., Liu, H., Wang, Z.F., Zhang, M.T., Wang, J., Li, Q., Liu, S. Bin, Mi, W.L., Ma, H.J., Wu, G.C., Wang, Y.Q., 2015. Early single Aspirin-triggered Lipoxin blocked morphine anti-nociception tolerance through inhibiting NALP1 inflammasome: Involvement of PI3k/Akt signaling pathway. *Brain. Behav. Immun.* 50, 63–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.06.016>

- Trescot, A.M., Datta, S., Lee, M., Hansen, H., 2008. Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11, S133-53.
- Trujillo-Estrada, L., Gomez-Arboledas, A., Forner, S., Martini, A.C., Gutierrez, A., Baglietto-Vargas, D., LaFerla, F.M., 2019. Astrocytes: from the physiology to the disease. *Curr. Alzheimer Res.* 16, 675–698.
<https://doi.org/10.2174/1567205016666190830110152>
- UNODC, 2019. World Drug Report 2019 (United Nations publication, Sales No. E.19.XI.8).
- Vahedi, H.S.M., Hajebi, H., Vahidi, E., Nejati, A., Saeedi, M., 2019. Comparison between intravenous morphine versus fentanyl in acute pain relief in drug abusers with acute limb traumatic injury. *World J. Emerg. Med.* 10, 27–32.
<https://doi.org/10.5847/wjem.j.1920-8642.2019.01.004>
- Vainchtein, I.D., Molofsky, A. V., 2020. Astrocytes and microglia: in sickness and in health. *Trends Neurosci.* 43, 144–154.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.01.003>
- Vallejo, R., Barkin, R.L., Wang, V.C., 2011. Pharmacology of opioids in the treatment of chronic pain syndromes. *Pain Physician* 14, E343-60.
- van Ijzendoorn, S.C.D., 2006. Recycling endosomes. *J. Cell Sci.* 119, 1679–81.
<https://doi.org/10.1242/jcs.02948>
- Vardanyan, R.S., Hruby, V.J., 2014. Fentanyl-related compounds and derivatives: current status and future prospects for pharmaceutical applications. *Future Med. Chem.* 6, 385–412. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.215>
- von Herrmann, K.M., Salas, L.A., Martinez, E.M., Young, A.L., Howard, J.M., Feldman, M.S., Christensen, B.C., Wilkins, O.M., Lee, S.L., Hickey, W.F., Havrda, M.C., 2018. NLRP3 expression in mesencephalic neurons and characterization of a rare NLRP3 polymorphism associated with decreased risk of Parkinson’s disease. *NPJ Park. Dis.* 4, 24. <https://doi.org/10.1038/s41531-018-0061-5>
- Wang, X., Loram, L.C., Ramos, K., De Jesus, A.J., Thomas, J., Cheng, K., Reddy, A., Somogyi, A.A., Hutchinson, M.R., Watkins, L.R., Yin, H., 2012. Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 6325–6330. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200130109>
- Wang, X., Zhang, Y., Peng, Y., Hutchinson, M.R., Rice, K.C., Yin, H., Watkins, L.R., 2016. Pharmacological characterization of the opioid inactive isomers (+)-naltrexone and (+)-naloxone as antagonists of toll-like receptor 4. *Br. J. Pharmacol.* 173, 856–869. <https://doi.org/10.1111/bph.13394>

- Webster, L.R., Smith, M.D., Lawler, J., Lindhardt, K., Dayno, J.M., 2017. Human abuse potential of an abuse-deterrent (AD), extended-release (ER) morphine product candidate (morphine-ADER Injection-molded tablets) vs extended-release morphine administered intranasally in nondependent recreational opioid users. *Pain Med.* 18, 1695–1705. <https://doi.org/10.1093/pm/pnw219>
- Williams, J.T., Ingram, S.L., Henderson, G., Chavkin, C., von Zastrow, M., Schulz, S., Koch, T., Evans, C.J., Christie, M.J., 2013. Regulation of μ -opioid receptors: Desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacol. Rev.* 65, 223–254. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005942>
- Xu, E., Liu, J., Wang, X., Xiong, H., 2017. Inflammasome in drug abuse. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 9, 165–177.
- Xu, X., Yin, D., Ren, H., Gao, W., Li, F., Sun, D., Wu, Y., Zhou, S., Lyu, L., Yang, M., Xiong, J., Han, L., Jiang, R., Zhang, J., 2018. Selective NLRP3 inflammasome inhibitor reduces neuroinflammation and improves long-term neurological outcomes in a murine model of traumatic brain injury. *Neurobiol. Dis.* 117, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.05.016>
- Yam, M.F., Loh, Y.C., Tan, C.S., Khadijah Adam, S., Abdul Manan, N., Basir, R., 2018. General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19082164>
- Yang, Q. qiao, Zhou, J. wei, 2019. Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. *Glia* 67, 1017–1035. <https://doi.org/10.1002/glia.23571>
- Yang, Y., Li, Q., He, Q.-H., Han, J.-S., Su, L., Wan, Y., 2018. Heteromerization of μ -opioid receptor and cholecystinin B receptor through the third transmembrane domain of the μ -opioid receptor contributes to the anti-opioid effects of cholecystinin octapeptide. *Exp. Mol. Med.* 50, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0090-5>
- Yu, L., Wang, L., Chen, S., 2010. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 2592–2603. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01127.x>
- Zeng, X., Lin, M.Y., Wang, D., Zhang, Y., Hong, Y., 2014. Involvement of adrenomedullin in spinal glial activation following chronic administration of morphine in rats. *Eur. J. Pain (United Kingdom)* 18, 1323–1332. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2014.493.x>
- Zhang, J.-M., An, J., 2007. Cytokines, inflammation, and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* 45, 27–37. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>

- Zhang, X., Wang, J., Yu, T., Du, D., Jiang, W., 2015. Minocycline can delay the development of morphine tolerance, but cannot reverse existing tolerance in the maintenance period of neuropathic pain in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 42, 94–101. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12316>
- Zhang, X.Q., Cui, Yu, Cui, Yue, Chen, Y., Na, X.D., Chen, F.Y., Wei, X.H., Li, Y.Y., Liu, X.G., Xin, W.J., 2012. Activation of p38 signaling in the microglia in the nucleus accumbens contributes to the acquisition and maintenance of morphine-induced conditioned place preference. *Brain. Behav. Immun.* 26, 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.09.017>
- Zheng, D., Liwinski, T., Elinav, E., 2020. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discov.* 6, 36. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0167-x>
- Zuo, Z., 2005. The role of opioid receptor internalization and beta-arrestins in the development of opioid tolerance. *Anesth. Analg.* 101, 728–34, table of contents. <https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000160588.32007.AD>

10. Apéndice

10.1. Cultivos primarios de microglía y astrocitos

Las vías de señalización en células específicas se pueden estudiar en cultivos primarios de los distintos tipos celulares localizados dentro del SNC. Como parte de los experimentos desarrollados durante este proyecto, estandarizamos una técnica para aislar y cultivar astrocitos y microglía de la SGPA y el NDR de ratas Wistar (protocolo modificado de Tamashiro y colaboradores (2012)). En este apéndice se muestra el procedimiento detallado para facilitar la continuidad de este estudio.

Se utilizaron ratas Wistar de 5 días de edad postnatal. Los animales se decapitaron y la cabeza se sumergió en etanol al 70 %. Inmediatamente, y en condiciones de esterilidad, se extrajo el cerebro y se colocó en solución balanceada de Hank's (HBSS). Se extrajo el tejido de la SGPA y el NDR utilizando una matriz cerebral de acrílico y un bisturí. El tejido se colocó en HBSS, se disgregó mediante pipeteo y se pasó a través de un filtro de acero inoxidable de 100 μm . La suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm durante 6 min. El botón celular se disgregó en medio de cultivo DMEM libre de suero fetal bovino y se sembró en cajas Petri pre-cubiertas con poli-D-lisina (PDL). Esta preparación se incubó a 37 °C durante 5-7 días hasta que alcanzó una confluencia del 90 %. Transcurrido este tiempo, se retiraron los cultivos de la incubación y se colocaron en agitación a 150 rpm durante 1.5 h a 37 °C. Se transfirió el sobrenadante a una nueva caja Petri sin romper la capa adherida al frasco de cultivo y se añadió medio DMEM adicionado con 10 % de SFB, 1 % de penicilina/estreptomicina y 120 μl de L-glutamina a cada cultivo. Las células adheridas al sustrato fueron astrocitos en su mayoría. Los cultivos derivados del sobrenadante se cultivaron por 3 a 5 días adicionales y estuvieron constituidos principalmente por microglía. El aislamiento de la microglía y los astrocitos se comprobó mediante la observación de la morfología de las células y mediante inmunofluorescencia con los marcadores Iba-1 y GFAP, respectivamente.

Los cultivos mixtos de microglía mostraron abundantes células sin morfología homogénea, lo que indica una mezcla de diferentes tipos celulares (microglía, astrocitos y neuronas) (Fig. 25a). Una vez aislados, los astrocitos se caracterizaron por la presencia de abundantes ramificaciones que hacían contacto físico con las células circundantes (Figs. 25b, d). La microglía presentó una morfología ameboide, con escasas ramificaciones (Figs. 25c, e).

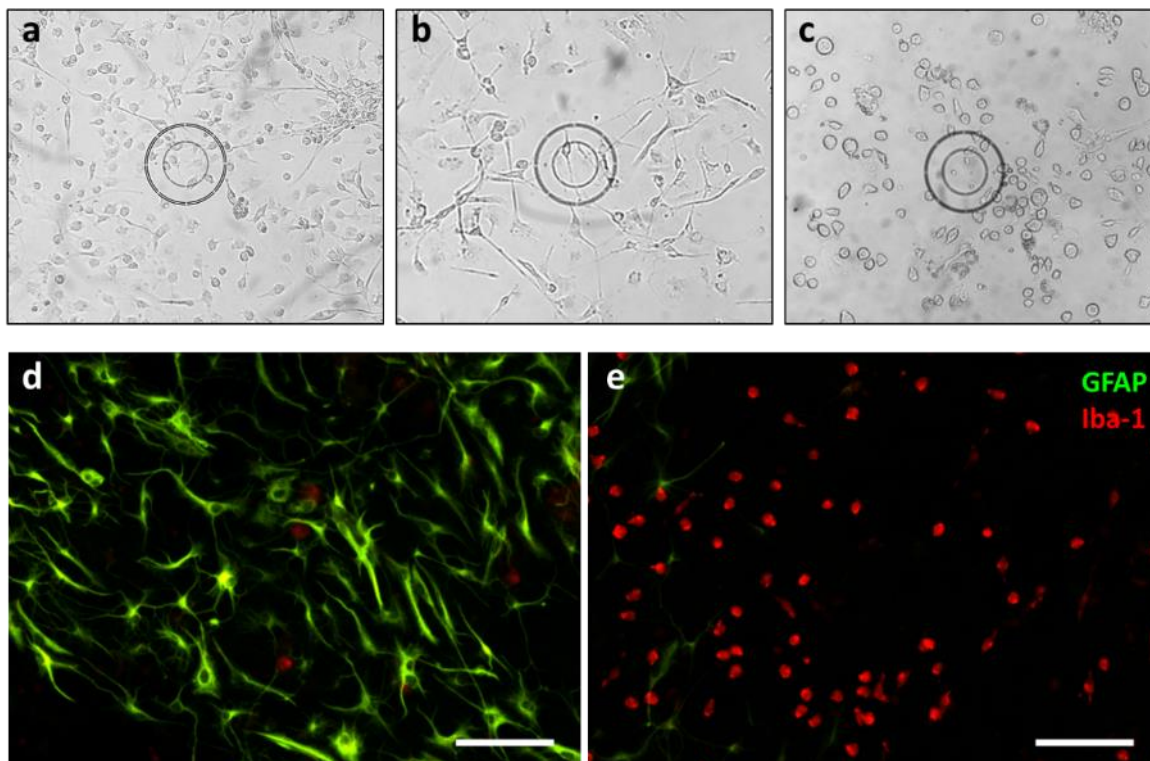


Figura 26. Cultivos primarios de células de la SGPA/NDR de ratas Wistar. Imágenes representativas tomadas con un microscopio de campo claro. **a)** Cultivo mixto (microglía, astrocitos y neuronas) obtenido 48 horas después de la extracción del cerebro. **b)** Astrocitos aislados 5 días después de la extracción del cerebro. **c)** Microglía aislada 7 días después de la extracción del cerebro. **d)** Imágenes de epifluorescencia de cultivos primarios de astrocitos y **e)** microglía, marcados con GFAP e Iba-1, respectivamente. Barra de escala: 50 μ m.

Para realizar el cultivo neuronal se utiliza el mismo método, pero al medio de cultivo se le agrega insulina para favorecer la captura de L-glutamina, y arabinosa C para eliminar restos de células gliales. Esta técnica se podría utilizar para evaluar los efectos neuroinflamatorios neuronales producidos por los opioides. En específico, para evaluar la función del inflammasoma NLRP3 neuronal y si su activación modifica la neurotransmisión.

10.2. Artículos publicados

Morphine and Fentanyl Repeated Administration Induces Different Levels of NLRP3-Dependent Pyroptosis in the Dorsal Raphe Nucleus of Male Rats via Cell-Specific Activation of TLR4 and Opioid Receptors

César J. Carranza-Aguilar, Araceli Hernández-Mendoza, Carlos Mejias-Aponte, et al.

Cellular and Molecular Neurobiology

ISSN 0272-4340

Cell Mol Neurobiol
DOI 10.1007/s10571-020-00957-5





Morphine and Fentanyl Repeated Administration Induces Different Levels of NLRP3-Dependent Pyroptosis in the Dorsal Raphe Nucleus of Male Rats via Cell-Specific Activation of TLR4 and Opioid Receptors

César J. Carranza-Aguilar¹ · Araceli Hernández-Mendoza¹ · Carlos Mejias-Aponte² · Kenner C. Rice³ · Marisela Morales² · Claudia González-Espinosa¹ · Silvia L. Cruz¹

Received: 19 March 2020 / Accepted: 30 August 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Morphine promotes neuroinflammation after NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) oligomerization in glial cells, but the capacity of other opioids to induce neuroinflammation and its relationship to the development of analgesic tolerance is unknown. We studied the effects of morphine and fentanyl on NLRP3 inflammasome activation in glial and neuronal cells in the dorsal raphe nucleus (DRN), a region involved in pain regulation. Male Wistar rats received i.p. injections of morphine (10 mg/kg) or fentanyl (0.1 mg/kg) 3 × daily for 7 days and were tested for nociception. Two hours after the last (19th) administration, we analyzed NLRP3 oligomerization, caspase-1 activation and gasdermin D-N (GSDMD-N) expression in microglia (CD11b positive cells), astrocytes (GFAP-positive cells) and neurons (NeuN-positive cells). Tolerance developed to both opioids, but only fentanyl produced hyperalgesia. Morphine and fentanyl activated NLRP3 inflammasome in astrocytes and serotonergic (TPH-2-positive) neurons, but fentanyl effects were more pronounced. Both opioids increased GFAP and CD11b immunoreactivity, caspase-1 and GSDMD activation, indicating pyroptotic cell death. The opioid receptor antagonist (–)-naloxone, but not the TLR4 receptor antagonist (+)-naloxone, prevented microglia activation and NLRP3 oligomerization. Only (+)-naloxone prevented astrocytes' activation. The anti-inflammatory agent minocycline and the NLRP3 inhibitor MCC950 delayed tolerance to morphine and fentanyl antinociception and prevented fentanyl-induced hyperalgesia. MCC950 also prevented opioid-induced NLRP3 oligomerization. In conclusion, morphine and fentanyl differentially induce cell-specific activation of NLRP3 inflammasome and pyroptosis in the DRN through TLR4 receptors in astrocytes and through opioid receptors in neurons, indicating that neuroinflammation is involved in opioid-induced analgesia and fentanyl-induced hyperalgesia after repeated administrations.

Keywords NLRP3 · Opioids · Glia · TLR4 · NF-κB · Serotonin

Claudia González-Espinosa and Silvia L. Cruz have contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10571-020-00957-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Silvia L. Cruz
slcruz@cinvestav.mx

¹ Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav, IPN), Sede Sur, Calzada de los Tenorios No. 235, Col. Granjas Coapa, Del. Tlalpan, C.P. 14330 Ciudad de México, Mexico

Introduction

Morphine and fentanyl are commonly used analgesics and psychoactive drugs that differ in potency and receptor selectivity. Fentanyl is 50–100 times more potent than morphine as analgesic and a selective μ -opioid receptor agonist, while morphine acts through μ - δ - and κ -opioid receptors (Schaefer

² Neuronal Networks Section, Integrative Neuroscience Research Branch, National Institute on Drug Abuse, 251 Bayview Boulevard Suite 200, Baltimore, MD 21224, USA

³ Drug Design and Synthesis Section, Molecular Targets and Medications Discovery Branch, Intramural Research Program, National Institute on Drug Abuse and National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

et al. 2017; Suzuki and El-Haddad 2017; Vardanyan and Hruby 2014). Prolonged treatment with morphine and fentanyl can lead to tolerance to their analgesic effects (Bobeck et al. 2012; Molina-Martínez et al. 2014). Several factors contribute to the development of opioid analgesic tolerance, including membrane receptor availability, cAMP pathway adaptations, potassium and calcium channel expression, as well as changes in various neurotransmitter systems (Al-Hasani and Bruchas 2011; Cesselin 1995; Lueptow et al. 2018; Mayer and Mao 1999; Taylor and Fleming 2001).

Experimental data suggest that neuroinflammation also plays a role in tolerance development (Lin and Lu 2018; Lueptow et al. 2018). For example, minocycline and pentoxifylline, drugs with anti-inflammatory actions, prevent tolerance to the antinociceptive effects of morphine (Harada et al. 2013; Mika et al. 2009). Also, repeated morphine administration induces changes in morphology of astrocytes and microglia in dorsal raphe nucleus (DRN), a brain region involved in pain regulation, and periaqueductal gray (PAG), which has been identified as a critical region for the development of tolerance to opioid effects (Campion et al. 2016; Doyle et al. 2017; Harada et al. 2013; Tortorici et al. 1999). DRN is abundant in somas of serotonergic neurons (Baker et al. 1991) whose descending projections modulate pain responses at the spinal level, while their ascending projections act in sensitive neurons in the thalamus (Qing-Ping and Nakai 1994). Analgesic opioid effects occur in part through the serotonin release to spinal sites that transmit nociceptive stimuli (Bardin and Colpaert 2004; Haleem 2018).

Glial cells release pro-inflammatory mediators such as interleukin 1 β (IL-1 β), a cytokine that contributes to the loss of morphine-induced antinociception (Mélis Parsadaniantz et al. 2015; Shavit et al. 2005). Activation of several proteins is necessary to induce the release of IL-1 β and to modulate the analgesic effect of morphine (Xu et al. 2017). Thus, repeated morphine administration increases mRNA expression of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) in dorsal root ganglion, which is necessary for IL-1 β maturation (Ellis et al. 2016). *In vitro* studies have also demonstrated that morphine can activate NF- κ B (nuclear factor enhancer of the kappa light chains of activated B cells), a transcription factor responsible for NLRP3 and IL-1 β transcription in neurons and microglia (Chen et al. 2006; Wang et al. 2012). NF- κ B activation has been documented in the spinal cord of rats with nerve damage that received morphine for 1 week (Grace et al. 2016). In addition, administration of procyanidin, an NLRP3 inhibitor, and minocycline, which effectively inhibits NF- κ B, reduces tolerance development to the antinociceptive effects of morphine (Cai et al. 2016; Mika et al. 2009).

The NLRP3 inflammasome complex is formed by oligomerization of NLRP3 and pro-caspase-1, among other proteins (Kim et al. 2017). This complex has been associated to

neuronal damage via IL-1 β release and caspase-1 activation (Masters 2013; Zhang et al. 2016), which can lead to a type of inflammatory cell death known as pyroptosis (Guo et al. 2015; Shi et al. 2015). Pyroptotic cells are characterized by cellular swelling, membrane pore formation dependent on gasdermin D (GSDMD) cleavage in the N- and C-terminal domains, and plasma membrane rupture (Lamkanfi and Dixit 2010; Liu et al. 2018; Shi et al. 2015). There is evidence that morphine increases the expression of caspase-1, IL-1 β and NLRP3 proteins in the spinal cord when it is chronically administered (Cai et al. 2016). However, to the best of our knowledge, there are no studies analyzing if pyroptosis occurs in brain areas involved in pain modulation in response to other opioid agonists.

Although the mechanisms leading to opioid-induced neuroinflammation are not fully understood, the fact that the non-specific opioid receptor antagonist ($-$)-naloxone prevents *in vitro* NLRP3 activation induced by lipopolysaccharide (LPS) indicates that opioid receptors are involved in this effect (Lin et al. 2017). On the other hand, opioids can bind to the Toll-like receptor 4 subtype (TLR4), which recognizes pathogen-associated and damage-associated molecular patterns (PAMPs and DAMPs, respectively), and pharmacological blockade of TLR4 receptors attenuates morphine-induced analgesic tolerance and hyperalgesia (Hutchinson et al. 2010). In addition, TLR4 blockade also prevents morphine-induced IL-1 β release in a microglial cell line (Wang et al. 2012).

In comparison to morphine, the neuroinflammatory actions of other, even more potent opioids, are less studied. Also, the participation of neuroinflammation on the development of tolerance after repeated opioid administration is not fully understood. In this work, we tested the hypothesis that differences in the development of antinociceptive tolerance after repeated administrations of morphine and fentanyl could be related to their capacity to induce the expression of canonical markers of neuroinflammation in DRN, with differential participation of opioid and Toll-like receptors. Therefore, the aims of this study were: (a) to compare the effects of repeated morphine or fentanyl administration (enough to produce tolerance to their antinociceptive effects) on NLRP3-dependent pyroptosis in neurons, microglia and astrocytes in DRN in rats; (b) to determine the role of opioid receptors and TLR4 receptors in these effects; and (c) to study the effect of NLRP3 and inflammation blockade on the development of tolerance to morphine or fentanyl antinociceptive effects.

