

CONDritis AURICULAR. MODELO EXPERIMENTAL EN RATA

M. A. LÓPEZ GONZÁLEZ¹, J. M. LOIZAGA IRIONDO², F. DELGADO MORENO³

^{1,3}SERVICIO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA. ²SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA. ¹CENTRO DE ESPECIALIDADES DOCTOR FLEMING, SERVICIO ANDALUZ DE SALUD, SEVILLA. ^{2,3}HOSPITALES UNIVERSITARIOS VIRGEN DEL ROCÍO, SERVICIO ANDALUZ DE SALUD, SEVILLA. ^{1,2}USP-CLÍNICA SAGRADO CORAZÓN, SEVILLA

RESUMEN

El modelo general de inflamación local en rata se desarrolla en la almohadilla plantar. En otorrinolaringología puede haber un modelo de inflamación local en la oreja de rata mediante la producción de una condritis auricular. Para ello hemos protocolizado la metodología. La inducción de la inflamación se realiza mediante la sustancia vegetal carrageenan. Se ha comprobado mediante estudio

histológico la inflamación producida, así como se ha estudiado la acción de compuestos antiinflamatorios, proinflamatorios e inflamatorios. La inflamación se ha medido con nonius y con determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa. Tras los estudios realizados podemos validar la condritis auricular en rata como un modelo experimental de inflamación local en otorrinolaringología.

PALABRAS CLAVE: Condritis auricular. Inflamación local. Modelo experimental.

ABSTRACT

AURICULAR CHONDritis. EXPERIMENTAL MODEL IN RAT

The general pattern of local inflammation in the rat is developed in the pad of the paw. In otorhinolaryngology a model of local inflammation can be reached in the rat ear by means of the production of an auricular chondritis. For that, we have protocolized the methodology. The induction of inflammation is carried out by the substance vegetable carrageenan. It has been verified by histological

studies the inflammation generated, as well as studying the action of antiinflammatory, proinflammatory and inflammatory compounds. The inflammation has been measured by nonius and by determination of the activity of the myeloperoxidase enzyme. After these studies we can validate the auricular chondritis in rat as an experimental model of local inflammation in otorhinolaryngology.

KEY WORDS: Auricular chondritis. Local inflammation. Experimental model.

Correspondencia: Miguel A. López González. Centro de Especialidades Doctor Fleming. C/ Juan de Padilla, 8. 41005 Sevilla.
E-mail: malopez@cica.es

Fecha de recepción: 7-11-2003

Fecha de aceptación: 29-1-2004

INTRODUCCIÓN

Los modelos experimentales de inflamación local se han venido desarrollando generalmente en la almohadilla plantar de rata¹. Estos modelos son muy útiles para el estudio de sustancias proinflamatorias, inflamatorias y antiinflamatorias. Son modelos simples en su realización y en la determinación de resultados.

Dentro del campo de la otorrinolaringología se podría tener un modelo experimental de inflamación local, concretamente en el pabellón auricular, inducida directamente o mediante inmunización previa. El modelo resultaría igualmente sencillo en su realización, así como en la determinación de los resultados. Sencillo en su realización porque el pabellón auricular es fácilmente accesible sin necesidad de utilización de instrumentos caros y sofisticados. Fácil en la determinación de los resultados, como la medición del grosor del pabellón auricular, el volumen de la inflamación o la actividad de enzimas inflamatorias.

Para conocer si es viable este modelo experimental del pabellón auricular de rata, se procedió a protocolizar los métodos, se utilizaron sustancias proinflamatorias, inflamatorias y antiinflamatorias, se determinaron los resultados midiendo el grosor del pabellón auricular y la actividad de una enzima inflamatoria de los tejidos estudiados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales. Ratas Wistar hembras de 4-6 semanas de edad y 180-220 g de peso mantenidas en ciclo fisiológico de luz-oscuridad y alimentadas *ad libitum* en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de nuestra ciudad. El trato de los animales sigue el protocolo del Comité de Investigación.

Reactivos. Todos los reactivos utilizados han sido de grado analítico y el agua bidestilada y desionizada. Carrageenan (sustancia vegetal inductora de inflamación local); 6-metil prednisolona (corticoesteroide antiinflamatorio de marca comercial urbana); ovoalbúmina; melatonina; hidroximelatonina (antagonista de melatonina); VIP, vasoactive intestinal peptide; GRF 1-29, growth releasing factor (antagonista de VIP); PACAP, *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide* (péptido análogo de VIP); P6-38 (péptido antagonista de PACAP) de Sigma. Kit ELISA de mieloperoxidasa (enzima inflamatoria) de Calbiochem.

Preparación de reactivos. 1 mg de carrageenan en 100 μ l de suero salino fisiológico disuelto me-

dante sonicación. 200 μ g de 6-metil-prednisolona en 100 μ l de suero salino fisiológico. 1 mg de ovoalbúmina absorbido en 200 mg de $Al(OH)_3$ en 2 ml de suero salino fisiológico durante toda la noche a 4°C. 2 mg de ovoalbúmina en 100 μ l de suero salino fisiológico. 250 μ g de melatonina en 100 μ l de suero salino fisiológico conteniendo un 0,005% de etanol. 265,4 μ g de hidroximelatonina en 100 μ l de suero salino fisiológico conteniendo etanol al 0,005%. Las concentraciones de melatonina e hidroximelatonina difieren para conseguir la equimolaridad, ya que la melatonina tiene un peso molecular de 232,3 y la hidroximelatonina un peso molecular de 248,3. 100 μ l de VIP 10^{-5} Molar en 5 mM CIH. 100 μ l de PACAP 10^{-5} Molar en 5 mM CIH. 100 μ l de GRF 10^{-4} Molar en 5 mM CIH. 100 μ l de P6-38 10^{-4} Molar en 5 mM CIH. El solvente específico de cada sustancia es el que se inyecta a las orejas controles de rata.

Protocolo inflamatorio local. Las ratas son anestesiadas con vapores de cloroformo. La inflamación local se produce inyectando carrageenan subcutáneamente en la cara interna de la oreja izquierda de la rata a una concentración de 1 mg/100 μ l. En la oreja derecha se inyecta el respectivo solvente como control. Las determinaciones se han realizado de dos formas, una, midiendo el grosor de la oreja plegada mediante un nonius o calibrador pie de rey, dándose los resultados en décimas de milímetro, y otra, midiendo la actividad de la mieloperoxidasa de los tejidos, dándose los resultados en mU/100g de tejido húmedo. Otros reactivos son: melatonina 250 μ g/100 μ l, hidroximelatonina 265,4 μ g/100 μ l, 6-metil-prednisolona 200 μ g/100 μ l, VIP 10^{-5} M/100 μ l, PACAP 10^{-5} M/100 μ l, GRF 10^{-4} M/100 μ l, P6-38 10^{-4} M/100 μ l. En cada una de las determinaciones se han utilizado al menos tres animales.

Protocolo de inmunización. Las ratas son anestesiadas con vapores de cloroformo. Se inmunizan los animales con 1 mg de ovoalbúmina absorbida en hidróxido de aluminio subcutáneamente en la pata trasera, una vez a la semana durante 4 semanas. La sensibilización se realiza diez días después de la última inmunización inyectando 1 mg de ovoalbúmina de la misma manera que en la inflamación local expresada anteriormente. Brevemente, se inyecta ovoalbúmina debajo de la piel en la cara interna del pabellón auricular de la rata. Las determinaciones se han realizado de la misma manera, es decir, medición del grosor de la oreja plegada y midiendo la actividad de la mieloperoxidasa de los tejidos.

Estudio histológico. Se estudian cortes de secciones transversales de la oreja control de la rata y de la condritis auricular.