Materials and Methods

Animals

We used male Wistar rats (250–300 g) housed under a 12/12-h inverted light/dark cycle (light on at 10:00), with

room temperature between 23–25 °C and ad libitum access to food and water. Rats were habituated to laboratory conditions by handling them for three consecutive days. Experiments to test antinociception, tolerance development and pro-inflammatory effects of repeated morphine and fentanyl administration were conducted at Cinvestav-IPN. Experiments to analyze the receptors involved in opioid-induced neuroinflammation were done at the National Institute on Drug Abuse (NIDA), Intramural Research Program. All procedures followed the Mexican Official Norm for laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999), were approved by the Ethics Committee of Cinvestav (CICUAL, Protocols 0021-12 and 0074-13) and NIDA Intramural Program (Protocol # 16-INB-4), and complied with the National Institutes of Health guidelines (NIH 2011) and ARRIVE guidelines for animal research (Kilkenny et al. 2010).

Drugs

The National Institute on Drug Abuse (Research Technology Branch, Research Triangle Institute, NC, USA) and Laboratorios Psicofarma (Ciudad de México, México) kindly donated morphine sulfate and fentanyl citrate. Dr. K.C. Rice synthesized (+)-naloxone. The work of the Drug Design and Synthesis Section, Molecular Targets and Medications Discovery Branch was supported by the NIH Intramural Research Programs of NIDA and the National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA). We purchased, minocycline, MCC950, (–)-naloxone hydrochloride and LPS (*Escherichia coli* serotype 026:B6) from Sigma-Aldrich (Toluca, Mexico). Morphine, fentanyl, (–)-naloxone, (+)-naloxone, MCC950 and LPS were dissolved in 0.9% saline solution and injected in a final volume of 0.1 ml/100 g, i.p. Minocycline was dissolved in sterile water and administered by oral gavage in a final volume of 0.2 ml/100 g. We determined the doses for naloxone, minocycline and MCC950 to be used in this study from the literature (Chen et al. 2019; Kaneto et al. 1985; Posillico et al. 2015; Zhang et al. 2015).

Experimental Design

Independent groups of animals ($n = 10$ each) were randomly allocated to one of the following groups (Fig. 1): Experiment 1. Dose–response curves for antinociception produced by morphine (0.1 to 10 mg/kg) or fentanyl (0.001 to 0.1 mg/kg). Experiment 2. Repeated administration (3x/day, 8 h apart, 19 administrations in total) of 10 mg/kg morphine or 0.1 mg/kg fentanyl. Animals were evaluated in the tail-flick test immediately after the 1st, 7th and 19th administration of each opioid to test for tolerance development. Two hours after the last saline/opioid administration and nociception

testing, brains were removed and prepared for immunofluorescence studies from randomly selected animals ($n = 3$ of each experimental condition). Experiment 3. Same protocol as in experiment 2, but treating animals with 10 mg/kg (–)-naloxone or 10 mg/kg (+)-naloxone 20 min prior to each opioid administration. As before, brains from 3 animals were obtained for immunofluorescence studies, 2 h after the last saline/drug administration. Experiment 4. Same drug administration schedule as in experiment 2, but in this case, we administered 5 mg/kg MCC950 or 30 mg/kg minocycline the day previous to the first opioid injection and each day, 60 min before the second daily administration of morphine or fentanyl. Although minocycline's half-life is short (3–4 h; Colovic and Caccia 2003) we selected this administration schedule because it has been shown that pre-treatment with 30 mg/kg minocycline for three days delays morphine antinociceptive tolerance in rats with neuropathic pain (Zhang et al. 2015). The MCC950 dose and administration schedule were selected because under these conditions MCC950 effectively reduces inflammatory pain through NLRP3 inhibition (Chen et al. 2019). Control animals received only the vehicle; i.e., 0.9% saline i.p., or sterile water, p.o.

Evaluation of Antinociception

We used a standardized tail-flick apparatus (model 7360, Ugo Basile, Italy) with a variable heat source connected to an automatic timer. The heat source was adjusted to obtain a baseline latency value to tail withdrawal of 5–6 s. We tested each rat three times before the first drug injection to obtain the mean baseline latency; rats outside this range were excluded (approximately 5%). In this test, an increase or decrease in basal latency indicates antinociception or pro-nociception, respectively. To avoid tissue damage, we established a cut-off time of 15 s. The latency to tail withdrawal was determined 15, 30, 60, 90 and 120 min after drug administration. The results were expressed as percentage of the maximum possible effect: $\%MPE = (\text{experimental value} - \text{baseline value}) / (15 - \text{baseline value}) \times 100$ and as the area under the curve (AUC) for each time course determined by trapezoidal integration.

Immunofluorescence

Two hours after the last opioid injection, animals were anesthetized with a mixture of ketamine:xylazine (90:10 mg/kg) and perfused through the ascending aorta with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. Brains were removed and post-fixed during 2 h in 4% PFA, placed in 30% sucrose solution for 48 h, kept in a 30% polyethylene glycol and 30% sucrose solution and stored at –70 °C until use. DRN coronal slices of 30 μm from bregma –7.44 to –7.8

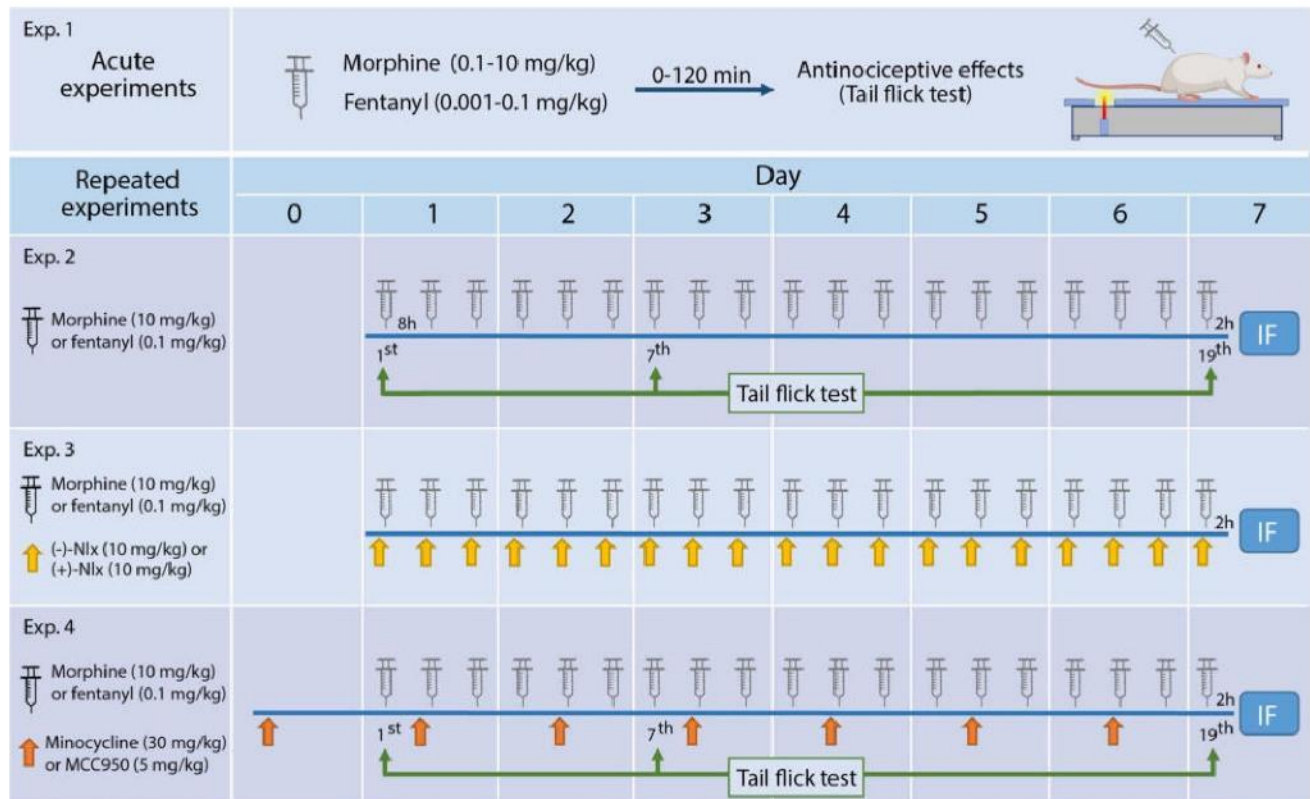


Fig. 1 Experimental design. *Experiment (1)* Dose–response curves for morphine- or fentanyl-induced antinociception in the tail-flick test. The latency to tail withdrawal was recorded for each dose and drug using independent groups of animals ($n=10$ each). *Experiment (2)* Tolerance development to opioid-induced antinociception. Independent groups of animals ($n=10$ each) were injected 3x/day with 10 mg/kg morphine or 0.1 mg/kg fentanyl and evaluated in the tail-flick test for nociception after the 1st, 7th and 19th administrations (green arrows). Two hours after the last injection, brains were removed and prepared for immunofluorescence analyses. *Experiment (3)* Naloxone antagonism of morphine or fentanyl neuroinflammatory effects. Same administration schedule as in experiment 2, but in this

case, animals were injected with 10 mg/kg (–)-naloxone or 10 mg/kg (+)-naloxone 20 min prior to each opioid administration. Two hours after the last injection, brains were removed for immunofluorescence analyses. *Experiment (4)* Effects of minocycline or MCC950 administration on tolerance development to morphine or fentanyl antinociceptive effects and NLRP3 expression. Same treatment as in experiment 2, but animals received 30 mg/kg minocycline or 5 mg/kg MCC950 the day previous to the first opioid injection and 60 min before the second administration of each opioid each day. Antinociception was evaluated in the tail-flick test immediately after the 1st, 7th and 19th injections of each opioid. Immunofluorescence was evaluated two hours after the last opioid injection

(Paxinos and Watson 2009) were cut using a cryostat (Zeiss, Hyrax C25). The slices were immersed in PBS at room temperature for 1 h and then washed three times with PBS. After this, samples were blocked with 5% filtered donkey serum (Equitech, Cat. SD-0500HI) and 0.3% triton in PBS for 2 h at room temperature. Samples were then incubated overnight with primary antibodies at 4 °C and with specific secondary antibodies for 2 h at room temperature in dark conditions. Control experiments were performed using only secondary antibodies and, under these conditions, no labeling was observed. To study NLRP3 inflammasome activation, we used anti-NLRP3, anti-caspase-1 and anti-GSDMD-N (an antibody that recognizes the N-terminal GSDMD domain after cleavage). Anti-NeuN was used to stain all neurons, anti-TPH-2 (tryptophane hydroxylase-2; the rate-limiting enzyme in

the synthesis of 5-HT) to identify the serotonergic neurons, anti-CD11b (cluster of differentiation molecule 11b) to stain microglia and anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) to detect astrocytes. All the antibodies used are listed in Table 1. DAPI (for nuclei staining) was added in a dilution 1:500 in PBS solution for 5 min, followed by three washes with PBS. The tissue samples were mounted with ProLong® Antifade Kit (Invitrogen, ref. 7481) using 10–15 μ l per slice. The slides were covered with a coverslip and sealed. Samples were stored at room temperature and protected from light until further analysis.

Table 1 List and features of antibodies

Antibody	Dilution	Company-cat
Mouse anti-CD11b	1:300	Abcam-ab8879
Goat anti-GFAP	1:250	Abcam-ab53554
Mouse anti-NeuN	1:850	Sigma-Aldrich-MAB377
Mouse anti-TPH-2	1:300	Sigma-Aldrich-AMAb91108
Rabbit anti-NLRP3	1:1000	Aviva Systems-OABF00351
Mouse anti-Caspase-1	1:300	Biorbyt-ORB378615
Rabbit anti-GSDMD-N	1:300	Cell Signaling Technologies-93709
Anti-rabbit-A488 conjugated	1:800	Invitrogen-A21206
Anti-mouse A555 conjugated	1:1000	Invitrogen-A31570
Anti-goat A647 conjugated	1:300	Invitrogen-A21447

Statistical and Data Analysis

We calculated each opioid dose to produce antinociception at 50% with their corresponding 95% confidence intervals (95% CI) using probit analysis (Probit; MedCalc version 17.8.2). For comparisons among three or more independent groups, we used a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. To evaluate if hyperalgesia developed, we conducted a one-sample Wilcoxon rank-sum test at the time points at which the latencies to tail-flick test were lower than basal values. Comparisons between the proportion of TPH-2 and NLRP3 double positive cell populations were done with Fisher's exact test. The threshold for statistical significance was $p \leq 0.05$. While conducting data analysis, researchers were blinded to which samples represented treatments and controls. The software program used for statistical analysis was GraphPad Prism v.8. In order to quantify the number of positive cells to CD11b, NLRP3, caspase-1 and TPH-2, we obtained DRN images ($600 \times 500 \mu\text{m}$) with an immunofluorescence microscope (Eclipse Ti-U, Nikon; $10 \times$ objective). For more detailed images ($40 \times 40 \mu\text{m}$) and complete cell analysis (10 z-stacks, $1 \mu\text{m}$ each), we used a confocal microscope (Zeiss Airyscan, LSM800; $40 \times$ objective). To quantify the fluorescence intensity of GFAP and GSDMD-N, we converted the images to gray-scale (8-bit), subtracted the background pixels and established the threshold limit to highlight the structures of interest (cell bodies and branches); afterwards, we measured the mean fluorescence intensity of the entire image. To analyze co-localization between NLRP3/caspase-1, NLRP3/GFAP, NLRP3/CD11b and NLRP3/NeuN, we used the Mander's overlapping coefficient. All images were taken in triplicate from three different animals and analyzed under the same conditions with ImageJ software (version 1.52n, National Institute of Health, USA).

Results

Morphine and Fentanyl Produce Different Degrees of Tolerance to Their Antinociceptive Effects

We did dose–response curves for the acute effects of morphine or fentanyl and observed maximal antinociception with 10 mg/kg morphine or 0.1 mg/kg fentanyl (Fig. 2a), doses that were used for subsequent experiments. Values calculated from the adjusted curves were 2.96 mg/kg [95% IC: 0.52 to 5.39] for morphine and 0.03 mg/kg [95% IC: 0.01 to 0.06] for fentanyl. The time courses corresponding to the 1st, 7th and 19th administration of 10 mg/kg morphine showed that, with the first dose, peak effects were observed at 15 min and antinociception remained high for the next 90 min. After repeated administration of morphine, there was a decrease in E_{max} and a reduction in duration of antinociceptive effects (Fig. 2a). E_{max} and AUC values for each administration are compared in Fig. 2c, d. As seen, morphine's effects significantly decreased with each injection ($F_{(2,27)} = 12.95$; $p = 0.0001$); thus, morphine produced approximately 50% of its initial response by the 19th administration. Tolerance was more evident when the AUC values were compared because, in this case, morphine's effects significantly decreased from the 7th administration onwards ($F_{(2,27)} = 36.3$; $p < 0.0001$). The 1st fentanyl administration also reached maximal antinociception in the first 15 min and decreased towards basal levels afterwards (Fig. 2e). Subsequent injections produced a slight decrease in E_{max} and less duration of antinociception. At the 19th administration, fentanyl still produced significant peak effects, but hyperalgesia was evident at 90 and 120 min after injection ($p = 0.016$; one-sample Wilcoxon rank-sum test). We did not find significant statistical differences between the 1st, 7th and 19th administration when E_{max} values were compared ($F_{(2,27)} = 2.26$; $p = 0.12$; Fig. 2f), but differences were evident among AUC values ($F_{(2,27)} = 12.75$; $p = 0.0001$; Fig. 2g).

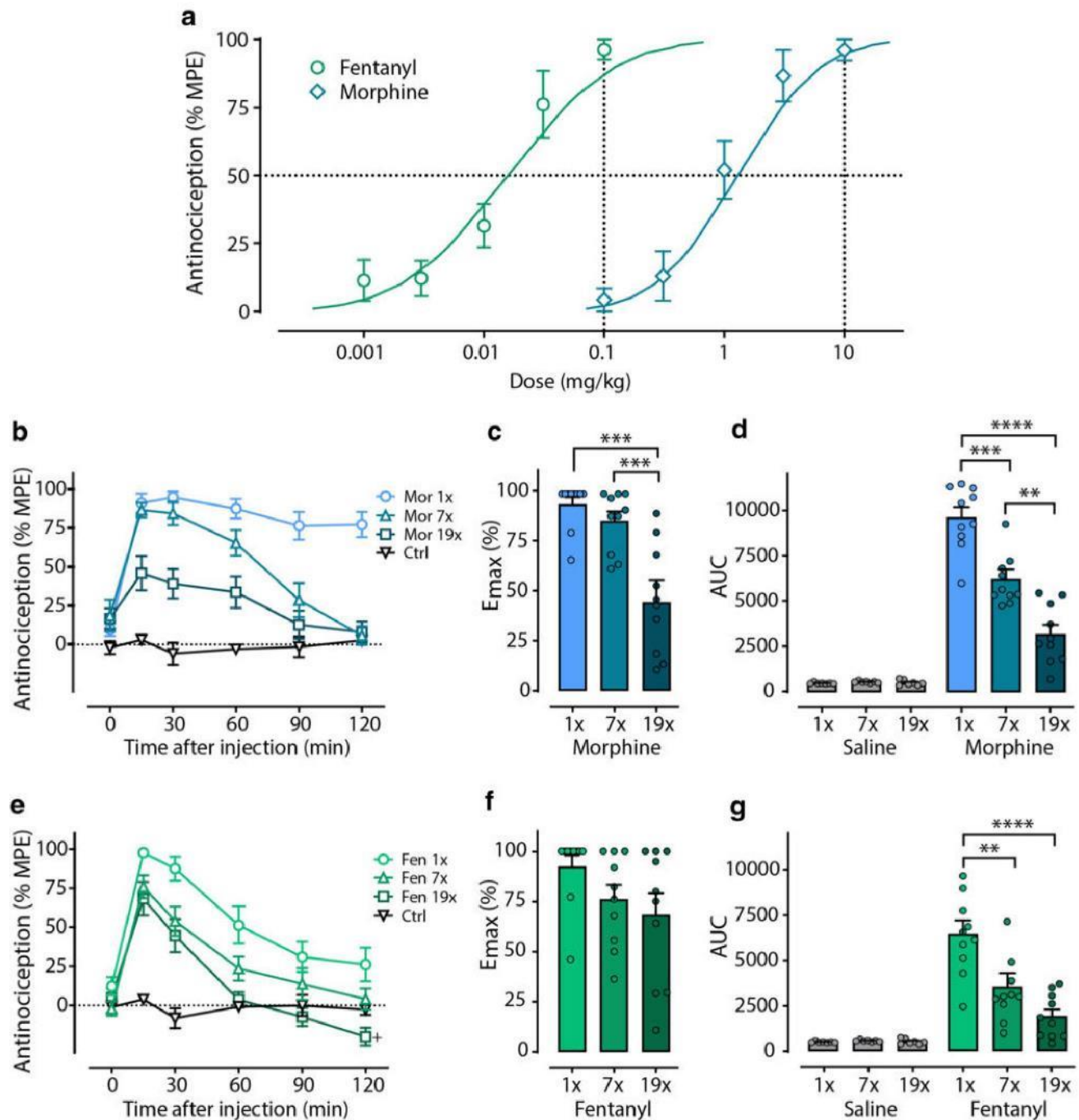


Fig. 2 Antinociceptive effects of morphine or fentanyl after acute and repeated administration. **a** Dose–response curves for the antinociception produced by morphine (0.1–10 mg/kg) or fentanyl (0.001–0.1 mg/kg) in the tail-flick test. **b, e** Time course (2 h) of the antinociception observed after 1, 7 or 19 administrations of 10 mg/kg morphine or 0.1 mg/kg fentanyl. Control animals received only

saline. **c, f** Peak antinociceptive effects (E_{max}) after the 1st, 7th and 19th administration of each opioid. **d, g** Area under the curve (AUC) corresponding to the 2-h evaluation period of nociception produced by morphine or fentanyl. Each point/bar represents the mean \pm SEM of $n=10$. $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$; Tukey test; $^{\dagger}p<0.05$; one-sample Wilcoxon rank-sum test

Repeated Morphine or Fentanyl Administration Activates NLRP3, Microglia and Astrocytes in DRN

In order to evaluate the activation of microglia and

astrocytes after repeated treatment with morphine or fentanyl, we analyzed NLRP3 expression in DRN 2 h after the 19th opioid administration. Figure 3 shows representative images of immunofluorescence to NLRP3, GFAP as

marker of astrocytes, and CD11b, a protein expressed in microglia in control and opioid-treated groups. There was evidence of basal microglia and astrocyte activation in DRN in saline-treated rats, but only few cells were positive for NLRP3 expression (Fig. 3a). Both morphine and fentanyl significantly induced NLRP3 expression, but fentanyl levels of induction were higher than those produced by morphine ($F_{(2,16)} = 28.78$; $p < 0.0001$; Fig. 3b). Both opioids increased the number of activated microglial cells ($F_{(2,16)} = 34.37$; $p < 0.0001$; Fig. 3c) and GFAP fluorescence intensity ($F_{(2,16)} = 35.99$; $p < 0.0001$; Fig. 3d) in astrocytes. We observed that GFAP-positive cells activated by morphine or fentanyl were mainly located within the medial aspects of the DRN, where serotonergic neurons are known to be concentrated (Abrams et al. 2004; Hornung 2012; Jacobs and Azmitia 1992). As a methodological control, we utilized a single injection of 1 mg/kg LPS, because it is a potent stimulator of the immune system and activates NLRP3 inflammasome (Rathinam et al. 2019). In accordance to previous

reports, LPS produced an increase in NLRP3 expression as well as generalized microglia and astrocyte activation. We observed LPS-induced activation in astrocytes not only in DRN, but also within the dorsal PAG and neighboring areas (Supplementary Fig. S1).