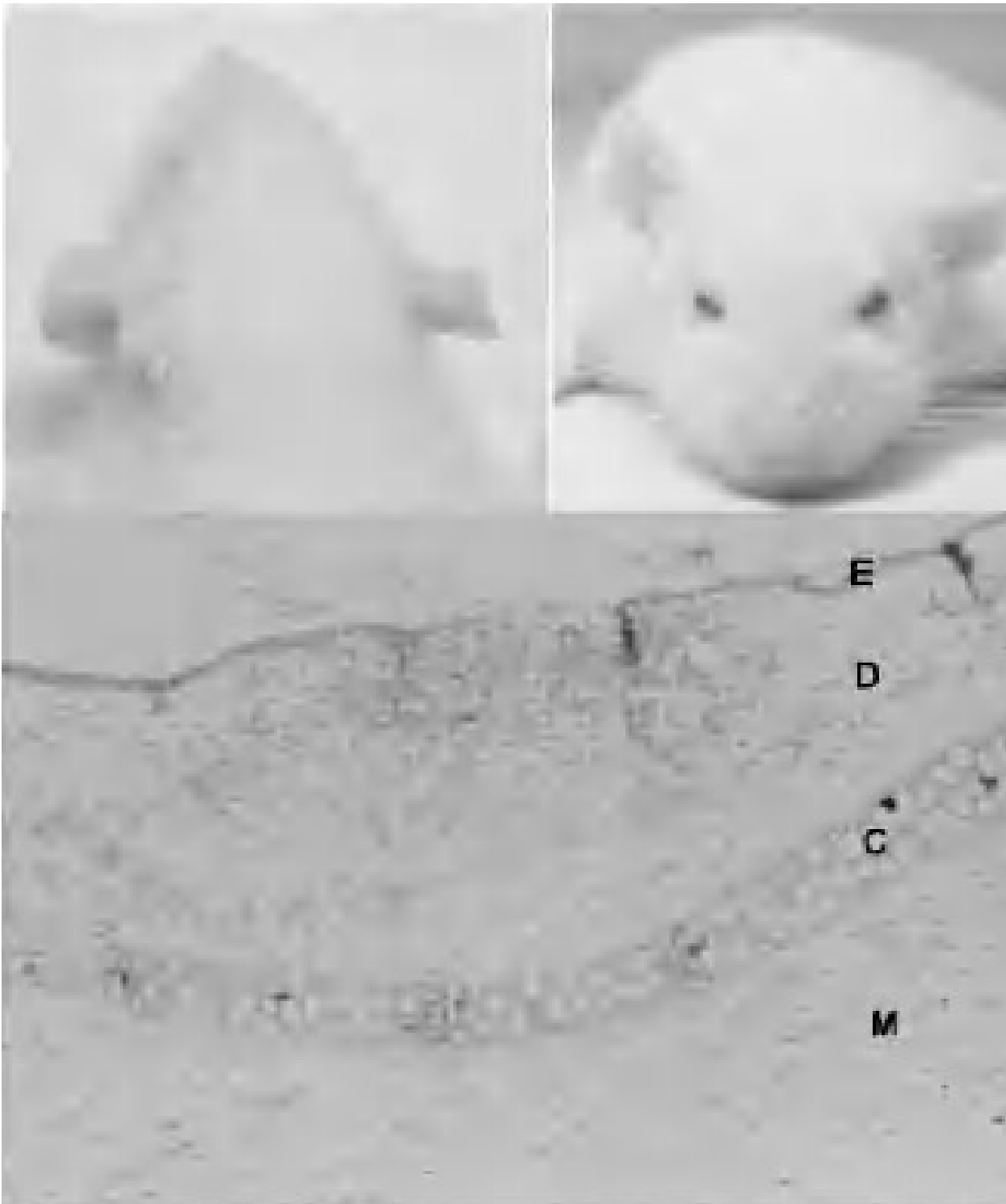


Figura 1. Estudio macroscópico e histológico de la condritis auricular en rata. La mitad superior de la figura muestra el pabellón auricular derecho normal y el pabellón izquierdo con condritis auricular. En la visión craneal se aprecia un engrosamiento sobre todo en sentido antero-posterior y en la visión frontal se observa la oreja descendida de su posición normal. La rata está anestesiada. La mitad inferior de la figura muestra el estudio histológico de una sección transversal de pabellón auricular de rata con condritis auricular. Se visualiza la infiltración de células inflamatorias en todas sus capas, desde la superficie (E, epidermis), dermis (D) hasta las más profundas como el cartilago (C) y músculo (M).

Estudio estadístico. Se realiza mediante t-Student

RESULTADOS

Estudio macroscópico e histológico. La mitad superior de la Figura 1 muestra la oreja izquierda de la rata con condritis auricular comparada con la oreja derecha sana. La mitad inferior es un corte transversal de una oreja con condritis auricular, destacando el infiltrado inflamatorio en todas sus capas.

Cinética de tiempo. Efecto del carrageenan a lo largo del tiempo, desde las 3 hasta las 72 horas tras su administración con y sin tratamiento antiinflamatorio. Se detalla en la Figura 2. A partir de este estudio, todas las determinaciones se han realizado a las 3 horas de la administración de las sustancias.

Efecto del antiinflamatorio sobre la acción de diferentes sustancias en la condritis auricular inducida por carrageenan. La acción de MLT, VIP y PACAP, a las concentraciones expresadas en material y métodos, sobre la condritis auricular de rata inducida por carrageenan en presencia y ausencia de 6-metil prednisolona se detalla en la Figura 3.

Efecto de los antagonistas sobre la acción de diferentes agonistas en la condritis auricular inducida por carrageenan. La acción de MLT, VIP y PACAP, a las concentraciones expresadas en material y métodos, sobre la condritis auricular de rata inducida por carrageenan en presencia y ausencia de sus

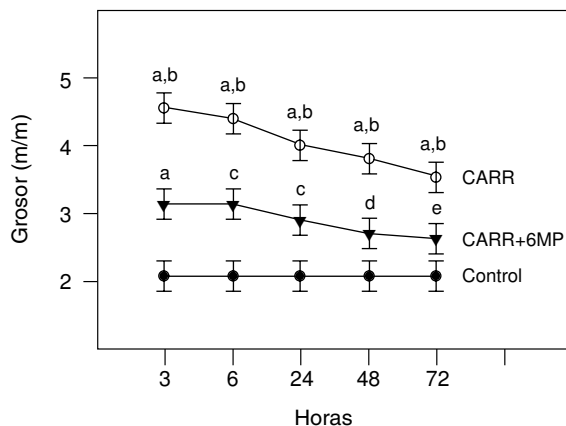


Figura 2. Cinética de tiempo de la inflamación producida por carrageenan (CARR) y su tratamiento con 6-metil prednisolona (6MP). t-Student: a versus Control P<0,001; b versus CARR+6MP p<0,005; c versus Control P<0,005; d versus Control P<0,01; e versus Control P<0,05.

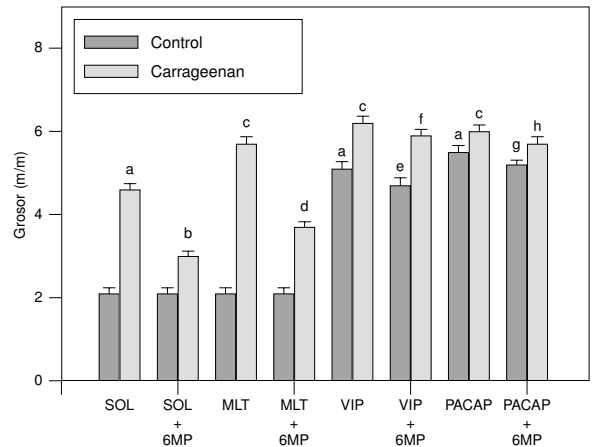


Figura 3. Condritis auricular producida por carrageenan en presencia de sustancias proinflamatorias (MLT, melatonina), inflamatorias (VIP, vasoactive intestinal peptide; PACAP, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) y antiinflamatorias (6MP, 6-metil prednisolona). SOL, solvente. Se ha determinado el grosor de la oreja. t-Student: a versus Control-SOL P<0,001; b versus Carrageenan-SOL P<0,001; c versus Carrageenan-SOL P<0,05; d versus Carrageenan-MLT P<0,001; e versus Control-VIP P=0,184; f versus Carrageenan-VIP P=0,323; g versus Control-PACAP P=0,332; h versus Carrageenan-PACAP P=0,322.

respectivos antagonistas (OHMLT, GRF, y P6-38) se detalla en la Figura 4.