Repeated Opioid Administration Induces NLRP3 Expression in Astrocytes and Neurons, Mainly Serotonergic Neurons, but not in Microglia

In order to determine the cell type in which Inflammation activation occurred, we examined NLRP3, CD11b, GFAP and NeuN markers in DRN. In saline-treated animals, some microglia, astrocytes and neurons were positive for NLRP3 expression (Fig. 4). Neither morphine nor fentanyl had an effect on microglia cells ($F_{(2,48)} = 0.41$; $p = 0.67$; Fig. 4a, first row and Fig. 4b), but both opioids increased NLRP3 expression in neurons and astrocytes (Fig. 4a, second and third rows). The Mander's

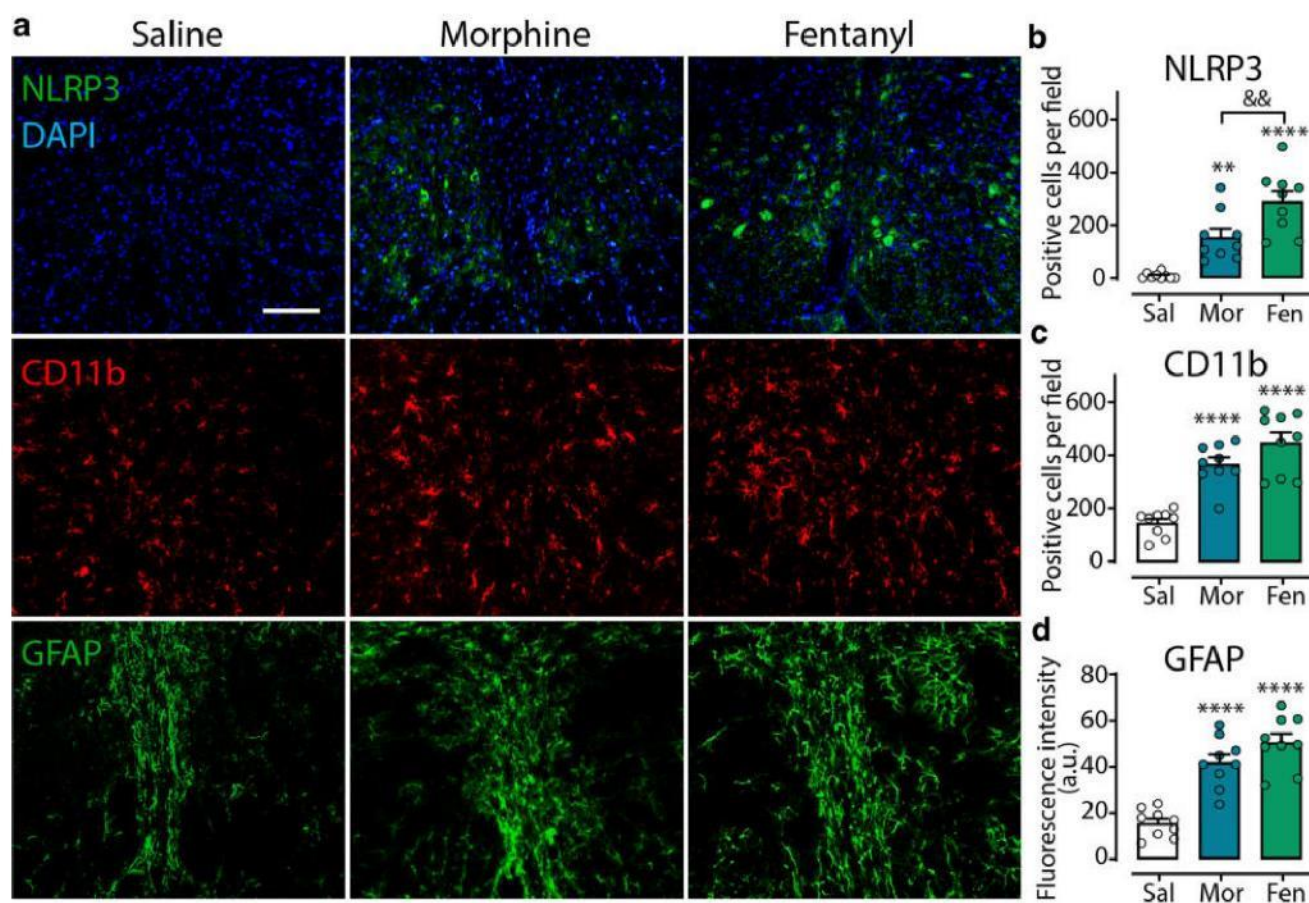


Fig. 3 Neuroinflammatory effects produced by morphine or fentanyl in DRN cells. **a** Representative confocal images ($600 \times 500 \mu\text{m}$) showing immunoreactivity to NLRP3 inflammasome (green; upper panel), nuclei (blue), CD11b (red; microglia) and GFAP (green; astrocytes) in the DRN of rats injected 19 times with saline solution

(Sal), 10 mg/kg morphine (Mor) or 0.1 mg/kg fentanyl (Fen). Scale bar: $100 \mu\text{m}$. **b**, **c** NLRP3 and CD11b positive cells per field. **d** Mean fluorescence intensity to GFAP. Each bar represents the mean \pm SEM of $n_{\text{slices/animals}} = 9/3$. $**p < 0.01$, $****p < 0.0001$ versus control group; $\&\&p < 0.01$, Tukey test

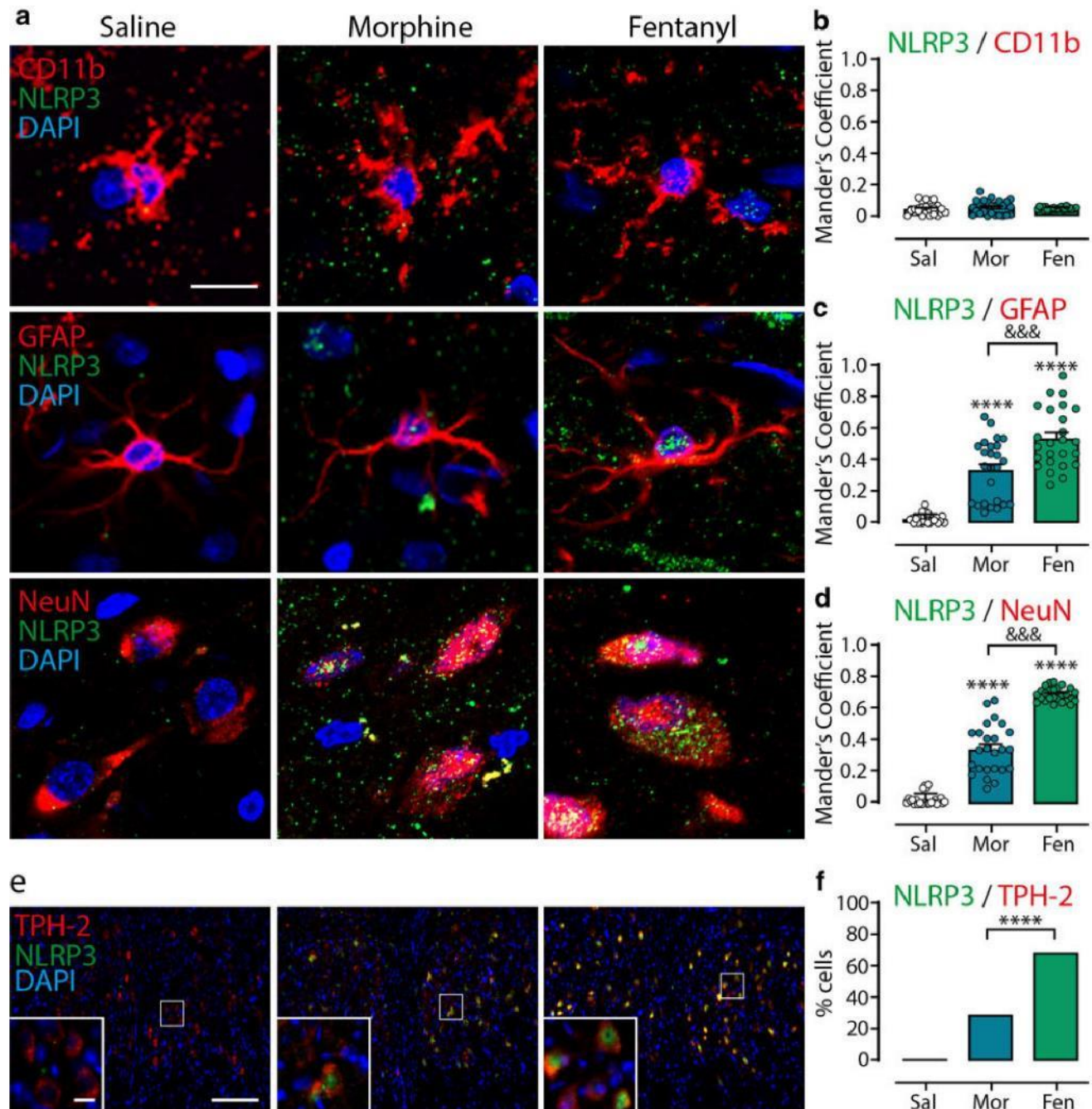


Fig. 4 NLRP3 inflammasome expression induced by morphine or fentanyl in glial and neuronal cell types. **a** Representative confocal images ($40 \times 40 \mu\text{m}$) showing immunoreactivity to NLRP3 inflammasome (green) in microglia (CD11b; red, upper panel), astrocytes (GFAP; red, middle panel) and neurons (NeuN, red, bottom panel) in the DRN of rats administered 19 times with morphine, fentanyl or saline. Scale bar: $10 \mu\text{m}$. **b–d** Mander's overlapping coefficient for NLRP3/CD11b, NLRP3/GFAP and NLRP3/NeuN. Each bar repre-

sents the mean \pm SEM of $n_{\text{cells/animals}} = 25/3$. **** $p < 0.0001$ versus control group; &&& $p < 0.001$, Tukey test. **e** Representative images showing immunoreactivity to NLRP3 inflammasome (green) in serotonergic neurons (TPH-2; red) of saline, morphine and fentanyl groups. Scale bar: $100 \mu\text{m}$ for complete images and $10 \mu\text{m}$ for magnifications. **f** Proportion of serotonergic neurons expressing NLRP3 inflammasome ($n_{\text{morphine}} = 592$ cells, $n_{\text{fentanyl}} = 863$ cells obtained from 9 slices from 3 different animals. **** $p < 0.0001$, Fisher's exact test

overlapping coefficient indicated higher NLRP3 expression in astrocytes ($F_{(2,48)} = 56.61$; $p < 0.0001$; Fig. 4c) and neurons ($F_{(2,48)} = 330.5$; $p < 0.0001$; Fig. 4d) from animals

treated with fentanyl as compared to those treated with morphine. Because 70–80% of serotonergic neuronal somas are located in DRN (Baker et al. 1991), we also did

a double immunofluorescence for NLRP3 and the rate-limiting enzyme for serotonin synthesis, TPH-2. Of the total cells expressing NLRP3 in DRN, the proportion of TPH-2 positive cells was significantly higher in the group repeatedly treated with fentanyl than in the group that received morphine (579/836 cells (69.3%) vs. 176/592 cells (29.7%)); $p < 0.0001$; Fisher's exact test; Fig. 4e, f).

Repeated Morphine or Fentanyl Administration Induces Caspase-1 and GSDMD-N Expression

To study if repeated morphine or fentanyl treatment induced NLRP3 oligomerization and functionality, we determined co-expression of NLRP3 and caspase-1 in DRN. While we observed basal expression of caspase-1 and NLRP3 in few cells (3.5 ± 1.2 cells per field) in saline-treated animals (Fig. 5), the repeated administration of either morphine or fentanyl significantly increased the number of NLRP3 and

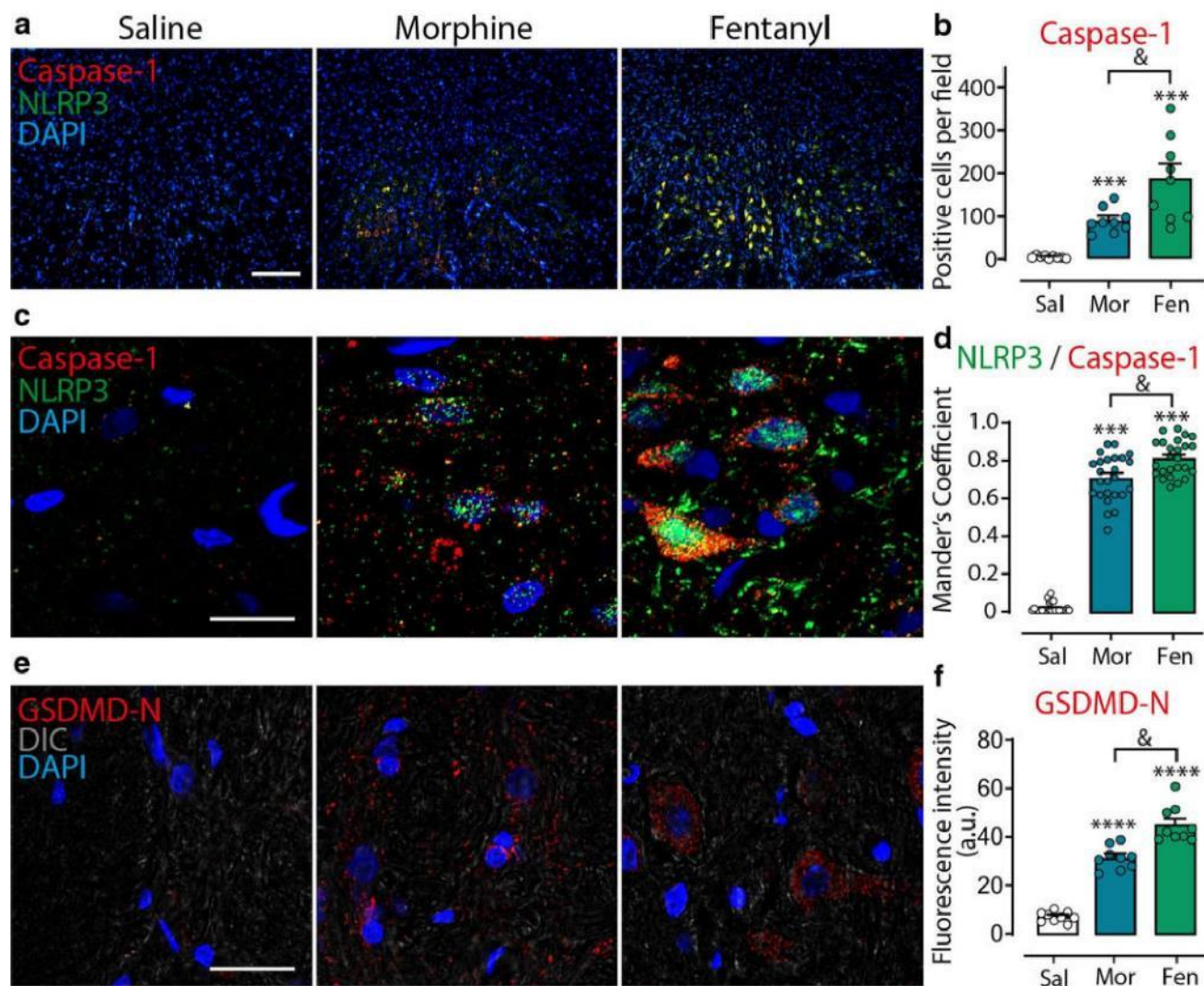


Fig. 5 Caspase-1 and GSDMD-N expression induced by morphine or fentanyl repeated administration. **a** Representative confocal images ($600 \times 500 \mu\text{m}$) showing immunoreactivity of NLRP3 (green) and caspase-1 (red) in the DRN of rats treated 19 \times with saline, 10 mg/kg morphine or 0.1 mg/kg fentanyl. Scale bar: 100 μm . **b** Number of caspase-1 positive cells. Each bar represents the mean \pm SEM of $n_{\text{cells/animals}} = 25/3$. **c** Representative confocal images ($40 \times 40 \mu\text{m}$) showing immunoreactivity to NLRP3 and caspase-1 in the DRN of saline, morphine and fentanyl groups. Scale bar: 10 μm .

d Mander's overlapping coefficient for caspase-1 and NLRP3. Each bar represents the mean \pm SEM of $n_{\text{cells/animals}} = 25/3$. **e** Representative confocal images ($40 \times 40 \mu\text{m}$) showing immunoreactivity to GSDMD-N (red) and differential interference contrast (DIC) in the DRN of saline-, morphine- and fentanyl-treated groups. Scale bar: 10 μm . **f** Mean fluorescence intensity of GSDMD-N. Each bar represents the mean \pm SEM of $n_{\text{slices/animals}} = 9/3$ per group. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ versus control group; & $p < 0.05$, Tukey test

caspace-1 positive cells ($F_{(2,24)}=19.66$; $p<0.0001$; Fig. 5a), fentanyl having greater effect (Fig. 5b). The Mander's overlapping coefficient indicated high co-localization of both proteins in opioid-treated groups as compared with control conditions ($F_{(2,72)}=634.2$; $p<0.0001$; Fig. 5c, d). To explore the possibility that NLRP3 activation was linked to pyroptotic cell death, we also determined GSDMD-N expression in DRN and found a very low number of GSDMD-N positive cells in tissues from saline-treated animals (Fig. 5e). Both opioids significantly induced the expression of GSDMD-N ($F_{(2,24)}=121.2$; $p<0.0001$) but, as in previous experiments, fentanyl produced larger effects (Fig. 5f).

Differential Participation of Opioid and TLR4 Receptors on Opioid-Dependent NLRP3 Expression

In order to identify the receptors involved in the observed opioid-dependent neuroinflammation, an experiment was designed using (–)-naloxone to antagonize opioid receptors and (+)-naloxone to block TLR4 receptors (Wang et al. 2016). We found that neither (–)-naloxone nor (+)-naloxone altered NLRP3, CD11b or GFAP basal expression levels ($F_{(2,24)}=2.184$; $p=0.13$; white bars; Fig. 6). As we previously mentioned, both morphine and fentanyl significantly increased the number of NLRP3 positive cells. This increase was blocked by pre-treatment with (–)-naloxone, but not (+)-naloxone (Fig. 6a). Similarly, (–)-naloxone prevented the increase in CD11b positive cells produced by morphine or fentanyl, while (+)-naloxone had no effect (Fig. 6b). In contrast, the increase in fluorescence intensity to GFAP caused by morphine and fentanyl was prevented only by (+)-naloxone (Fig. 6c).