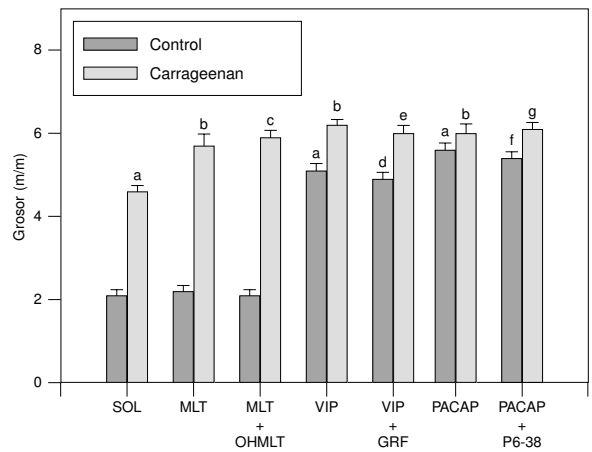


Figura 4. Condritis auricular producida por carrageenan en presencia de sustancias proinflamatorias (MLT, melatonina), inflamatorias (VIP, vasoactive intestinal peptide; PACAP, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) y sus respectivos antagonistas (OHMLT, hidroximelatonina, antagonista de MLT; GRF, growth releasing factor, antagonista de VIP; P6-38, péptido antagonista de PACAP). Se ha determinado el grosor de la oreja. t-Student: a versus Control-SOL P<0,001; b versus Carrageenan-SOL P<0,005; c versus Carrageenan-MLT P=0,536; d versus Control-VIP P=0,533; e versus Carrageenan-VIP P=0,539; f versus Control-PACAP P=0,457; g versus Carrageenan-PACAP P=0,744.

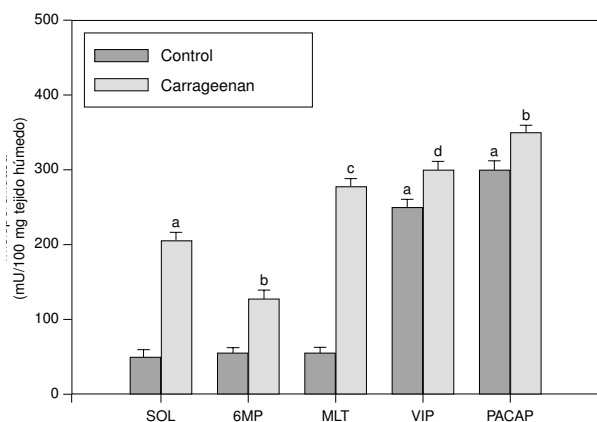


Figura 5. Condrítis auricular producida por carrageenan en presencia de sustancias proinflamatorias (MLT, melatonina), inflamatorias (VIP, vasoactive intestinal peptide; PACAP, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) y antiinflamatorias (6MP, 6-metil prednisolona). SOL, solvente. Se ha determinado la actividad de la enzima mieloperoxidasa. t-Student: a versus Control-SOL $P < 0,001$; b versus Carrageenan-SOL $P < 0,005$; c versus Carrageenan-SOL $P < 0,05$; d versus Carrageenan-SOL $P < 0,01$.

Determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa en la condritis auricular inducida por carrageenan. La medición de la inflamación de la condritis auricular mediante esta enzima inflamatoria se expone en la Figura 5.

Condrítis auricular autoinmune inducida por ovoalbúmina. Se ha obtenido una condritis auricular autoinmune donde el proceso inflamatorio local ha sido de menor intensidad que el obtenido mediante carrageenan (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Los modelos experimentales de inflamación local inducida por carrageenan (una sustancia vegetal productora de inflamación local) se vienen desarrollando en la almohadilla plantar de rata¹. Dentro del campo de la otorrinolaringología no había ningún modelo donde poder estudiar y reproducir procesos inflamatorios locales. Hemos venido desarrollando un modelo de inflamación local inducida por carrageenan en la oreja de la rata, produciéndose una condritis auricular (Figura 1 mitad superior) como hemos podido constatar mediante estudios histológicos (Figura 1 mitad inferior), así como el estudio de la acción y efectos de diferentes sustancias sobre este cuadro experimental (Figuras 2-5). La me-

dición de la inflamación de ha realizado con nonius y mediante la determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa. Cuando se ha utilizado la mieloperoxidasa, la diferencia entre los controles y la condritis auricular ha sido mucho mayor que la diferencia encontrada mediante el nonius. La medición con nonius o calibrador pie de rey, en cambio, resulta mucho más sencilla y asequible en cualquier medio que no disponga de determinaciones enzimáticas.

De la misma manera hemos desarrollado una condritis auricular autoinmune inyectando ovoalbúmina. Los resultados inflamatorios locales han sido de menor intensidad que los obtenidos mediante carrageenan. Condrítis auricular autoinmune inducida por colágeno tipo II ya fue descrita con anterioridad por otros autores².

Hemos utilizado diferentes sustancias para conocer los efectos que sus acciones puedan tener sobre la condritis auricular inducida por carrageenan. La MLT se ha comportado como proinflamatoria, es decir, por sí misma no produce inflamación, pero aumenta la inflamación producida por carrageenan. El VIP y PACAP se han comportado como inflamatorios al producir inflamación local por sí mismos. El antiinflamatorio utilizado ha sido la 6MP (urbasón) que ha reducido la condritis auricular, aunque en la inflamación producida por VIP y PACAP no ha habido diferencia significativa, pudiéndose deber a la intensidad de la actividad inflamatoria de estos péptidos o a que hubiera sido necesario incrementar la concentración de 6MP. La melatonina se ha comportado como sustancia moduladora. Este tipo de modulación de la melatonina ya fue constatado con anterioridad en diferentes procesos inmunes³⁻⁷. También se ha constatado que la acción de estas sustancias no está mediada por receptor, ya que sus respectivos antagonistas no han podido suprimir la inflamación. Otras acciones producidas por VIP también se realizan sin mediación de su receptor⁸⁻¹².

Existe controversia en relación con las acciones de MLT y VIP en la inflamación. En modelo de inflamación local la ausencia de MLT inhibe la respuesta inflamatoria¹³. En pacientes con tumores sólidos que recibieron interleukina-2 la acción de la MLT incrementó los linfocitos T, las células "natural killer" y los eosinófilos¹⁴. En cambio otros autores han encontrado un efecto antiinflamatorio^{15,16}. Estos resultados aparentemente contrapuestos pueden entenderse dentro del mecanismo modulador de la MLT, que variaría en relación con el status y los niveles presentes de los diferentes compuestos en esa específica acción, es decir, la MLT tendría un efecto modular de la respuesta inflamatoria dependiendo

del estado concreto de la inflamación, de forma favorecedora o inhibitoria de esa respuesta inflamatoria. También puede estar relacionado con la no participación del receptor de MLT en el efecto de estas acciones sobre la inflamación. El VIP es una sustancia inflamatoria en la piel¹⁷⁻¹⁹ y en órganos relacionados con la otorrinolaringología como la rinitis alérgica²⁰, los pólipos nasales²¹, la apnea obstructiva del sueño²² y la neuralgia del trigémino²³. Otros autores han encontrado un efecto antiinflamatorio del VIP en la microglia²⁴⁻²⁶. El PACAP produce efecto inflamatorio ocular²⁷ y activa los granulocitos²⁸. En cambio, también presenta efecto antiinflamatorio al regular la producción de mediadores inflamatorios²⁹ y su acción sobre la microglia²⁴. Estas diferentes acciones de VIP y PACAP están inmersas en el efecto pleotrópico de la activación de las múltiples vías de señalización del sistema nervioso³⁰, pudiendo estar también influenciado por la acción de sus efectos mediante receptor o independiente al receptor.

La condritis auricular puede producirse de forma

espontánea en ratas Wistar de laboratorio³¹, presentando características similares a la inducida por carrageenan.

Destacamos la validez del modelo experimental de inflamación local inducida por carrageenan en oreja de rata. Un modelo experimental que ha sido la primera vez que se describe y que entra completamente dentro del campo de la otorrinolaringología por la familiaridad con la condritis auricular producida.

CONCLUSIONES

1. Validez de la condritis auricular como modelo experimental de inflamación local inducida por carrageenan en oreja de rata.

2. Comportamiento de MLT como sustancia proinflamatoria y de VIP y PACAP como inflamatorias, estando sus acciones no mediadas por receptor.