Minocycline and MCC950 Delay the Development of Tolerance Produced by Repeated Administration of Morphine or Fentanyl and Prevent Fentanyl-Induced Hyperalgesia

Once determining the neuroinflammatory actions of morphine and fentanyl, we tested if tolerance to opioid antinociceptive effects and fentanyl-induced hyperalgesia could be prevented by the anti-inflammatory drug minocycline or by MCC950, a selective compound that averts NLRP3 inflammasome activation. To do this, we gave minocycline or MCC950 once a day (Fig. 1) and found that both inhibitors delayed tolerance development to morphine or fentanyl (Table 2). To further compare the effects of the two inhibitors tested, we analyzed the antinociception produced by the 19th administration of each opioid alone (dashed lines, Fig. 7), or with either minocycline or MCC950. Morphine reached E_{max} values above 70% and 85% when minocycline or MCC950 were used, in contrast with the less than 50% E_{max} observed

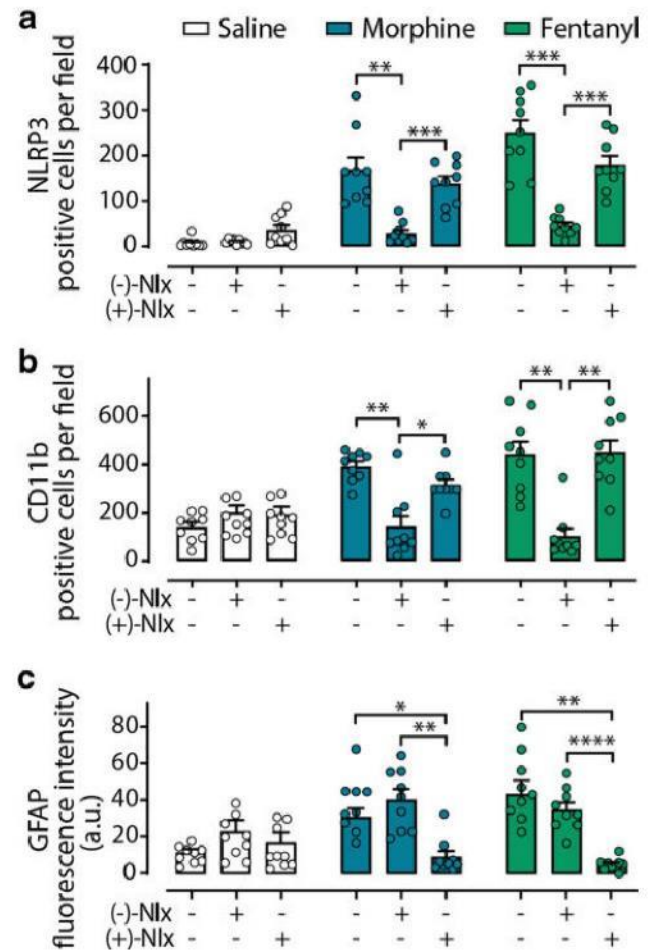


Fig. 6 Antagonism of morphine and fentanyl neuroinflammatory effects with (–)-naloxone or (+)-naloxone. **a** Number of NLRP3 positive cells in DRN of animals injected 19× with saline alone or pretreated (– 20 min) with 10 mg/kg (–)-naloxone or 10 mg/kg (+)-naloxone before each saline injection ($F_{(2,24)}=2.18$, $p=0.135$); same for rats treated with 10 mg/kg morphine ($F_{(2,24)}=15.48$, $p<0.001$) or 0.1 mg/kg fentanyl ($F_{(2,24)}=27.50$, $p<0.0001$). **b** Number of CD11b positive cells in the same groups described in (a) (saline: $F_{(2,24)}=1.53$, $p=0.238$; morphine: $F_{(2,24)}=17.15$, $p<0.0001$; fentanyl: $F_{(2,24)}=19.6$, $p<0.0001$). **c** Mean fluorescence intensity to GFAP in the same groups described in (a) and (b) (saline: $F_{(2,24)}=1.49$, $p=0.245$; morphine: $F_{(2,24)}=12.04$, $p=0.0002$; fentanyl: $F_{(2,24)}=16.74$, $p<0.0001$). Each bar represents the mean \pm SEM of $n_{\text{slices/animals}}=9/3$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$; Tukey test

with morphine alone ($F_{(2,23)}=4.19$; $p=0.028$; Fig. 7a). Similar results were observed when AUC values were compared ($F_{(2,23)}=4.69$; $p=0.019$). These results indicate that minocycline and MCC950 had similar effects in morphine treated groups (Fig. 7b, c). As to fentanyl, minocycline and MCC950 did not change the tolerance produced by this opioid in terms of E_{max} ($F_{(2,23)}=0.7$; $p=0.505$; Fig. 7e), but they did in terms of AUC values ($F_{(2,23)}=9.4$; $p=0.001$; Fig. 7f). Moreover, fentanyl-induced hyperalgesia did not occur in animals treated with minocycline or

Table 2 Maximal response (E_{\max}) and area under the curve (AUC) values corresponding to the time course of antinociceptive evaluation during 120 min in the tail-flick test

Treatment	E_{\max}	AUC	Treatment	E_{\max}	AUC
Mor 1x	94.77 ± 3.6	9651 ± 554.3	Fen 1x	92.31 ± 5.6	6417 ± 729.4
Mor 7x	86.51 ± 4.7	6242 ± 537.2**	Fen 7x	75.97 ± 7.2	3512 ± 746 ^{&}
Mor 19x	45.93 ± 11****	3196 ± 516****	Fen 19x	68.34 ± 10.6	1896 ± 383.8 ^{&&&&}
Mino + Mor 1x	89.06 ± 5.1	8437 ± 982.6	Fen + Mino 1x	91.64 ± 5.8	6669 ± 842.5
Mino + Mor 7x	87.44 ± 6.9	8345 ± 780.6	Fen + Mino 7x	96.76 ± 1.7	6827 ± 751.2
Mino + Mor 19x	71.19 ± 10.2	5869 ± 955.7**	Fen + Mino 19x	84.41 ± 6.1	5266 ± 714.4
MCC + Mor 1x	100	10,741 ± 331.1	Fen + MCC 1x	95.69 ± 3.2	8294 ± 613.4
MCC + Mor 7x	100	8950 ± 591.0	Fen + MCC 7x	82.87 ± 7.5	7711 ± 876.2
MCC + Mor 19x	85.15 ± 7.2	6119 ± 880.4**	Fen + MCC 19x	68.66 ± 13.7	4158 ± 652.2

Data are expressed as mean ± SEM

E_{\max} morphine: time: $F_{(2,69)}=14.37$, $p<0.0001$; treatment: $F_{(2,69)}=6.37$, $p=0.0029$; interaction: $F_{(4,69)}=2.27$, $p=0.07$; E_{\max} fentanyl: time: $F_{(2,69)}=4.62$, $p=0.013$; treatment: $F_{(2,69)}=1.88$, $p=0.15$; interaction: $F_{(4,69)}=0.68$, $p=0.6$; AUC morphine: time: $F_{(2,69)}=32.62$, $p<0.0001$; treatment: $F_{(2,69)}=8.14$, $p=0.0007$; interaction: $F_{(4,69)}=2.36$, $p=0.06$; AUC fentanyl: time: $F_{(2,69)}=17.32$, $p<0.0001$; treatment: $F_{(2,69)}=14.11$, $p<0.0001$; interaction: $F_{(4,69)}=2.24$, $p=0.07$

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$ vs Mor 1x; [&] $p<0.05$, ^{&&&&} $p<0.0001$ vs Fen 1x; Two-way ANOVA followed by Dunnett's test

MCC950 ($p=0.31$ and $p=0.38$, respectively; one-sample Wilcoxon rank-sum test).

MCC950 prevents NLRP3 Inflammasome Oligomerization in DRN in Rats Repeatedly Injected with Morphine or Fentanyl

Once we found that MCC950 was effective in delaying opioid antinociceptive tolerance, we tested the effects of MCC950 on NLRP3 expression in DRN in rats that received 19 administrations of saline, morphine or fentanyl and were co-treated with MCC950. MCC950 had no effect on saline-treated animals, but prevented the increase in NLRP3 induced by morphine or fentanyl ($F_{(5,48)}=24.22$; $p<0.0001$; Fig. 7g). The inhibitory effect of MCC950 was more evident on fentanyl-treated animals, where the number of NLRP3 positive cells diminished by 72.8% compared with those treated with morphine (64.6%). We did not find differences in NLRP3 oligomerization among the three groups treated with MCC950 ($F_{(2,16)}=2.66$; $p=0.99$; Fig. 7g, h).

Discussion

Previous studies have shown that tolerance to the antinociceptive effects of morphine in rats can be attenuated by anti-inflammatory drugs, thus suggesting that neuroinflammation contributes to morphine actions (Harada et al. 2013; Mika et al. 2009), but no studies have been conducted for other opioids. Here we demonstrate that repeated administration of morphine or fentanyl produces differential expression of neuroinflammatory molecular markers, reflecting dissimilar activation of microglia and astrocytes, as well as

NLRP3-dependent pyroptosis in specific cell types in the DRN by a mechanism involving opioid and TLR4 receptors. The differences between morphine and fentanyl to produce tolerance or hyperalgesia are related to their different efficacy to produce neuroinflammation (Fig. 8).

In the present study, we showed that while morphine-induced antinociception decreased in magnitude and duration with its repeated administration, fentanyl produced a transient antinociceptive effect followed by hyperalgesia. These findings further support previous results showing that fentanyl induces less tolerance than morphine (Bobeck et al. 2012; Molina-Martínez et al. 2014). While it has been reported that hyperalgesia is influenced by the experimental conditions in which chronic morphine or fentanyl are administered (Célèrier et al. 2000; Mao et al. 1995), we observed hyperalgesia induced by chronic administration of fentanyl, but not by morphine, under our tested experimental conditions. These findings from animal models are in line with clinical observation showing that repeated opioid administration induces analgesic tolerance and hyperalgesia, depending both on the opioid employed and on the administration schedule (Hayhurst and Durieux 2016).

Given the observed differences between opioids on tolerance development and hyperalgesia, we hypothesized that morphine and fentanyl also differ in their ability to induce neuroinflammation in the DRN. To test this hypothesis, we determined the effects of repeated administration of morphine or fentanyl on neuroinflammation, and compared them with those induced by LPS (Fig. 3a and Supplementary Fig. S1). By analyzing activation of microglia and astrocytes, and NLRP3 expression, we found that both morphine and fentanyl injection induced activation of astrocyte and microglia; activation that was similar in magnitude, but different in

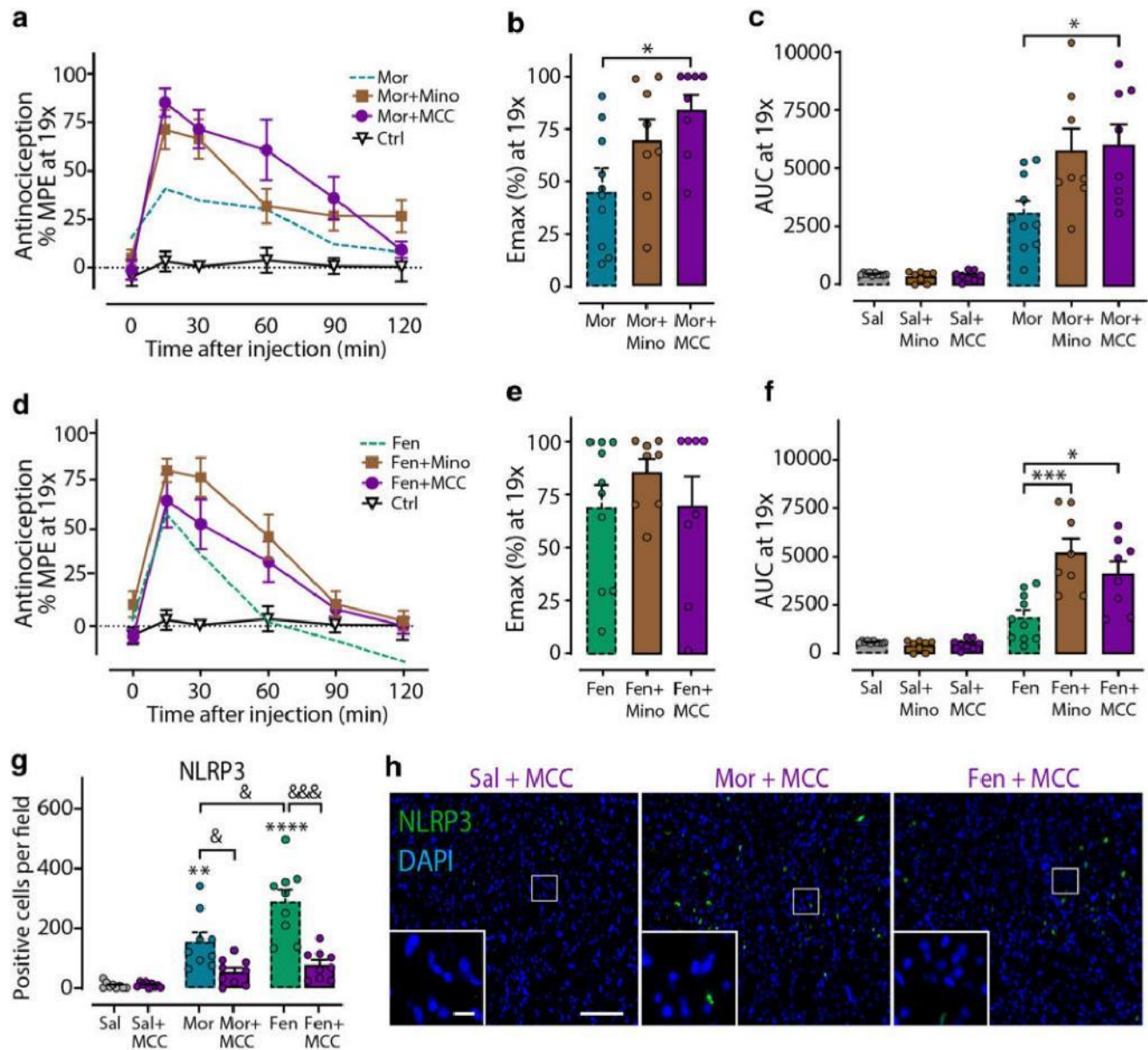


Fig. 7 Effects of minocycline or MCC950 administration on morphine and fentanyl nociceptive effects and NLRP3 expression. **a, d** Time course (2 h) of the antinociceptive effects produced by the 19th administrations of 10 mg/kg morphine or 0.1 mg/kg fentanyl in rats that received 30 mg/kg minocycline (Mino) or 5 mg/kg MCC950 (MCC) once a day. For comparison purposes, dashed lines show the time course corresponding to the 19th administration of morphine or fentanyl by themselves. **b, e** Maximum antinociceptive effects (Emax) produced by morphine or fentanyl with or without minocycline or MCC co-treatment. **c, f** Area under the curve (AUC) corresponding to the antinociception produced by each opioid along the 2-h observa-

tion period. Each point/bar corresponds to the mean \pm SEM of $n=8$. $*p<0.05$, $***p<0.001$ for comparison between groups, Tukey test. **g** Number of NLRP3 positive cells. Dashed bars indicate quantification for rats treated only with morphine or fentanyl. Each bar represents the mean \pm SEM of $n_{\text{slices/animals}}=9/3$. $*p<0.01$, $****p<0.0001$ versus controls saline-treated control; $\&p<0.05$, $\&\&p<0.001$, Tukey test. **h** Representative confocal images ($600\times 500\ \mu\text{m}$) showing immunoreactivity to NLRP3 inflammasome (green) and nuclei (blue) in the DRN of rats that received 5 mg/kg MCC once a day and 19 administrations of morphine or fentanyl. Scale bar: 100 μm for complete images and 10 μm for magnification

spatial distribution in comparison with the activation produced by a single LPS administration (Supplementary Fig. S1). There is evidence that morphine-induced glial activation occurs in areas related to descending pain control, such as PAG and spinal cord (Doyle et al. 2017; Harada et al.

2013; Posillico et al. 2015). Our results extend these findings to another opioid, fentanyl, and another brain region, DRN. Also, we provide evidence that neuroinflammation is drug-specific because there were regional differences in the activation of glial cells induced by LPS and by opioids.

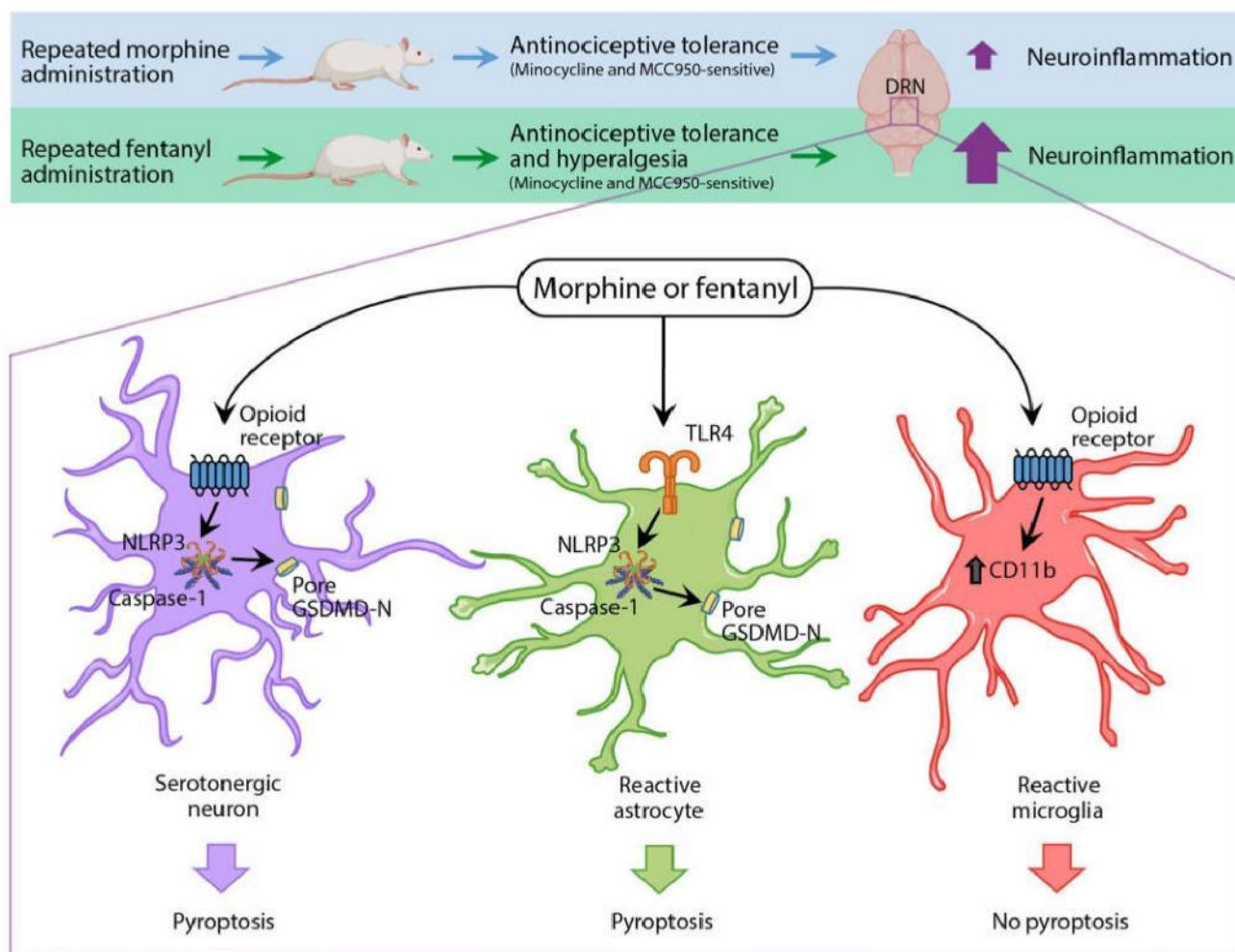


Fig. 8 Relationship between antinociception and neuroinflammation produced after repeated morphine and fentanyl administration. Diagram indicating that differences between morphine and fentanyl to develop antinociceptive tolerance and fentanyl-induced hyperalgesia, could be due to their ability to induce neuroinflammation in the DRN, where fentanyl effects are more evident. After repeated morphine or

fentanyl administration, opioid receptors' activation in serotonergic neurons or TLR4 receptors in astrocytes leads to NLRP3 inflammasome oligomerization, caspase-1 maturation and GSDMD-dependent membrane pore formation. These cellular events lead in turn to pyroptotic cell death accompanied by microglial activation

Microglia cells are derived from early macrophage progenitors that migrate into the brain during embryonic development, while astrocytes are derived from neuronal precursor cells (Ginhoux et al. 2010, 2013; Miller and Gauthier 2007). In this work, we observed that NLRP3 inflammasome was activated after repeated opioid administration only in cells of neuronal origin; i.e., neurons and astrocytes, but not in microglia. It has been reported that LPS induces mature NLRP3 inflammasome expression in peripheral macrophages and monocytes (Awad et al. 2017), cells that arise from the same precursors as microglia (Ginhoux et al. 2010, 2013). However, other studies have found NLRP3 expression in non-immune cells under tissue damage conditions (Debye et al. 2018; von Herrmann et al. 2018). These data indicate that the role of microglia cells could be different when activated by opioids, DAMPs or PAMPS, such as LPS.

Our group and others have studied the pro- and anti-inflammatory actions of opioids on other immune cells. In peritoneal mast cells of mice, acute administration of the same doses of morphine and fentanyl used in the present study inhibits the release of tumor necrosis factor (TNF) produced by LPS administration (Molina-Martínez et al. 2014). In human microglia cultures, acute morphine treatment suppresses LPS-induced chemokine release (Hu et al. 2000). Interestingly, acute fentanyl administration (0.1 μg , i.v.) induces NF- κB activation in monocytes obtained from human blood samples (Compton et al. 2015). In addition, repeated fentanyl administration (4x, 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c., at 15-min intervals) produces pro-inflammatory cytokine release (TNF, IL-1 β and IL-6) and microglia activation in rats (Chang et al. 2018). According to other authors, repeated morphine administration inhibits LPS-induced

NLRP3 and cytokine expression in rats' spleen (Mao et al. 2013), an organ with a large subpopulation of macrophages (Den Haan and Kraal 2012). Together, these data suggest that morphine and fentanyl produce different inflammatory effects depending on the cell type on which they act, and also that fentanyl produces larger pro-inflammatory effects than morphine.

Increased NLRP3 expression caused by fentanyl is associated with higher levels of caspase-1 and increased number of GSDMD-N positive cells, which strongly suggests that cell death by pyroptosis occurs mainly in fentanyl-treated rats. Because fentanyl produces hyperalgesia by the 19th administration and morphine does not, it is reasonable to suggest that cell death may be related not only to tolerance development, but also to hyperalgesia. Following this line of thought, it has been reported that increased neuroinflammation enhances nociceptive transmission (Martyn et al. 2019). Specifically, tolerance to morphine antinociception correlates with an increase in mRNA and protein levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 in spinal cord of rats (Raghavendra et al. 2002). Also, when IL-1 β is intrathecally injected, it increases neuronal excitability and produces hyperalgesia in rats (Gustafson-Vickers et al. 2008; Oka et al. 1993; Reeve et al. 2000). Together, these data support the hypothesis that differences in neuroinflammation observed among opioids are positively correlated with their differences to induce analgesic tolerance and hyperalgesia. To the best of our knowledge, our study is the first to correlate opioid neuroinflammatory and antinociceptive actions.

Previous studies have proposed that morphine-induced neuroinflammation is mediated by both opioid receptors and TLR4 receptors (Hutchinson et al. 2011). Ellis and coworkers showed that morphine (10 mg/kg/day, per 2 weeks) increases pro-inflammatory cytokine release (IL-1 β and TNF) in the spinal cord of rats with allodynia secondary to spinal cord injury, and proposed that this effect was mediated by TLR4 (Ellis et al. 2016). In order to determine whether opioid receptors or TLR4 receptors were involved in the observed neuroinflammation of glial and neuronal cells, we took advantage of the fact that (–)-naloxone is a non-specific opioid receptor antagonist (Lewanowitsch and Irvine 2003), while (+)-naloxone has no affinity for opioid receptors, but acts as a TLR4 receptor antagonist (Hutchinson et al. 2010; Wang et al. 2016). We found that (–)-naloxone, but not (+)-naloxone blocked morphine- and fentanyl-induced microglia activation, as well as NLRP3 expression, evidencing the role of opioid receptors in these effects. Conversely, only (+)-naloxone prevented the increase in GFAP immunoreactivity induced by morphine and fentanyl, which indicates that TLR4 receptors were involved in astrocyte activation. It is worth mentioning that both morphine and fentanyl have affinity for TLR4 receptors (Hutchinson et al. 2011; Wang et al. 2012) and that neurons and glial cells express this

receptor subtype (Nicotra et al. 2012). However, we cannot discard TLR4 receptor activation by products resulting from pyroptotic cell death (Nyström et al. 2013). In this regard, it has been shown that chronic morphine can induce the release of DAMPs such as HMGB1, biglycan and heat shock protein 70 when nerve damage occurs (Grace et al. 2018; Qu et al. 2017; Yu et al. 2010). The findings in the present work showing that blockade of TLR4 receptors prevents astrogliosis, while blockade of opioid receptors prevents opioid-induced microgliosis and NLRP3 expression, indicate that opioids have differential effects on specific cells expressing these receptors. This is the first study showing that opioids produce different pro-inflammatory effects that depend on the specific cell type and receptor on which they act. More studies are needed to identify specific cellular and molecular targets that produce neuroinflammation after chronic opioid treatment.

To study if the tolerance produced by morphine or fentanyl was related to their capacity to produce neuroinflammation, we administered minocycline, which is an antibiotic with potent anti-inflammatory effects due to its inhibitory effect on NF- κ B signaling pathway (Liu et al. 2017; Nikodemova et al. 2006). We did this because other authors have found that minocycline and pentoxifylline attenuate the analgesic tolerance and hyperalgesia produced by morphine in mice (Harada et al. 2013; Mika et al. 2009). Here we found that both morphine and fentanyl produce less tolerance and that fentanyl does not produce hyperalgesia in minocycline-treated rats. This suggests that the neuroinflammatory effects mediated by the NF- κ B signaling pathway contribute to both, tolerance development and hyperalgesia. Also, there is evidence that activation of opioid receptors can trigger NF- κ B transcriptional activity in a neuronal environment (Ho et al. 2009). Because minocycline delays antinociceptive tolerance to morphine and fentanyl, it is reasonable to suppose that the opioid receptor-dependent pyroptosis observed in neurons, as well as the TLR4-dependent pyroptosis seen in astrocytes can be due to NF- κ B activation.

To investigate a more direct correlation between neuroinflammation and antinociceptive tolerance to morphine and fentanyl, we administered MCC950, a very specific NLRP3 oligomerization inhibitor (Coll et al. 2019) that effectively crosses the blood–brain barrier when administered orally or intraperitoneally (Chen et al. 2017; Gordon et al. 2018). Systemic administration of this drug reduces neuroinflammation in animal models of brain damage (Dempsey et al. 2017; Xu et al. 2018) and attenuates inflammatory pain (Chen et al. 2019). In our study, we show that MCC950 prevents NLRP3 oligomerization in DRN induced by repeated morphine or fentanyl administration. Also, MCC950 delays antinociceptive tolerance induced by morphine or fentanyl and the hyperalgesia induced by fentanyl. These data suggest that neuroinflammation and tolerance development to morphine

or fentanyl are directly correlated. Also, they provide evidence that NLRP3 inhibition could represent a novel therapeutic strategy to avoid opioid neuroinflammatory effects.

A limitation of this work is that we studied only male rats. Several studies have demonstrated that there are sex differences in opioid effects. For example, morphine is a more potent analgesic drug and develops more tolerance in males than in female rats (Craft et al. 1999). Here, we compare two opioids with similar analgesic effects and different ability to induce tolerance under the same administration schedule. Similar experiments need to be conducted in female animals using a specifically determined administration schedule due to the above-mentioned differences between males and females in opioid effects. We cannot discard the possibility that these differences in neuroimmune responses could contribute to sex differences in opioid-induced antinociception and tolerance development, but this topic must be addressed in a systematic way and for individual opioids (Doyle and Murphy 2017).

Conclusion

Repeated administration of morphine or fentanyl causes robust astrogliosis and microgliosis as well as a differential NLRP3-dependent pyroptosis in the DRN. Under identical experimental conditions, morphine produces more tolerance than fentanyl, while only fentanyl induces hyperalgesia. Opioid receptors are involved in neuronal pyroptosis and TLR4 receptors, in astrogliosis. This suggests that opioids target both receptor types in different cells to modulate specific neuroimmune responses. The finding that the NLRP3 inhibitor MCC950 and the anti-inflammatory drug minocycline delay both opioid-induced analgesia and fentanyl-induced hyperalgesia suggests that differences in neuroinflammation could determine the differences in the development of tolerance to each of these opioids and that both processes involve NF- κ B and NLRP3 activation.

Acknowledgements Authors wish to thank Mr. Abraham Contreras for animal care and technical assistance. This work is derived from César J. Carranza-Aguilar PhD dissertation.

Author Contributions Authors SLC, CGE and CJCA designed the study. Authors CJCA and AHM carried out the antinociceptive test, immunofluorescence, imaging and the analysis of data set. Authors AHM and CMA were involved in immunofluorescence experiments and images acquisition. Author KCR synthesized (+)-naloxone. Authors SLC, CGE and MM provided drugs, reagents, equipment and, contributed to interpretation of results. The draft manuscript was written by CJCA. All authors contributed to and approved the final manuscript.

Funding The research leading to these results received funding from Grant 101 SEP-Cinvestav (SLC and CJCA) and scholarship 338376

(CJCA) from the National Council of Science and Technology (Conacyt, México).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Abrams JK, Johnson PL, Hollis JH, Lowry CA (2004) Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci* 1018:46–57. <https://doi.org/10.1196/annals.1296.005>
- Al-Hasani R, Bruchas MR (2011) Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signalling and behaviour. *Anesthesiology* 115:1363–1381. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318238bba6.Molecular>
- Awad F, Assrawi E, Jumeau C, Georgin-Lavialle S, Cobret L, Duquesnoy P, Piterboth W, Thomas L, Stankovic-Stojanovic K, Louvrier C, Giurgea I, Grateau G, Amselem S, Karabina S-A (2017) Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. *PLoS ONE* 12:e0175336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175336>
- Baker KG, Halliday GM, Hornung JP, Geffen LB, Cotton RG, Törk I (1991) Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 42:757–775. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90043-n](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90043-n)
- Bardin L, Colpaert FC (2004) Role of spinal 5-HT1A receptors in morphine analgesia and tolerance in rats. *Eur J Pain* 8:253–261. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2003.09.002>
- Bobeck EN, Haseman RA, Hong D, Ingram SL, Morgan MM (2012) Differential development of antinociceptive tolerance to morphine and fentanyl is not linked to efficacy in the ventrolateral periaqueductal gray of the rat. *J Pain* 13:799–807. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2012.05.005>
- Cai Y, Kong H, Pan Y-B, Jiang L, Pan X-X, Hu L, Qian Y-N, Jiang C-Y, Liu W-T (2016) Procyanidins alleviates morphine tolerance by inhibiting activation of NLRP3 inflammasome in microglia. *J Neuroinflammation* 13:53. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0520-z>
- Campion KN, Saville KA, Morgan MM (2016) Relative contribution of the dorsal raphe nucleus and ventrolateral periaqueductal gray to morphine antinociception and tolerance in the rat. *Eur J Neurosci* 44:2667–2672. <https://doi.org/10.1111/ejn.13378>
- Célèrier E, Rivat C, Jun Y, Laulin JP, Larcher A, Reynier P, Simonnet G (2000) Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: preventive effect of ketamine. *Anesthesiology* 92:465–472. <https://doi.org/10.1097/0000542-200002000-00029>
- Cesselin F (1995) Opioid and anti-opioid peptides. *Fundam Clin Pharmacol* 9:409–433. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.1995.tb00517.x>
- Chang L, Ye F, Luo Q, Tao Y, Shu H (2018) Increased hyperalgesia and proinflammatory cytokines in the spinal cord and dorsal root ganglion after surgery and/or fentanyl administration in rats. *Anesth Analg* 126:289–297. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002601>
- Chen S-P, Zhou Y-Q, Wang X-M, Sun J, Cao F, HaiSam S, Ye D-W, Tian Y-K (2019) Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome as a potential target for cancer-induced bone pain. *Pharmacol Res* 147:104339. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104339>

- Chen W, Foo S-S, Zaid A, Teng T-S, Herrero LJ, Wolf S, Tharmarajah K, Vu LD, van Vreden C, Taylor A, Freitas JR, Li RW, Woodruff TM, Gordon R, Ojcius DM, Nakaya HI, Kanneganti T-D, O'Neill LAJ, Robertson AAB, King NJ, Suhrbier A, Cooper MA, Ng LFP, Mahalingam S (2017) Specific inhibition of NLRP3 in chikungunya disease reveals a role for inflammasomes in alphavirus-induced inflammation. *Nat Microbiol* 2:1435–1445. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0015-4>
- Chen YL, Law P-Y, Loh HH (2006) Nuclear factor κ B signaling in opioid functions and receptor gene expression. *J Neuroimmune Pharmacol* 1:270–279. <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9028-0>
- Coll RC, Hill JR, Day CJ, Zamoshnikova A, Boucher D, Massey NL, Chitty JL, Fraser JA, Jennings MP, Robertson AAB, Schroder K (2019) MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nat Chem Biol* 15:556–559. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0277-7>
- Colovic M, Caccia S (2003) Liquid chromatographic determination of minocycline in brain-to-plasma distribution studies in the rat. *J Chromatogr B* 791:337–343. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00247-2](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00247-2)
- Compton P, Griffis C, Breen EC, Torrington M, Sadakane R, Tefera E, Irwin MR (2015) Opioid treatment of experimental pain activates nuclear factor- κ B. *J Opioid Manag* 11:115–125. <https://doi.org/10.5055/jom.2015.0261>
- Craft RM, Stratmann JA, Bartok RE, Walpole TI, King SJ (1999) Sex differences in development of morphine tolerance and dependence in the rat. *Psychopharmacology* 143:1–7. <https://doi.org/10.1007/s002130050911>
- Debye B, Schmülling L, Zhou L, Rune G, Beyer C, Johann S (2018) Neurodegeneration and NLRP3 inflammasome expression in the anterior thalamus of SOD1(G93A) ALS mice. *Brain Pathol* 28:14–27. <https://doi.org/10.1111/bpa.12467>
- Dempsey C, Rubio Araiz A, Bryson KJ, Finucane O, Larkin C, Mills EL, Robertson AAB, Cooper MA, O'Neill LAJ, Lynch MA (2017) Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid- β and cognitive function in APP/PS1 mice. *Brain Behav Immun* 61:306–316. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.12.014>
- Den Haan JMM, Kraal G (2012) Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. *J Innate Immun* 4:437–445. <https://doi.org/10.1159/000335216>
- Doyle HH, Eidson LN, Sinkiewicz DM, Murphy AZ (2017) Sex differences in microglia activity within the periaqueductal gray of the rat: a potential mechanism driving the dimorphic effects of morphine. *J Neurosci* 37:3202–3214. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2906-16.2017>
- Doyle HH, Murphy AZ (2017) Sex differences in innate immunity and its impact on opioid pharmacology. *J Neurosci Res* 95:487–499. <https://doi.org/10.1002/jnr.23852>
- Ellis A, Grace PM, Wieseler J, Favret J, Springer K, Skarda B, Ayala M, Hutchinson MR, Falci S, Rice KC, Maier SF, Watkins LR (2016) Morphine amplifies mechanical allodynia via TLR4 in a rat model of spinal cord injury. *Brain Behav Immun* 58:348–356. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.08.004>
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330:841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T (2013) Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* 7:45. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00045>
- Gordon R, Albornoz EA, Christie DC, Langley MR, Kumar V, Mantovani S, Robertson AAB, Butler MS, Rowe DB, O'Neill LA, Kanthasamy AG, Schroder K, Cooper MA, Woodruff TM (2018) Inflammasome inhibition prevents α -synuclein pathology and dopaminergic neurodegeneration in mice. *Sci. Transl. Med.* <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah4066>
- Grace PM, Strand KA, Galer EL, Rice KC, Maier SF, Watkins LR (2018) Protraction of neuropathic pain by morphine is mediated by spinal damage associated molecular patterns (DAMPs) in male rats. *Brain Behav Immun* 72:45–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.08.018>
- Grace PM, Strand KA, Galer EL, Urban DJ, Wang X, Baratta MV, Fabisiak TJ, Anderson ND, Cheng K, Greene LI, Berkelhammer D, Zhang Y, Ellis AL, Yin HH, Campeau S, Rice KC, Roth BL, Maier SF, Watkins LR (2016) Morphine paradoxically prolongs neuropathic pain in rats by amplifying spinal NLRP3 inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci* 113:E3441–E3450. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602070113>
- Guo H, Callaway JB, Ting JPY (2015) Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med* 21:677–687. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>
- Gustafson-Vickers SL, Van Lu B, Lai AY, Todd KG, Ballanyi K, Smith PA (2008) Long-term actions of interleukin- 1β on delay and tonic firing neurons in rat superficial dorsal horn and their relevance to central sensitization. *J Mol Pain*. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-63>
- Haleem DJ (2018) Serotonin-1A receptor dependent modulation of pain and reward for improving therapy of chronic pain. *Pharmacol Res* 134:212–219. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.06.030>
- Harada S, Nakamoto K, Tokuyama S (2013) The involvement of mid-brain astrocyte in the development of morphine tolerance. *Life Sci* 93:573–578. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.009>
- Hayhurst CJ, Durieux ME (2016) Differential opioid tolerance and opioid-induced hyperalgesia: a clinical reality. *Anesthesiology* 124:483–488. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000963>
- Ho MKC, Su Y, Yeung WWS, Wong YH (2009) Regulation of transcription factors by heterotrimeric G proteins. *Curr Mol Pharmacol* 2:19–31. <https://doi.org/10.2174/1874467210902010019>
- Hornung J-P (2012) Raphe nuclei. In: *The human nervous system*. Elsevier, pp. 401–424. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-37423-6-0.10011-2>
- Hu S, Chao CC, Hegg CC, Thayer S, Peterson PK (2000) Morphine inhibits human microglial cell production of, and migration towards RANTES. *J Psychopharmacol* 14:238–243. <https://doi.org/10.1177/026988110001400307>
- Hutchinson MR, Shavit Y, Grace PM, Rice KC, Maier SF, Watkins LR (2011) Exploring the neuroimmunopharmacology of opioids: an integrative review of mechanisms of central immune signaling and their implications for opioid analgesia. *Pharmacol Rev* 63:772–810. <https://doi.org/10.1124/pr.110.004135>
- Hutchinson MR, Zhang Y, Shridhar M, Evans JH, Buchanan MM, Zhao TX, Slivka PF, Coats BD, Rezvani N, Wieseler J, Hughes TS, Landgraf KE, Chan S, Fong S, Phipps S, Falke JJ, Leinwand LA, Maier SF, Yin H, Rice KC, Watkins LR (2010) Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain Behav Immun* 24:83–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.08.004>
- Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72:165–230. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.165>
- Kaneto H, Yamazaki A, Kihara T (1985) Evidence for the dissociation of morphine analgesia, tolerance and dependence. *J Pharm Pharmacol* 37:507–508. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1985.tb03054.x>
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 8:e1000412. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>
- Kim JK, Jin HS, Suh H-W, Jo E-K (2017) Negative regulators and their mechanisms in NLRP3 inflammasome activation

- and signaling. *Immunol Cell Biol* 95:584–592. <https://doi.org/10.1038/icb.2017.23>
- Lamkanfi M, Dixit VM (2010) Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe* 8:44–54. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.007>
- Lewanowitsch T, Irvine RJ (2003) Naloxone and its quaternary derivative, naloxone methiodide, have differing affinities for μ , δ , and κ opioid receptors in mouse brain homogenates. *Brain Res* 964:302–305. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04117-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04117-3)
- Lin C-P, Lu D-H (2018) Role of neuroinflammation in opioid tolerance: translational evidence from human-to-rodent studies. In: *Advances in experimental medicine and biology*, pp. 125–139. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1756-9_11
- Lin H-Y, Chang Y-Y, Kao M-C, Huang C-J (2017) Naloxone inhibits nod-like receptor protein 3 inflammasome. *J Surg Res* 219:72–77. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.05.119>
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C (2017) NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2:17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Liu Z, Wang C, Rathkey JK, Yang J, Dubyak GR, Abbott DW, Xiao TS (2018) Structures of the gasdermin D C-terminal domains reveal mechanisms of autoinhibition. *Structure* 26:778–784.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.03.002>
- Lueptow LM, Fakira AK, Bobeck EN (2018) The Contribution of the Descending pain modulatory pathway in opioid tolerance. *Front Neurosci* 12:886. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00886>
- Mao J, Price DD, Mayer DJ (1995) Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: a current view of their possible interactions. *Pain* 62:259–274. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(95\)00073-2](https://doi.org/10.1016/0304-3959(95)00073-2)
- Mao X, Sarkar S, Chang SL (2013) Involvement of the NLRP3 inflammasome in the modulation of an LPS-induced inflammatory response during morphine tolerance. *Drug Alcohol Depend* 132:38–46. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.12.022>
- Martyn JAJ, Mao J, Bittner EA (2019) Opioid tolerance in critical illness. *N Engl J Med* 380:365–378. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1800222>
- Masters SL (2013) Specific inflammasomes in complex diseases. *Clin Immunol* 147:223–228. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.12.006>
- Mayer DJ, Mao J (1999) Mechanisms of opioid tolerance. *Pain Forum* 8:14–18. [https://doi.org/10.1016/S1082-3174\(99\)70014-0](https://doi.org/10.1016/S1082-3174(99)70014-0)
- Mélik Parsadaniantz S, Rivat C, Rostène W, Réaux-Le Goazigo A (2015) Opioid and chemokine receptor crosstalk: a promising target for pain therapy? *Nat Rev Neurosci* 16:69–78. <https://doi.org/10.1038/nrn3858>
- Mika J, Wawrzczak-Bargiela A, Osikowicz M, Makuch W, Przewlocka B (2009) Attenuation of morphine tolerance by minocycline and pentoxifylline in naive and neuropathic mice. *Brain Behav Immun* 23:75–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.07.005>
- Miller FD, Gauthier AS (2007) Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* 54:357–369. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.019>
- Molina-Martínez LM, González-Espinosa C, Cruz SL (2014) Dissociation of immunosuppressive and nociceptive effects of fentanyl, but not morphine, after repeated administration in mice: Fentanyl-induced sensitization to LPS. *Brain Behav Immun* 42:60–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.06.011>
- Nicotra L, Loram LC, Watkins LR, Hutchinson MR (2012) Toll-like receptors in chronic pain. *Exp Neurol* 234:316–329. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.09.038>
- NIH (2011) Guide for the care and use of laboratory animals. In: Eighth Ed. (ed.). National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academies Press, Washington, D.C. <https://doi.org/10.17226/12910>
- Nikodemova M, Duncan ID, Watters JJ (2006) Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and κ B α degradation in a stimulus-specific manner in microglia. *J Neurochem* 96:314–323. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03520.x>
- Nyström S, Antoine DJ, Lundbäck P, Lock JG, Nita AF, Högstrand K, Grandien A, Erlandsson-Harris H, Andersson U, Applequist SE (2013) TLR activation regulates damage-associated molecular pattern isoforms released during pyroptosis. *EMBO J* 32:86–99. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.328>
- Oka T, Aou S, Hori T (1993) Intracerebroventricular injection of interleukin-1 β induces hyperalgesia in rats. *Brain Res* 624:61–68. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90060-Z](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90060-Z)
- Paxinos G, Watson C (2009) The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier/Academic, San Diego
- Posillico CK, Terasaki LS, Bilbo SD, Schwarz JM (2015) Examination of sex and minocycline treatment on acute morphine-induced analgesia and inflammatory gene expression along the pain pathway in Sprague-Dawley rats. *Biol Sex Differ* 6:33. <https://doi.org/10.1186/s13293-015-0049-3>
- Qing-Ping W, Nakai Y (1994) The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. *Brain Res Bull* 34:575–585. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(94\)90143-0](https://doi.org/10.1016/0361-9230(94)90143-0)
- Qu J, Tao X-Y, Teng P, Zhang Y, Guo C-L, Hu L, Qian Y-N, Jiang C-Y, Liu W-T (2017) Blocking ATP-sensitive potassium channel alleviates morphine tolerance by inhibiting HSP70-TLR4-NLRP3-mediated neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 14:228. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0997-0>
- Raghavendra V, Rutkowski MD, Deleo JA (2002) The role of spinal neuroimmune activation in morphine tolerance/hyperalgesia in neuropathic and sham-operated rats. *J Neurosci* 22:9980–9989. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-22-09980.2002>
- Rathinam VAK, Zhao Y, Shao F (2019) Innate immunity to intracellular LPS. *Nat Immunol* 20:527–533. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0368-3>
- Reeve AJ, Patel S, Fox A, Walker K, Urban L (2000) Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. *Eur J Pain* 4:247–257. <https://doi.org/10.1053/eujp.2000.0177>
- Schaefer CP, Tome ME, Davis TP (2017) The opioid epidemic: a central role for the blood brain barrier in opioid analgesia and abuse. *Fluids Barriers CNS* 14:32. <https://doi.org/10.1186/s12987-017-0080-3>
- Shavit Y, Wolf G, Goshen I, Livshits D, Yirmiya R (2005) Interleukin-1 antagonizes morphine analgesia and underlies morphine tolerance. *Pain* 115:50–59. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.02.003>
- Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F (2015) Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 526:660–665. <https://doi.org/10.1038/nature15514>
- Suzuki J, El-Haddad S (2017) A review: fentanyl and non-pharmaceutical fentanyls. *Drug Alcohol Depend* 171:107–116. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.11.033>
- Taylor DA, Fleming WW (2001) Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids. *J Pharmacol Exp Ther* 297:11–18
- Tortorici V, Robbins CS, Morgan MM (1999) Tolerance to the antinociceptive effect of morphine microinjections into the ventral but not lateral-dorsal periaqueductal gray of the rat. *Behav Neurosci* 113:833–839. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.113.4.833>
- Vardanyan RS, Hrubby VJ (2014) Fentanyl-related compounds and derivatives: current status and future prospects for pharmaceutical applications. *Future Med Chem* 6:385–412. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.215>

- von Herrmann KM, Salas LA, Martinez EM, Young AL, Howard JM, Feldman MS, Christensen BC, Wilkins OM, Lee SL, Hickey WF, Havrda MC (2018) NLRP3 expression in mesencephalic neurons and characterization of a rare NLRP3 polymorphism associated with decreased risk of Parkinson's disease. *NPJ Park Dis* 4:24. <https://doi.org/10.1038/s41531-018-0061-5>
- Wang X, Loram LC, Ramos K, De Jesus AJ, Thomas J, Cheng K, Reddy A, Somogyi AA, Hutchinson MR, Watkins LR, Yin H (2012) Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:6325–6330. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200130109>
- Wang X, Zhang Y, Peng Y, Hutchinson MR, Rice KC, Yin H, Watkins LR (2016) Pharmacological characterization of the opioid inactive isomers (+)-naltrexone and (+)-naloxone as antagonists of toll-like receptor 4. *Br J Pharmacol* 173:856–869. <https://doi.org/10.1111/bph.13394>
- Xu E, Liu J, Wang X, Xiong H (2017) Inflammasome in drug abuse. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 9:165–177
- Xu X, Yin D, Ren H, Gao W, Li F, Sun D, Wu Y, Zhou S, Lyu L, Yang M, Xiong J, Han L, Jiang R, Zhang J (2018) Selective NLRP3 inflammasome inhibitor reduces neuroinflammation and improves long-term neurological outcomes in a murine model of traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 117:15–27. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.05.016>
- Yu L, Wang L, Chen S (2010) Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med* 14:2592–2603. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01127.x>
- Zhang H, Li F, Li W-W, Stary C, Clark JD, Xu S, Xiong X (2016) The inflammasome as a target for pain therapy. *Br J Anaesth* 117:693–707. <https://doi.org/10.1093/bja/aew376>
- Zhang X, Wang J, Yu T, Du D, Jiang W (2015) Minocycline can delay the development of morphine tolerance, but cannot reverse existing tolerance in the maintenance period of neuropathic pain in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 42:94–101. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12316>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas

Types of cell death and their clinical implications

César Javier Carranza-Aguilar,^{*} Ana Karen Ruiz-Quiñonez,[‡]
Claudia González-Espinosa,[§] Silvia L Cruz-Martín-del-Campo[§]

RESUMEN. La muerte celular es un evento importante en el desarrollo embrionario, la renovación de los tejidos y el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Errores en los mecanismos que regulan ese proceso están implicados en patologías como el cáncer, desórdenes neurodegenerativos, enfermedades autoinmunes, entre otras. La apoptosis es el tipo de muerte celular más estudiado debido a su importancia para el funcionamiento del organismo. Otros tipos de muerte celular como la necrosis, la piroptosis o la NETosis pueden producirse en respuesta a la producción de patrones moleculares asociados a patógenos o a daño, y generan una serie de respuestas encaminadas a la reparación tisular que, en ocasiones, tiene consecuencias adversas en el organismo. A lo largo de los años se ha pensado en evitar o inducir la muerte celular como terapia para ciertas patologías; sin embargo, muchos estudios no son concluyentes o arrojan resultados contradictorios. Actualmente existen algunas aproximaciones terapéuticas dirigidas a evitar o aumentar selectivamente la muerte celular para el tratamiento de algunos padecimientos como la enfermedad del Parkinson, cáncer, cirrosis y otras. En este artículo revisamos las características de los distintos tipos de muerte celular y algunas aproximaciones terapéuticas dirigidas a la regulación de tales procesos.

Palabras clave: Muerte celular, apoptosis, piroptosis, necrosis, NETosis.

ABSTRACT. Cell death is important in embryonic development, cell renewal and maintaining homeostasis. However, its malfunction is involved in the development of pathologies such as cancer, neurodegenerative disorders, tissue atrophy, and autoimmune diseases, among others. Apoptosis, or programmed cell death, is the most studied type of cell death and its importance lies in the fact that it is a common process that helps the body to function properly. Other types of cell death, such as necrosis, pyroptosis or NETosis can occur in the presence of molecular patterns associated with pathogens or damage, which produce unwanted responses

* Estudiante de doctorado en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental.

‡ Estudiante de maestría en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental.

§ Investigadora titular.

Departamento de Farmacobiología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del IPN, Sede Sur.

Correspondencia:

César Javier Carranza Aguilar

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Departamento de Farmacobiología, Sede Sur.

Calzada de los Tenorios No. 235,

Col. Granjas Coapa, Alcaldía Tlalpan, C.P. 14330, CDMX.

Tel: (52-55) 54832853,

Fax: (52-55) 54832863

E-mail: cesar.carranza@cinvestav.mx

Recibido: 20 de Julio de 2020.

Aceptado: 28 de Agosto de 2020.

Conflicto de Intereses: Todos los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses con respecto a la publicación de este artículo.

Citar como: Carranza-Aguilar CJ, Ruiz-Quiñonez AK, González-Espinosa C, Cruz-Martín-del-Campo SL. Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. *El Residente*. 2020; 15 (3): 97-112. <https://dx.doi.org/10.35366/95960>



in the organism. The induction or inhibition of cell death have been proposed as therapy for some diseases over the years, but the available studies are contradictory or not enough to determine the efficacy of such interventions. Currently, there are some therapeutic approaches to regulate cell death, for example, to avoid Parkinson's disease development, to reduce malignant cells in different types of cancer, to avoid liver damage induced by cirrhosis, and other disorders. In this paper we review the main features of different cell death mechanisms and some therapeutic approaches aimed at the regulation of this process.

Keywords: Cell death, apoptosis, pyroptosis, necrosis, NETosis.

PANORAMA HISTÓRICO

En 1847, el médico alemán Carl Vogt sugirió por primera vez que las células pueden morir de manera natural. En su estudio, el doctor Vogt hipotetizó que durante el estado embrionario de los anuros la formación de vértebras ocurría mediante un proceso de transformación del cartílago para convertirse en hueso debido al reemplazamiento de las células presentes en la notocorda; sin embargo, su estudio no se enfocó en la muerte de las células.¹ Fue hasta mediados del siglo XX cuando la muerte celular se comenzó a estudiar experimentalmente.² Al principio, este mecanismo se investigó como un proceso de desintegración celular que sucedía durante el desarrollo embrionario para la eliminación de órganos vestigiales y la construcción de órganos secundarios.³ En una notable revisión del campo, el médico Alfred Glucksmann describió la muerte celular como un proceso lento que involucra cambios estructurales tales como la formación de vacuolas citoplasmáticas, la disminución en el tamaño celular, la homogenización del contenido citoplasmático y la desaparición, en último término, del cuerpo celular.³

A finales de la década de 1960 y principios de los años 70, el patólogo John F Kerry y colaboradores investigaron la muerte celular como un proceso espontáneo. Los autores demostraron que este tipo de muerte es morfológicamente diferente a la necrosis producida por daño tisular. En 1972, estos investigadores propusieron el término apoptosis para denominar la muerte celular programada como un proceso natural cuyo término alude a una palabra griega que significa desprenderse de, al igual que los pétalos de una flor al paso del tiempo, y que ocurre como parte del proceso de generación de es-

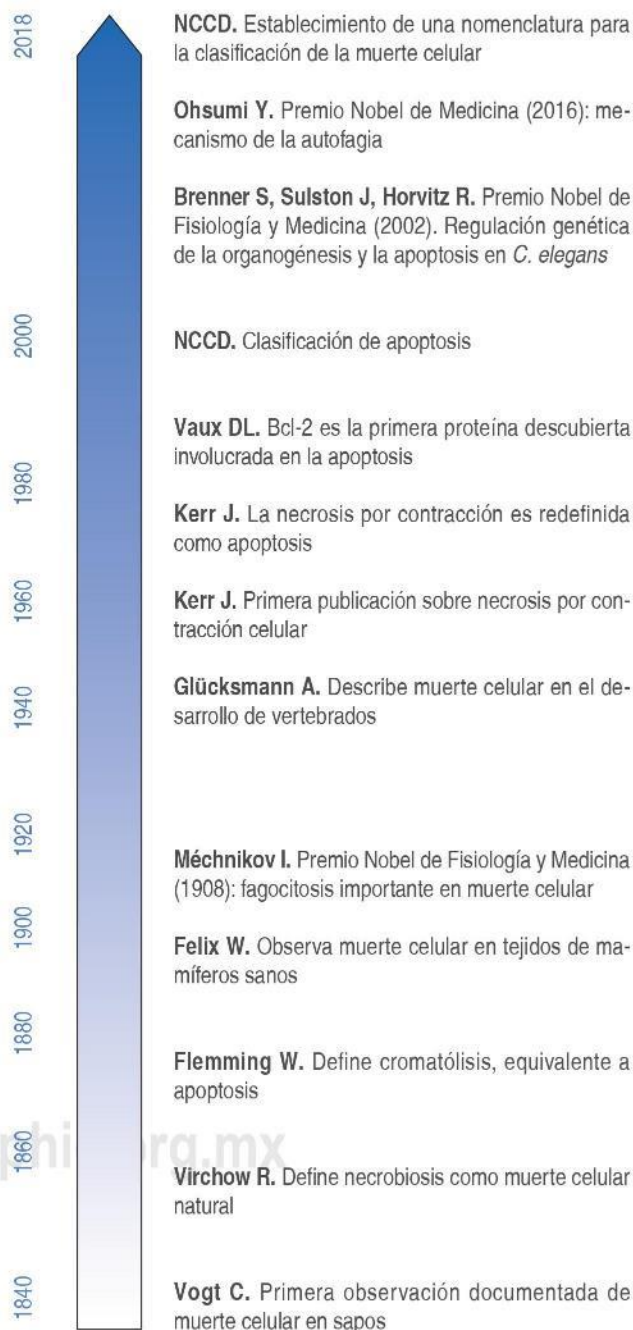


Figura 1: Eventos históricos significativos en el descubrimiento y el estudio de la muerte celular.

estructuras nuevas en el organismo.⁴ A partir de este momento, se comenzó a estudiar la muerte celular como un componente importante en la regulación de diversos procesos fisiológicos.⁵

Los estudios de la muerte celular se han incrementado en los últimos años.⁶ La importancia de entender cómo y por qué se produce radica en su relevancia en diversos procesos fisiopatológicos y en que los múltiples mecanismos de la muerte se presentan dependiendo del tipo celular y del agente o estímulo inductor.⁷ En la *Figura 1* se muestra un resumen de los principales eventos históricos sobre el descubrimiento y el estudio de la muerte celular.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, MOLECULARES Y FUNCIONALES DE LOS DIFERENTES TIPOS DE MUERTE CELULAR

Una de las primeras clasificaciones de muerte celular se realizó con base en los cambios mor-

fológicos distinguiendo tres tipos principales: apoptosis (tipo I), autofagia (tipo II) y necrosis (tipo III).⁸ En años más recientes, esta clasificación se ha modificado y extendido tomando en cuenta factores adicionales como el estímulo que induce el proceso de muerte y la maquinaria de señalización involucrada.⁹ Considerando esto, en 2018 el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular (*Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD*) propuso una nueva clasificación basada en aspectos moleculares.¹⁰

En la actualidad se reconoce que la muerte celular puede ser programada o no programada (*Figura 2*). La muerte celular no programada ocurre generalmente en condiciones de daño físico a los tejidos.¹¹ En cambio, la muerte celular programada inicia por señales moleculares precisas que llevan a la célula a su muerte.¹² Este tipo de muerte puede ser apoptótica o no apoptótica. La diferencia radica en que en la muerte celular apoptótica se mantiene la inte-

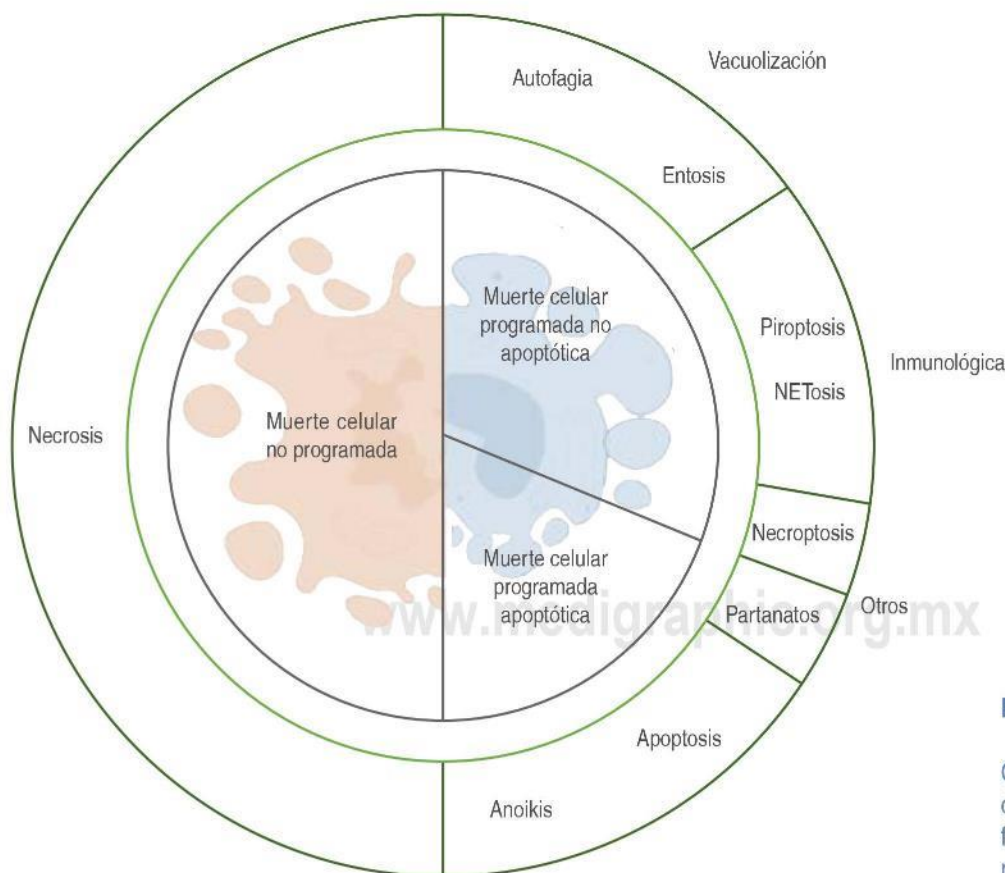


Figura 2:

Clasificación de la muerte celular con base en su función y sus características morfológicas.

gridad de la membrana celular, hay ausencia de inflamación y se activan enzimas con actividad proteolítica. En contraste, la muerte celular no apoptótica se caracteriza por la ruptura de la membrana celular y la liberación de mediadores inflamatorios y del contenido citoplasmático al medio extracelular.¹³ En esta revisión describiremos los estímulos inductores, las características morfológicas y los aspectos moleculares de los principales tipos de muerte celular implicados en el desarrollo de diversas patologías.

Necrosis

La necrosis es un tipo de muerte accidental, o no programada, que ocurre cuando factores externos superan las condiciones fisiológicas del tejido y someten a la célula a un estrés excesivo e incontrolable.⁷ Ejemplos de estos factores son el calor, el frío, los estímulos mecánicos, varias sustancias químicas, la hipoxia, la radiación ionizante y la irradiación ultravioleta.¹⁴ En algunos casos, la necrosis puede disolver el tejido muerto, pero en otras ocasiones el tejido mantiene su arquitectura normal y los cambios celulares pueden observarse únicamente a nivel microscópico.¹¹ Cuando una célula se encuentra en estado necrótico presenta hinchamiento de orgánulos, dilatación del retículo endoplásmico, ruptura temprana de la membrana plasmática y liberación «explosiva» del contenido citoplasmático al espacio extracelular.¹⁵

La muerte celular necrótica es un proceso pasivo que no requiere síntesis *de novo* de proteínas y emplea una cantidad mínima de energía.¹⁴ Se caracteriza por el aumento en el calcio intracelular (Ca^{2+}), la disfunción mitocondrial, el aumento en las especies reactivas de oxígeno (*ROS*, por sus siglas en inglés) y la proteólisis inducida por calpainas y catepsinas.^{16,17} Las calpainas son enzimas proteolíticas que tienen una cisteína en su sitio catalítico (por lo que también se les llama cisteína-peptidasas), no son lisosomales, y su actividad depende de calcio. Las catepsinas (del griego *kathepsin*, digerir) son proteasas que requieren un medio ligeramente ácido para funcionar.

En diversos escenarios clínicos la necrosis se reporta como resultado de trauma, isquemia o daño tisular.^{11,18} Otros reportes indican que este tipo de muerte se presenta en padecimientos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).¹⁶ Algunos autores han propuesto que, bajo ciertas condiciones de daño, la necrosis puede iniciarse de manera espontánea como un mecanismo para contribuir a la reparación del tejido.¹⁹ Sin embargo, los mecanismos moleculares que inducen la muerte necrótica en estas patologías no se conocen completamente.

Apoptosis

La apoptosis es el tipo de muerte celular programada más estudiado debido a que mantiene el balance fisiológico entre la proliferación y la eliminación celular.²⁰ La detección de ligandos inductores de muerte, ácidos nucleicos, ROS, mediadores inflamatorios, toxinas y fármacos, entre otras sustancias, activa mecanismos que llevan a la célula a su propia destrucción.²¹ Estos ligandos pueden aumentar su concentración como consecuencia de un daño tisular que produzca la muerte de otras células, lo cual lleva a la liberación de su contenido al espacio extracelular. Una vez que la célula entra en apoptosis induce la activación de caspasas, que son proteasas con un residuo de cisteína (**C**) que fragmentan proteínas inmediatamente después de los residuos de aspartato (**Asp**). Las caspasas provocan el colapso de los componentes subcelulares, la condensación y fragmentación del ADN y la disminución del tamaño celular y nuclear. En este tipo de muerte, la integridad de la membrana plasmática se mantiene intacta hasta que comienza la formación de cuerpos apoptóticos, cuya función es contener el material celular y evitar que éste actúe como desencadenante de la muerte de otras células. Una vez finalizada la apoptosis, otras células especializadas fagocitan los cuerpos apoptóticos.²² A diferencia de la necrosis, la apoptosis no causa inflamación.²³

Se han identificado tres vías que pueden conducir a la apoptosis. La primera se activa de manera extrínseca mediante la detección de ligandos endógenos como el factor de necrosis tumoral (TNF), el ligando Fas (FasL) o el ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF (TRAIL). La activación de receptores de muerte (TNFR, Fas o DR5) induce la activación de la caspasa 8.²⁴ La segunda vía se activa de manera intrínseca por estímulos no dependientes de un receptor. La radiación o la hipoxia, por ejemplo, producen la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial (MPT). La desregulación mitocondrial a su vez induce la liberación de proteínas proapoptóticas como el citocromo C y la proteína Smac/DIABLO que activan a otro tipo de caspasa, la caspasa 9.²⁵ La tercera vía se produce por señales provenientes de linfocitos T citotóxicos. La activación de receptores de muerte celular programada como PD-1 (*programmed cell death protein 1*) induce la liberación de perforinas y granzimas que actúan sobre células infectadas con virus o células tumorales. Las perforinas forman poros en las células blanco a través de los cuales ingresan las granzimas. La granzima B induce la activación de la caspasa 10.²⁶ Las tres vías antes mencionadas convergen en la activación de la caspasa 3, una enzima que produce la fragmentación del ADN, la degradación de proteínas del citoesqueleto, la formación de cuerpos apoptóticos y la expresión de ligandos que inducen el reclutamiento de células con capacidad fagocítica.¹²

La activación descontrolada de las caspasas sería incompatible con la vida, por eso se encuentran como zimógenos, es decir, como precursores enzimáticos inactivos que requieren de un cambio bioquímico para que se exponga su sitio activo y así puedan tener actividad catalítica.²⁷ Además, existen proteínas reguladoras como la cinasa MEK o Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) que actúan como proteínas antiapoptóticas cuya función principal es detener el progreso de la muerte celular programada.²⁸

La disminución en la apoptosis favorece la proliferación celular en diferentes tipos de cán-

cer y en patologías como el síndrome linfoproliferativo autoinmune, una enfermedad poco frecuente que aumenta el riesgo de desarrollar linfoma en las personas que la padecen. También, si disminuye la apoptosis puede presentarse una proliferación de sinoviocitos, que son las células que se producen en las membranas sinoviales de las articulaciones. Esto es relevante porque el aumento descontrolado de sinoviocitos contribuye a la destrucción de hueso y cartílago en la artritis reumatoide.²⁹ En osteoartritis, la muerte de los condrocitos se da principalmente por apoptosis. A este tipo particular de muerte se le denomina condroptosis.³⁰ El incremento en la apoptosis neuronal está involucrado en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.³¹

Necroptosis

La necroptosis es un tipo de muerte cuyos cambios morfológicos son similares a los que se presentan en la necrosis, pero la necroptosis puede activarse por ligandos diferentes y está regulada por proteínas específicas.¹⁵ Las principales funciones de este tipo de muerte celular son: asegurar la eliminación de células infectadas por patógenos, promover un estado inflamatorio mediante la liberación de patrones moleculares asociados a daño (*DAMPs*, por sus siglas en inglés), e inducir el reclutamiento de células fagocíticas al sitio de daño, entre otras.³²

La muerte celular necroptótica se produce por la activación de receptores de membrana como los tipo toll 3/4 (TLR3/4), o los de muerte (*death receptors* o DRs).³³ La activación de estos receptores induce la activación de cinasas que fosforilan residuos de serina o treonina (RIPKs, *receptor-interacting protein kinases*) y que interactúan con otros receptores. Las proteínas RIPK1 y RIPK3 se oligomerizan para formar un complejo intracelular denominado necroptosoma, el cual induce la activación de la proteína MLKL (*mixed lineage kinase domain like pseudokinase*). Esta proteína se transporta a la membrana celular para inducir su ruptura

y, en consecuencia, la liberación del contenido citoplasmático.¹⁵

Se ha sugerido que la necroptosis es un mecanismo complementario a la apoptosis en algunas enfermedades neurodegenerativas.³⁴ Además, se sabe que el estado inflamatorio que produce propicia el crecimiento de tumores en diversos tipos de cáncer tales como el de mama, el colorrectal o el osteosarcoma, entre otros.³⁵ Un ejemplo particular donde se observa el proceso necrótico es en la fascitis necrosante de la piel que se caracteriza por la destrucción rápida del tejido y toxicidad sistémica.

Piroptosis

La piroptosis es un tipo de muerte celular inflamatoria que generalmente ocurre después de la detección intracelular de señales de daño o de patógenos.³⁶ Las células piroptóticas presentan hinchamiento, fragmentación del material genético, formación de poros membranales, ruptura de la membrana plasmática y liberación de mediadores inflamatorios y del contenido citoplasmático al espacio extracelular.³⁷ El lipopolisacárido (LPS), un componente de la cara externa de la pared celular de las bacterias Gram negativas, es uno de los principales activadores de la piroptosis en células del sistema inmunitario.³⁸

El proceso de piroptosis requiere de dos estímulos. El primero es la activación de receptores de la inmunidad innata (como el receptor *Toll-like-1*, TLR4) que induce la activación del factor nuclear- κ B (NF- κ B). Este factor de transcripción se transporta al núcleo e induce el aumento en la transcripción de los genes para pro-IL-1 β , pro-IL-18, y procaspasas, que son precursores inactivos de las respectivas citocinas inflamatorias (interleucina 1b y 18) y de las caspasas. Como resultado de esta activación, también hay un aumento de receptores intracelulares tipo Nod (NLRs). Una segunda señal induce la oligomerización de complejos intracelulares denominados inflamasomas.³⁹ Los inflamasomas promueven la maduración de pro-IL-1 β y procaspasa-1 a sus formas activas. Mientras la IL-

1 β se libera e induce un estado proinflamatorio, la caspasa-1 rompe la proteína citoplasmática gasdermina D (GSDMD). La porción amino terminal de la GSDMD se transporta a la membrana y forma poros que provocan la muerte celular mediante la salida de componentes citoplasmáticos.⁴⁰

El estado inflamatorio que produce la piroptosis está implicado en el desarrollo de cáncer de colon y cáncer gástrico.⁴¹ Además, este tipo de muerte celular participa en la inflamación aséptica dentro del sistema nervioso central (SNC) y se ha relacionado con las complicaciones producidas por enfermedades neurológicas como la encefalitis viral y la meningitis. En este sentido, la neuroinflamación inducida por la piroptosis puede contribuir a la pérdida de la memoria, la hipersensibilidad al dolor o los episodios convulsivos producidos en algunas enfermedades.⁴²

NETosis

La NETosis o «muerte suicida de neutrófilos» es un mecanismo inducido por bacterias, hongos, virus, parásitos, citocinas, quimiocinas y algunos fármacos.^{43,44} Los principales cambios morfológicos que se observan en este tipo de muerte celular son: descondensación de la cromatina, ruptura de la membrana nuclear, mezcla del contenido nuclear y citoplasmático, ruptura de la membrana plasmática y liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs).⁴⁵ Las NETs están formadas por material genético, histonas, elastasa, mieloperoxidasas y proteasas que permiten inmovilizar, neutralizar y combatir a agentes patógenos.⁴⁶ Es decir, los neutrófilos se suicidan para combatir la infección.

La muerte celular por NETosis es independiente de caspasas e inicia cuando diversos ligandos endógenos o exógenos se unen a receptores TLR, receptores del complemento o receptores de citocinas. Dicha activación induce el incremento en el calcio intracelular y la activación de la proteína cinasa C (PKC) y de la enzima NADPH oxidasa. Estas proteínas

promueven la producción de ROS, lo que contribuye a la ruptura de la envoltura nuclear. Estas señales activan a la enzima PAD4 que se transporta al núcleo y produce la citrulinación (conversión de arginina a citrulina, lo que conlleva a una alteración de la conformación espacial) de histonas y la descondensación de la cromatina.⁴⁵ El sistema inmunitario puede atacar a las proteínas citrulinadas. De hecho, el incremento de la NETosis y la liberación de NETs están relacionados con el desarrollo de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple. En específico, algunas moléculas que forman las NETs actúan como autoantígenos en enfermedades como la vasculitis positiva al antígeno citoplasmático de neutrófilos (ANCA) y el lupus eritematoso sistémico.⁴⁷

Autofagia

La autofagia es un proceso autodegradativo necesario para equilibrar las fuentes de energía y de nutrientes en respuesta a factores que modifican la homeostasis celular.⁴⁸ La autofagia participa en la eliminación de proteínas y orgánulos dañados, contribuye a la presentación de antígenos en la superficie celular, protege contra la inestabilidad del genoma y previene el daño tisular. Estas características le confieren un papel muy importante en el cáncer, la neurodegeneración, la diabetes y diversas enfermedades hepáticas y autoinmunes.⁴⁹ Elementos moleculares que llevan a este tipo de muerte celular colaboran también en la respuesta al estrés.

La autofagia se caracteriza por la degradación de sustancias intracelulares y extracelulares en los lisosomas de las células. La degradación de diversos componentes exógenos se lleva a cabo por endocitosis y fagocitosis; a este proceso se le conoce como macroautofagia, mientras que la degradación de componentes intracelulares se lleva a cabo por microautofagia y autofagia mediada por proteínas chaperonas.⁵⁰

En la macroautofagia, los materiales exógenos y proteínas de membrana se fagocitan

de manera no selectiva y se transportan al lisosoma mediante una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma, que se fusiona con el lisosoma para formar un autolisosoma donde estos componentes son degradados.⁵¹ En la microautofagia, el material citoplasmático se detecta selectivamente y se transporta al interior de los lisosomas directamente, sin necesidad de pasar por otra vesícula.⁵² En el caso de la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas dañadas se transportan hacia el interior de la célula después de la activación de proteínas de choque térmico, como la Hsp70, que aceleran el plegamiento de proteínas dañadas, protegen a proteínas intactas y son reconocidas por una proteína estructural de los lisosomas, llamada LAMP2.⁵³

La acumulación de fagosomas y autofagosomas inducida por diversas señales llevan a la muerte de la célula.⁵⁴ Se ha demostrado que la autofagia regula la progresión de diversos tipos de cáncer.⁵⁵ Por ejemplo, la disminución de las proteínas beclina-1 y HIF-1 α , importantes en la iniciación de la autofagia inducida por hipoxia, está involucrada en la proliferación de células cancerosas en leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica y trastorno linfoproliferativo.^{56,57} Por el contrario, otras evidencias indican que el aumento en la autofagia en tumores sólidos de glioma, osteosarcoma y en tumores no sólidos de leucemia mieloide aguda puede inducir quimiorresistencia, aunque el mecanismo no se conoce completamente. Se ha propuesto que la autofagia protege de la muerte a las células cancerosas con resistencia a fármacos mediante la degradación de proteínas inductoras de apoptosis. El uso de inhibidores de la formación de fagosomas han resultado efectivos en estudios preclínicos para sensibilizar a las células tumorales al efecto de fármacos quimioterapéuticos.⁵⁸

Entosis

En diversos tipos de cáncer se ha observado un mecanismo de muerte celular por caniba-

lismo que consiste en el engullimiento completo de células viables por células circundantes con capacidad fagocítica.⁵⁹ La célula que fagocita cumple la función de hospedera, mientras que la célula fagocitada, sujeta a destrucción, es la célula entótica. Una vez que la célula cancerosa se separa de la matriz extracelular, células circundantes la detectan a través del reconocimiento de las moléculas de adhesión E-cadherina y α -catenina.⁵⁹ La asociación entre ambas células se mantiene mediante fuerzas producidas por la polimerización de la actina. Para que una célula penetre dentro de otra, se requiere la activación de la GTPasa RhoA y de la cinasa ROCK, que son proteínas que inducen la acumulación de microfibras de actina y miosina. De esta manera, la actomiosina ejerce una fuerza contráctil que lleva a la célula entótica al interior de la célula hospedera.^{60,61} Ésta, a su vez, activa un mecanismo que induce la degradación lisosomal de la célula entótica. La entosis se ha ob-

servado en células de cáncer epitelial humano y cáncer de mama.^{62,63}

Anoikis

La anoikis es un tipo de apoptosis que inicia cuando la célula se desprende de la matriz extracelular circundante. Su nombre viene del griego *oik*, casa, y de la letra alfa privativa, que significa sin. Este proceso de muerte celular sirve para eliminar células que se encuentran en ubicaciones inapropiadas. La anoikis se modula por señales dependientes de integrinas membranales. La activación de integrinas induce la fosforilación de la cinasa unida a la integrina ILK, de la proteína tirosina-cinasa Src y de la cinasa de adhesión focal FAK. La activación de estas proteínas lleva a la activación de las vías intrínseca o extrínseca de la apoptosis.⁶⁴ En el cáncer, las células que escapan de la anoikis por activación de la proteína PI3K pueden inducir metástasis.⁶⁵

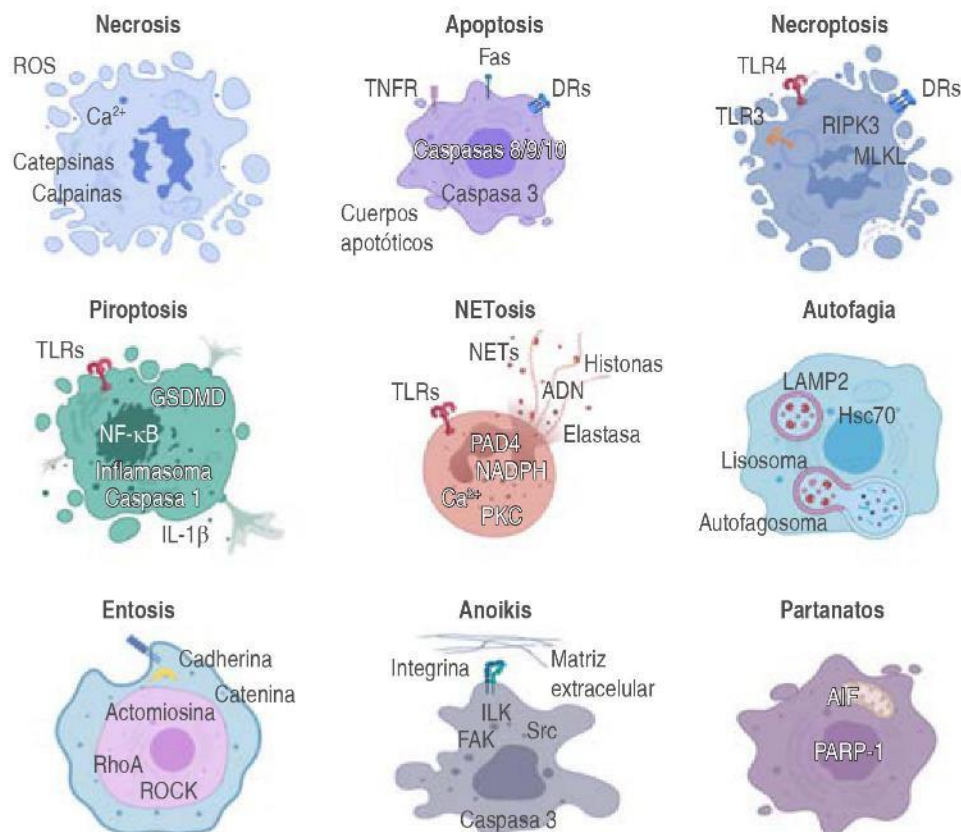


Figura 3:

Características moleculares y morfológicas distintivas de cada tipo de muerte celular.

Partanatos

La muerte celular por partanatos se llama así porque depende de la acumulación de la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) y por el término *thanatos*, palabra griega que significa muerte. En condiciones normales, la PARP-1 contribuye a la iniciación de las señales de reparación del daño al ADN. Sin embargo, la acumulación de esta proteína produce la activación mitocondrial del factor inductor de apoptosis o AIF por sus siglas en inglés.⁶⁶ Este tipo de muerte celular es independiente de caspasas, induce la despolarización de la membrana mitocondrial, genera la producción de ROS y escapa del efecto antiapoptótico de Bcl-2. Se ha demostrado que la acumulación de PARP-1 se induce por lesión cerebral isquémica, por excitotoxicidad producida por niveles elevados del neurotransmisor N-metil-D-aspartato (NMDA) y durante la enfermedad de Parkinson.⁶⁷ Es necesario extender la investigación de este tipo de muerte celular para comprender su papel en condiciones fisiológicas normales y durante la enfermedad. En la *Figura 3* se resumen algunas características morfológicas y moleculares de cada tipo de muerte celular.

TERAPÉUTICA DIRIGIDA A LA MODULACIÓN DE LA MUERTE CELULAR

La modulación de las vías que conducen a la muerte celular representa un campo de estudio potencialmente innovador en la terapéutica dirigida hacia el tratamiento del cáncer, enfermedades inmunológicas, y trastornos neurodegenerativos, entre otros padecimientos.⁶⁸ Sin embargo, debido al papel de la muerte celular en los procesos fisiológicos normales, su modulación representa un gran reto para la medicina actual. Las principales aproximaciones preclínicas están dirigidas al bloqueo o la activación de caspasas, la inducción específica de la apoptosis, la regulación de proteínas aberrantes derivadas de defectos genéticos y el estudio de las diferencias en las vías de muerte de células

normales y malignas.⁶⁹⁻⁷¹ Más allá de los ensayos preclínicos, muchos grupos de investigación y compañías farmacéuticas se han enfocado en estudiar y promover el uso de fármacos dirigidos a la regulación de la muerte celular en pacientes con enfermedades específicas.^{72,73} Así, en las últimas décadas, se han aprobado varios compuestos que modifican procesos de muerte celular para el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas; algunos de los cuales se muestran en la *Tabla 1*. En los siguientes párrafos se describen algunas aproximaciones clínicas enfocadas en la modulación de la muerte celular para el tratamiento de enfermedades específicas.

Cáncer

La mayoría de compuestos y proteínas, aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para regular la muerte celular están dirigidos al tratamiento del cáncer.⁷⁴ Por ejemplo, se sabe que la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 se encuentra en niveles altos en el cáncer pulmonar de células pequeñas. Los inhibidores de Bcl-2, venetoclax y navitoclax han sido eficaces para combatir este tipo de cáncer.^{75,76} Otra proteína que representa un blanco terapéutico es la proteína de muerte celular programada PD-1. Cuando esta proteína se une a su ligando PD-L1, localizado en células tumorales, se suprime la respuesta y la proliferación de los linfocitos T. Este mecanismo lo utilizan los tumores para evadir la respuesta inmunitaria de los linfocitos T.⁷⁷ El anticuerpo nivolumab reconoce a PD-1 en la superficie de los linfocitos T y favorece la activación de la vía apoptótica mediada por perforinas y granzimas en las células tumorales. La inmunidad antitumoral producida por este anticuerpo ha sido eficaz contra el cáncer pulmonar de células no pequeñas como el melanoma y el carcinoma de células renales.⁷⁸

La necroptosis es otro proceso que se observa en diversos tipos de cáncer.⁷⁹ Fármacos como el dabrafenib y el sorafenib se han empleado para el tratamiento antineoplásico del melanoma y el cáncer renal, respectivamente.⁷³ Estos

Tabla 1: Aproximaciones terapéuticas aprobadas por la FDA para el tratamiento de enfermedades con base en la regulación de la muerte celular.

Patologías	Fármaco o proteína	Blanco terapéutico	Acción
Síndrome coronario agudo	Colchicina	Activación de inflamomas/ inhibición de NETs	Inductor de apoptosis e inhibición del reclutamiento de neutrófilos ⁸²
Melanoma	Dabrafenib	Inhibición de RIPK3/inhibición de MEK	Prevención de necrosis e inducción de apoptosis ⁷³
Enfermedad hepática	Emricasan	Inhibición de caspasas	Inhibición de apoptosis de hepatocitos ⁸³
Neutropenia inducida por quimioterapia	GM-CSF recombinante	Estimulación de la prolifera- ción de neutrófilos	Inhibición de la apoptosis de neutrófilos ⁸⁴
Enfermedad de Crohn	Infliximab	Bloqueo de TNF	Inductor de apoptosis de linfocitos T ⁸⁵
Carcinoma pulmonar de pequeñas células	Navitoclax	Inhibidor de Bcl-2	Inducción de apoptosis ⁷⁵
Cáncer pulmonar de células no pequeñas, melanoma y carcinoma de células renales	Nivolumab	Unión a PD-1	Activación de linfocitos T y de apoptosis en células tumorales ⁷⁸
Enfermedad de Alzheimer	Rasagilina	Activación de Bcl-2	Inhibición de apoptosis ^{86,87}
Cáncer renal	Sorafenib	Inhibición de RIPK3/Inhibición de MEK	Prevención de necrosis e inducción de apoptosis ⁷³
Carcinoma pulmonar de pequeñas células	Venetoclax	Inhibición de Bcl-2	Inducción de apoptosis ^{74,75,88}

fármacos evitan la formación de necroptosomas mediante el bloqueo de RIPK3, mientras que mantienen su eficacia para producir apoptosis mediante la inhibición de la cinasa antiapoptótica MEK.^{73,80}

Trastornos inmunológicos

Las enfermedades autoinmunes y el cáncer se asocian frecuentemente con alteraciones en la muerte de neutrófilos.⁸¹ Los tratamientos empleados hasta el momento buscan inhibir o activar la muerte de neutrófilos dependiendo de la enfermedad de que se trate. Por ejemplo, para evitar la neutropenia inducida por quimioterapia se administra el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*GM-CSF*), la fluticasona o la prednisolona. Estos compuestos estimulan la proliferación de neutrófilos al in-

hibir la apoptosis.^{81,84} En cambio, la colchicina se ha empleado en enfermedades autoinmunes para inhibir el reclutamiento de neutrófilos y evitar la formación de NETs mediante la activación de inflamomas.^{82,89,90}

Trastornos digestivos

En el caso de la enfermedad intestinal inflamatoria crónica o enfermedad de Crohn se ha sugerido que está mediada por la respuesta incrementada de los linfocitos T y el aumento en los niveles de TNF.⁸⁵ El uso de la inmunoglobulina anti-TNF infliximab ha sido efectivo para tratar este trastorno digestivo. El infliximab se une al TNF soluble y al TNF transmembranal (TNF-tm) localizado en la mucosa gastrointestinal. Se ha sugerido que la neutralización del TNF-tm produce la apoptosis de linfocitos T en un meca-

nismo que requiere la activación de caspasas y la regulación de la proteína Bcl-2.^{85,91,92}

Neurodegeneración

Con respecto a las enfermedades neurodegenerativas, se han desarrollado fármacos con propiedades neuroprotectoras.⁹³ La rasagilina es un medicamento que se utiliza para evitar el daño producido por la enfermedad de Alzheimer mediante la regulación de la supervivencia y la muerte celular.⁷² En específico, la rasagilina activa a Bcl-2 y a la proteína cinasa c (PKC) para rescatar neuronas que entran en apoptosis.^{86,87}

Trastornos renales

La inhibición de caspasas es una opción terapéutica para el tratamiento de diversas enfermedades. La cirrosis y la insuficiencia renal aguda se asocian con la muerte de hepatocitos mediada por caspasas. El inhibidor de caspasas emricasan se ha probado en pacientes con enfermedad hepática y ha sido bien aceptado y tolerado. Sin embargo, los mecanismos por los que actúa no están bien esclarecidos, pero se piensa que podría actuar al inhibir la muerte celular de hepatocitos.^{78,94}

LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS DE LA FARMACOTERAPIA ASOCIADA A LA REGULACIÓN DE LA MUERTE CELULAR

La modulación de la muerte celular representa una herramienta prometedora en el tratamiento de diversas patologías. Sin embargo, la mayoría de los fármacos que intervienen en este proceso se encuentran actualmente en desarrollo o en fase preclínica.⁶⁸ Esto se debe a que los intentos de tratar síntomas o enfermedades mediante la manipulación de la muerte celular no han tenido tanto éxito como lo sugerirían algunos estudios preclínicos.¹⁴ Por otra parte, aunque existen técnicas para la identificación de diferentes tipos de muerte celular, es necesario establecer métodos más rápidos y específicos que ayuden a establecer una relación directa entre la muerte celular y una enfermedad de-

terminada. En la *Tabla 2* se resumen las características morfológicas de los diferentes tipos de muerte celular y los métodos de detección más utilizados hasta el momento en la clínica.⁷

Existen varias razones por las cuales muchos fármacos no han llegado a la fase clínica. En la mayoría de las patologías, las células tienen intacta la maquinaria apoptótica, y son las proteínas reguladoras de ese proceso las que están afectadas. En este contexto, la célula puede usar caminos alternativos que la lleven a la muerte aun cuando uno se encuentre bloqueado.⁶⁸ Por otra parte, dirigir un fármaco a un tipo específico de célula resulta extremadamente complicado porque su difusión en diversos tejidos podría afectar células sanas.⁹⁵ Además, la regulación inespecífica de la muerte podría traer como consecuencia efectos secundarios no deseados, por ejemplo, la caspasa 8, importante para la apoptosis, participa en la activación de linfocitos T y la diferenciación de macrófagos, por lo tanto su regulación podría comprometer la respuesta inmunológica.⁹⁶ Finalmente, la mayoría de las patologías relacionadas con la muerte celular generan un microambiente que resulta intolerable para las células circundantes al tejido afectado. Este microambiente se caracteriza por cambios en el pII, estrés oxidante, desregulación osmótica, ausencia de nutrientes y temperatura inadecuada, entre otros. Por lo tanto, aunque los tratamientos farmacológicos prevengan un tipo de muerte celular, la evidencia indica que la célula morirá por algún otro mecanismo debido al estrés en el que se encuentra inmersa.⁶⁸

Aun con estas limitaciones, el descubrimiento de diversas formas de muerte celular involuacradas en la patogénesis de trastornos específicos facilita la comprensión de la enfermedad y representa una posible ventaja en la búsqueda de terapias más eficaces y con menos efectos adversos. Ante el panorama creciente de información basada en evidencias, es necesario que en un futuro cercano los investigadores y los médicos consideren llevar la terapéutica dirigida hacia la muerte celular al siguiente nivel: la práctica clínica.

Tabla 2: Características morfológicas y métodos de detección de los diferentes tipos de muerte celular.

Tipo de muerte	Características morfológicas	Método de detección	Tejidos empleados para la detección
Necrosis	Dilatación del retículo endoplásmico	Detección de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa	Biopsias de piel humana ⁹⁷⁻⁹⁹
	Ruptura de la membrana plasmática	Observación de la integridad de la membrana por tinción de ADN Tinción de hematoxilina-eosina	
Apoptosis	Liberación «explosiva» del contenido citoplasmático	Prueba de caspasas	Biopsias de piel y sangre humana ⁹⁸
	Disminución del tamaño celular y nuclear		
	Colapso de componentes subcelulares		
Necroptosis	Condensación y fragmentación del ADN	Prueba de anexina V	Biopsias de piel humana ⁹⁸
	Formación de cuerpos apoptóticos	Tinción de hematoxilina-eosina	
	Hinchamiento celular	Tinción de Gram	
Piroptosis	Ruptura de la membrana	Observación de la integridad de la membrana	Carcinoma hepatocelular humano y cultivos hepáticos ¹⁰⁰
	Disgregación de orgánulos	Anticuerpos específicos	
	Hinchamiento celular y nuclear	Observación de la integridad de la membrana mediante microscopía de fluorescencia	
NETosis	Condensación y fragmentación de la cromatina	Anticuerpos específicos	Cultivos celulares de neutrófilos murinos y humanos ¹⁰¹
	Formación de poros membranales	Inmunohistoquímica	
	Ruptura de la membrana plasmática	Inmunofluorescencia	
	Liberación del contenido citoplasmático		
Autofagia	Descondensación de la cromatina	Observación de la morfología mediante microscopía de fluorescencia	Cultivos celulares ¹⁰² Células tumorales humanas ^{102,103} Células tumorales humanas de pulmón, hígado, colon, páncreas, próstata, estómago y mama ¹⁰⁴ Cultivos celulares de células de cáncer de pulmón ¹⁰⁵
	Ruptura de la membrana nuclear	Anticuerpos específicos	
	Mezcla del contenido nuclear y citoplasmático		
	Ruptura de la membrana plasmática		
Entosis	Liberación de trampas extracelulares de neutrófilos	Observación morfológica mediante microscopía de fluorescencia y electrónica	
	Formación de vesículas intracelulares	Anticuerpos específicos	
Anoikis	Deformación de los orgánulos	Inmunohistoquímica	
	Presencia de una célula dentro de otra célula	Observación morfológica mediante microscopía de fluorescencia y electrónica	
Partenatos	Disminución del tamaño celular y nuclear	Anticuerpos específicos	Sangre humana ⁹⁵
	Condensación y fragmentación del ADN	Tinción de hematoxilina-eosina	
	Formación de cuerpos apoptóticos		
Partenatos	Permeabilización de la membrana externa mitocondrial	Anticuerpos específicos	Sangre humana ⁹⁵
	Condensación y fragmentación de la cromatina	Detección de la despolarización de la membrana mitocondrial y estrés oxidante	

BIBLIOGRAFÍA

1. Clarke PGH, Clarke S. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol (Berl)*. 1996; 193 (2): 81-99. doi: 10.1007/BF00214700.
2. Zakeri Z, Lockshin RA. Cell death: history and future. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 615: 1-11. doi: 10.1007/978-1-4020-6554-5_1.
3. Glucksman A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1951; 26 (1): 59-86. doi: 10.1111/j.1469-185x.1951.tb00774.x.
4. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26 (4): 239-257. doi: 10.1038/bjc.1972.33.
5. Curtin JF, Cotter TG. Apoptosis: historical perspectives. *Essays Biochem*. 2003; 39: 1-10. doi: 10.1042/bse0390001.
6. Knight RA, Melino G. Cell death in disease: from 2010 onwards. *Cell Death Dis*. 2011; 2 (9): e202-e202. doi: 10.1038/cddis.2011.89.
7. Yan G, Elbadawi M, Efferth T. Multiple cell death modalities and their key features (Review). *World Acad Sci J March*. 2020; 39-48. doi: 10.3892/wasj.2020.40.
8. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*. 2007; 14 (7): 1237-1243. doi: 10.1038/sj.cdd.4402148.
9. Green DR, Llamas F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015; 7 (12): a006080. doi: 10.1101/cshperspect.a006080.
10. Galluzzi L, Vitale I. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. 2018; 25: 486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
11. Adigun R, Basit II, Murray J. Necrosis, Cell (Liquefactive, Coagulative, Caseous, Fat, Fibrinoid, and Gangrenous), 2020. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430935/>.
12. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35 (4): 495-516. doi: 10.1080/01926230701320337.
13. Tait SWG, Ichim G, Green DR. Die another way-non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci*. 2014; 127 (10): 2135-2144. doi: 10.1242/jcs.093575.
14. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death in disease: mechanisms and emerging therapeutic concepts. *N Engl J Med*. 2009; 361 (16): 1570-1583. doi: 10.1056/NEJMra0901217.
15. Hanson B. Necroptosis: a new way of dying? *Cancer Biol Ther*. 2016; 17 (9): 899-910. doi: 10.1080/15384047.2016.1210732.
16. Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Lett*. 2005; 579 (15): 3287-3296. doi: 10.1016/j.febslet.2005.03.052.
17. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*. 2007; 32 (1): 37-43. doi: 10.1016/j.tibs.2006.11.001.
18. Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull*. 1998; 46 (4): 281-309. doi: 10.1016/S0361-9230(98)00024-0.
19. Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*. 2006; 20 (1): 1-15. doi: 10.1101/gad.1376506.
20. Fleisher TA. Apoptosis. 1997; 78: 245-250. doi: 10.1016/S1081-1206(10)63176-6.
21. Gordezhani M, Adamia G, Khatisashvili G, Gigolashvili G. Programmed cell self-liquidation (apoptosis). *Ann Agrar Sci*. 2017; 15 (1): 148-154. doi: 10.1016/j.aasci.2016.11.001.
22. Saraste A. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000; 45 (3): 528-537. doi: 10.1016/S0008-6363(99)00384-3.
23. Yang Y, Jiang G, Zhang P, Fan J. Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil Med Res*. 2015; 2 (1): 12. doi: 10.1186/s40779-015-0039-0.
24. Tummers B, Green DR. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev*. 2017; 277 (1): 76-89. doi: 10.1111/imr.12541.
25. Li P, Zhou L, Zhao T et al. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*. 2017; 8 (14): 23996-24008. doi: 10.18632/oncotarget.15098.
26. Talanian RV, Yang X, Turbov J et al. Granule-mediated Killing: Pathways for Granzyme B-initiated Apoptosis. *J Exp Med*. 1997; 186 (8): 1323-1331. doi: 10.1084/jem.186.8.1323.
27. Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci*. 2004; 13 (8): 1979-1987. doi: 10.1110/ps.04789804.
28. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019; 20 (3): 175-193. doi: 10.1038/s41580-018-0089-8.
29. Favalaro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*. 2012; 4 (5): 330-349. doi: 10.18632/aging.100459.
30. Roach HI, Aigner T, Kouri JB. Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis*. 2004; 9 (3): 265-277. doi: 10.1023/B:APPT.0000025803.17498.26.
31. Zangemeister-Wittke U, Simon H-U. Apoptosis-Regulation and clinical implications. *Cell Death Differ*. 2001; 8 (5): 537-544. doi: 10.1038/sj.cdd.4400844.
32. Gong Y, Fan Z, Luo G et al. The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Mol Cancer*. 2019; 18 (1): 100. doi: 10.1186/s12943-019-1029-8.
33. Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *J Neuroinflammation*. 2018; 15 (1): 199. doi: 10.1186/s12974-018-1235-0.
34. Zhang S, Tang M, Luo H, Shi C, Xu Y. Necroptosis in neurodegenerative diseases: a potential therapeutic target. *Cell Death Dis*. 2017; 8 (6): e2905-e2905. doi: 10.1038/cddis.2017.286.

35. Zhu F, Zhang W, Yang T, He S. Complex roles of necroptosis in cancer. *J Zhejiang Univ B*. 2019; 20 (5): 399-413. doi: 10.1631/jzus.B1900160.
36. Frank D, Vince JE. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk. *Cell Death Differ*. 2019; 26 (1): 99-114. doi: 10.1038/s41418-018-0212-6.
37. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7 (2): 99-109. doi: 10.1038/nrmicro2070.Pyroptosis.
38. Nyström S, Antoine DJ, Lundbäck P et al. TLR activation regulates damage-associated molecular pattern isoforms released during pyroptosis. *EMBO J*. 2013; 32 (1): 86-99. doi: 10.1038/emboj.2012.328.
39. Kelley N, Jeltama D, Duan Y, He Y. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (13): 3328. doi: 10.3390/ijms20133328.
40. Shi J, Zhao Y, Wang K et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*. 2015; 526 (7575): 660-665. doi: 10.1038/nature15514.
41. Zhou CB, Fang JY. The role of pyroptosis in gastrointestinal cancer and immune responses to intestinal microbial infection. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019; 1872 (1): 1-10. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.05.001.
42. Zhao G, Xie Z. Pyroptosis and neurological diseases. *Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2014; 1 (2): 60. doi: 10.4103/2347-8659.139716.
43. Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L, García-Orozco A, Alvarado-Navarro A, Fafutis-Morris M. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: An overview. *Front Immunol*. 2017; 8: 1-20. doi: 10.3389/fimmu.2017.00081.
44. Irizarry-Caro JA, Carmona-Rivera C, Schwartz DM, Khaznadar SS, Kaplan MJ, Grayson PC. Brief report: drugs implicated in systemic autoimmunity modulate neutrophil extracellular trap formation. *Arthritis Rheumatol*. 2018; 70 (3): 468-474. doi: 10.1002/art.40372.
45. Rai G. NETosis: mechanisms and antimicrobial strategies. In: Sanchez-Zuniga JM. *Netosis*. Elsevier; 2019, pp. 23-55. doi: 10.1016/B978-0-12-816147-0.00002-2.
46. Rada B. Neutrophil extracellular traps. *Methods Mol Biol*. 2019; 1982: 517-528. doi: 10.1007/978-1-4939-9424-3_31.
47. Kaplan JM. Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity 1. 2013; 189 (6): 2689-2695. doi: 10.4049/jimmunol.1201719. Neutrophil.
48. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010; 221 (1): 3-12. doi: http://doi.org/10.1002/path.2697. 10.1002/path.2697. Autophagy.
49. Yang Y, Klionsky DJ. Autophagy and disease: unanswered questions. *Cell Death Differ*. 2020; 27 (3): 858-871. doi: 10.1038/s41418-019-0480-9.
50. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20 (3): 460-473. doi: 10.1089/ars.2013.5371.
51. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res*. 2014; 24 (1): 24-41. doi: 10.1038/cr.2013.168.
52. Li W, Li J, Bao J. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69 (7): 1125-1136. doi: 10.1007/s00018-011-0865-5.
53. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol*. 2012; 22 (8): 407-417. doi: 10.1016/j.tcb.2012.05.006.
54. Denton D, Kumar S. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ*. 2019; 26 (4): 605-616. doi: 10.1038/s41418-018-0252-y.
55. You L, Jin S, Zhu L, Qian W. Autophagy, autophagy-associated adaptive immune responses and its role in hematologic malignancies. *Oncotarget*. 2017; 8 (7): 12374-12388. doi: 10.18632/oncotarget.13583.
56. Qu X, Yu J, Bhagat G et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*. 2003; 112 (12): 1809-1820. doi: 10.1172/JCI20039.
57. Radwan SM, Hamdy NM, Hegab HM, El-Mesallamy HO. Beclin-1 and hypoxia-inducible factor-1 α genes expression: Potential biomarkers in acute leukemia patients. *Cancer Biomarkers*. 2016; 16 (4): 619-626. doi: 10.3233/CBM-160603.
58. Li X, Zhou Y, Li Y et al. Autophagy: a novel mechanism of chemoresistance in cancers. *Biomed Pharmacother*. 2019; 119: 109415. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109415.
59. Durgan J, Florey O. Cancer cell cannibalism: Multiple triggers emerge for entosis. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res*. 2018; 1865 (6): 831-841. doi: 10.1016/j.bbamer.2018.03.004.
60. Krishna S, Overholtzer M. Mechanisms and consequences of entosis. *Cell Mol Life Sci*. 2016; 73 (11-12): 2379-2386. doi: 10.1007/s00018-016-2207-0.
61. Zeng C, Zeng B, Dong C, Liu J, Xing F. Rho-ROCK signaling mediates entotic cell death in tumor. *Cell Death Discov*. 2020; 6 (1): 10-12. doi: 10.1038/s41420-020-0238-7.
62. Sun Q, Cibas ES, Huang H, Hodgson L, Overholtzer M. Induction of entosis by epithelial cadherin expression. *Cell Res*. 2014; 24 (11): 1288-1298. doi: 10.1038/cr.2014.137.
63. Ruan B, Niu Z, Jiang X et al. High frequency of cell-in-cell formation in heterogeneous human breast cancer tissue in a patient with poor prognosis: a case report and literature review. *Front Oncol*. 2019; 9: 1-6. doi: 10.3389/fonc.2019.01444.
64. Guadamillas MC, Cerezo A, del Pozo MA. Overcoming anoikis-pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J Cell Sci*. 2011; 124 (19): 3189-3197. doi: 10.1242/jcs.072165.
65. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1833 (12): 3481-3498. doi: 10.1016/j.bbamer.2013.06.026.

66. Fatokun AA, Dawson VL, Dawson TM. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol*. 2014; 171 (8): 2000-2016. doi: 10.1111/bph.12416.
67. Robinson N, Ganesan R, Hegedűs C, Kovács K, Kufer TA, Virág L. Programmed necrotic cell death of macrophages: focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos. *Redox Biol*. 2019; 26: 101239. doi: 10.1016/j.redox.2019.101239.
68. Lockshin RA, Zakeri Z. Cell death in health and disease. *J Cell Mol Med*. 2007; 11 (6): 1214-1224. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00150.x.
69. Fischer U, Schulze-Osthoff K. Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death Differ*. 2005; 12 (S1): 942-961. doi: 10.1038/sj.cdd.4401556.
70. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: a target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (2): 448. doi: 10.3390/ijms19020448.
71. Kaminsky VO, Zhivotovsky B. Cell death-based treatment of various diseases: a fifty-year journey. *Cell Death Dis*. 2018; 9 (2): 110. doi: 10.1038/s41419-017-0168-3.
72. Green DR, Kroemer G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? *J Clin Invest*. 2005; 115 (10): 2610-2617. doi: 10.1172/JCI26321.
73. Fulda S. Repurposing anticancer drugs for targeting necroptosis. *Cell Cycle*. 2018; 17 (7): 829-832. doi: 10.1080/15384101.2018.1442626.
74. Derakhshan A, Chen Z, Waes C Van. Therapeutic small molecules target inhibitor of apoptosis proteins in cancers with deregulation of extrinsic and intrinsic cell death pathways. 2017; 1: 1379-1388. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2172.
75. Rudin CM, Hann CL, Garon EB et al. Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2012; 18 (11): 3163-3169. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3090.
76. Lochmann TL, Floros K V., Naseri M et al. Venetoclax is effective in small-cell lung cancers with high BCL-2 expression. *Clin Cancer Res*. 2018; 24 (2): 360-369. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1606.
77. Gong J, Chehrizi-Raffle A, Reddi S, Salgia R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer*. 2018; 6 (1): 8. doi: 10.1186/s40425-018-0316-z.
78. Guo L, Zhang H, Chen B. Nivolumab as programmed death-1 (PD-1) inhibitor for targeted immunotherapy in tumor. *J Cancer*. 2017; 8 (3): 410-416. doi: 10.7150/jca.17144.
79. Pan P, Cai Z, Zhuang C, Chen X, Chai Y. Methodology of drug screening and target identification for new necroptosis inhibitors. *J Pharm Anal*. 2019; 9 (2): 71-76. doi: 10.1016/j.jpha.2018.11.002.
80. Roulstone V, Pedersen M, Kyula J et al. BRAF- and MEK-targeted small molecule inhibitors exert enhanced antimelanoma effects in combination with oncolytic reovirus through ER stress. *Mol Ther*. 2015; 23 (5): 931-942. doi: 10.1038/mt.2015.15.
81. Brostjan C, Oehler R. The role of neutrophil death in chronic inflammation and cancer. *Cell Death Discov*. 2020; 6 (1): 26. doi: 10.1038/s41420-020-0255-6.
82. Tucker B, Vaidya K, Kurup R et al. Colchicine inhibits neutrophil extracellular trap formation in acute coronary syndrome patients post percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol*. 2020; 75 (11): 1346. doi: 10.1016/S0735-1097(20)31973-2.
83. Van Opendenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in cell death, inflammation, and disease. *Immunity*. 2019; 50 (6): 1352-1364. doi: 10.1016/j.immuni.2019.05.020.
84. Mehta HM, Malandra M, Corey SJ. G-CSF and GM-CSF in Neutropenia. *J Immunol*. 2015; 195 (4): 1341-1349. doi: 10.4049/jimmunol.1500861.
85. Ten Hove T. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut*. 2002; 50 (2): 206-211. doi: 10.1136/gut.50.2.206.
86. Youdim MBH, Amit T, Falach-Yogev M, Am OB, Maruyama W, Naoi M. The essentiality of Bcl-2, PKC and proteasome-ubiquitin complex activations in the neuroprotective-antiapoptotic action of the anti-Parkinson drug, rasagiline. *Biochem Pharmacol*. 2003; 66 (8): 1635-1641. doi: 10.1016/S0006-2952(03)00535-5.
87. Nayak L, Henchcliffe C. Rasagiline in treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008; 4 (1): 23-32. Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18728823>.
88. Pollyea DA, Amaya M, Strati P, Konopleva MY. Venetoclax for AML: changing the treatment paradigm. *Blood Adv*. 2019; 3 (24): 4326-4335. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000937.
89. Leung YY, Yao Hui LL, Kraus VB. Colchicine-Update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Semin Arthritis Rheum*. 2015; 45 (3): 341-350. doi: 10.1016/j.semarthrit.2015.06.013.
90. Vaidya K, Martínez G, Patel S. The role of colchicine in acute coronary syndromes. *Clin Ther*. 2019; 41 (1): 11-20. doi: 10.1016/j.clinthera.2018.07.023.
91. Lichtenstein GR, Feagan BG, Cohen RD et al. Infliximab for Crohn's disease: more than 13 years of real-world experience. *Inflamm Bowel Dis*. 2018; 24 (3): 490-501. doi: 10.1093/ibd/izx072.
92. Billmeier U, Dieterich W, Neurath MF, Atreya R. Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2016; 22 (42): 9300. doi: 10.3748/wjg.v22.i42.9300.
93. Morris G, Walker AJ, Berk M, Maes M, Puri BK. Cell death Pathways : a novel therapeutic approach for neuroscientists. 2018; 55: 5767-5786. doi: 10.1007/s12035-017-0793-y.
94. Mehta G, Rousell S, Burgess G et al. A placebo-controlled, multicenter, double-blind, phase 2 randomized trial of the pan-caspase inhibitor Emricasan in patients with acutely decompensated cirrhosis. *J Clin Exp Hepatol*. 2018; 8 (3): 224-234. doi: 10.1016/j.jceh.2017.11.006.

95. Lutz H, Hu S, Dinh P-U, Cheng K. Cells and cell derivatives as drug carriers for targeted delivery. *Med Drug Discov.* 2019; 3: 100014. doi: 10.1016/j.medidd.2020.100014.
96. Salmena L, Lemmers B, Hakem A et al. Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev.* 2003; 17 (7): 883-895. doi: 10.1101/gad.1063703.
97. Hietbrink F, Bode LG, Riddez L, Leenen LPH, van Dijk MR. Triple diagnostics for early detection of ambivalent necrotizing fasciitis. *World J Emerg Surg.* 2016;11:51. doi: 10.1186/s13017-016-0108-z.
98. Afonso MB, Rodrigues PM, Simão AL et al. Activation of necroptosis in human and experimental cholestasis. *Cell Death Dis.* 2016; 7 (9): e2390-e2390. doi: 10.1038/cddis.2016.280.
99. Chu Q, Jiang Y, Zhang W et al. Pyroptosis is involved in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016; 7 (51): 84658-84665. doi: 10.18632/oncotarget.12384.
100. Carmona-Rivera C, Purmalek MM, Moore E et al. A role for muscarinic receptors in neutrophil extracellular trap formation and levamisole-induced autoimmunity. *JCI insight.* 2017; 2 (3): 1-15. doi.org/10.1172/jci.insight.89780.
101. Orhon I, Fulvio R. Assays to monitor autophagy progression in cell cultures. *Cells.* 2017; 6 (3): 20. doi: 10.3390/cells6030020.
102. He H, Yang Y, Xiang Z et al. A sensitive IHC method for monitoring autophagy-specific markers in human tumor xenografts. *J Biomarkers.* 2016; 2016: 1-11. doi: 10.1155/2016/1274603.
103. Huang H, Chen A, Wang T et al. Detecting cell-in-cell structures in human tumor samples by E-cadherin/CD68/CD45 triple staining. *Oncotarget.* 2015; 6 (24): 20278-20287. doi: 10.18632/oncotarget.4275.
104. Prateep A, Sumkhemthong S, Karnsomwan W et al. Avicquinone B sensitizes Anoikis in human lung cancer cells. *J Biomed Sci.* 2018; 25 (1): 32. doi: 10.1186/s12929-018-0435-3.
105. Bárány T, Simon A, Szabó G et al. Oxidative stress-related parthanatos of circulating mononuclear leukocytes in heart failure. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 1249614. doi: 10.1155/2017/1249614.