REFERENCIAS

- García-Leme J, Hamamura L, Leite MP, Rocha e Silva M. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenan and by heating. *Br J Pharmacol* 1973; 48:88-96.
- Cremer MA, Pitcock JA, Stuart JM, Kang AH, Townes AS. Auricular chondritis in rats. An experimental model of relapsing polychondritis induced with type II collagen. *J Exp Med* 1981; 154:535-540.
- Lopez-Gonzalez MA, Osuna C, Martin-Cacao A, Guerrero JM. Melatonin potentiates vasoactive intestinal peptide (VIP)-stimulated cyclic AMP production in human lymphocytes. *Eur J Physiol* 1993; 426:R56(53).
- Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Osuna C, Rubio A, Guerrero JM. Melatonin potentiates cyclic AMP production stimulated by vasoactive intestinal peptide in human lymphocytes. En: Touitou Y, Arent J, Pevet P (Eds): *Melatonin and the pineal gland: From basic science to clinical application*, Excerta Medica, Amsterdam (NE) 1993; 273-276.
- Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Osuma C, Rubio A, Guerrero JM. Synergistic action of melatonin and vasoactive intestinal peptide in stimulating cyclic AMP production in human lymphocytes. *J Pineal Res* 1992; 12:174-180.
- Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Osuna C, Guerrero JM. Interaction of melatonin with human lymphocytes: Evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulated by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP. *J Pineal Res* 1992; 12:97-104.
- Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Osuna C, Rubio A, Guerrero JM. Melatonin potentiates cyclic AMP production stimulated by vasoactive intestinal peptide in human lymphocytes. *Neurosci Lett* 1992; 136:150-152.
- Pedreira C, Lucas M, Bellido L, Lopez-Gonzalez MA. Receptor-independent mechanisms are involved in the priming of neutrophil's oxidative by vasoactive intestinal peptide. *Regul Peptides* 1994; 54:505-511.
- Bellido L, Lopez-Gonzalez MA, Pedreira C, Lucas M. Vasoactive intestinal peptide inhibits fMLP-induced respiratory burst in human lymphocytes. *Life Sci* 1994; 54:1909-1916.
- Lopez-Gonzalez MA, Lucas M. Priming effect of vasoactive intestinal peptide on the respiratory burst of neutrophils non-mediated by plasma membrane receptors. *Experientia* 1994; 50:486-488.
- Lopez-Gonzalez MA, Lucas M, Guerrero JM. Synergistic action of melatonin and vasoactive intestinal peptide in stimulating chemiluminescence response induced by phorbol myristate acetate in human lymphocytes. En: Maestroni GJM, Conti A, Reiter RJ (Eds): *Advances in Pineal Research*, John Libbey and Co, London (UK), volume 7, chapter 17. 1994; 149-154.
- Lopez Gonzalez MA, Guerrero JM, Lucas M. Vasoactive intestinal peptide enhances phorbol myristate acetate-induced chemiluminescence in human lymphocytes. *Life Sci* 1992; 51:1803-1810.
- Lobo RA, Limaos EA. Inflammatory response modulated by pinealectomy: effect of light. *Braz J Med Biol Res* 1991; 24:1159-1162.
- Lissoni P, Barni S, Tancini G, Fossati V, Frigerio F. Pineal-opioid system interactions in the control of immunoinflammatory responses. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 741:191-196.
- Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabo C. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J Pineal Res* 1997; 23:106-116.
- Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:376-386.
- Hartschuh W, Weihe E, Reinecke M. Peptidergic (neurotensin, VIP, substance P) nerve fibres in the skin. Immunohistochemical evidence an involvement of neuropeptides in nociception, pruritus and inflammation. *Br J Dermatol* 1983; 109 Suppl 25:14-17.
- Boisnic S, Branchet-Gumila MC, Segard C. *Int J Tissue React* 2001; 23:89-95.
- Boisnic S, Branchet-Gumila

- MA, Coutanceau C. Inhibitory effect of oatmeal oligomer on vasoactive intestinal peptide-induced inflammation in surviving human skin. *Int J Tissue React* 2003; 25:41-46.
- 20.-** Mosimann BL, White MV, Hohman RJ, Goldrich MS, Kaulbach HC, Kaliner MA. Substance P, calcitonin gene-related peptide, and vasoactive intestinal peptide increase in nasal secretions after allergen challenge in atopic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92:95-104.
- 21.-** Fang SY, Shen CL, Ohyama M. Presence of neuropeptides in human nasal polyps. *Acta Otolaryngol* 1994; 114:324-328.
- 22.-** Rubinstein I. Nasal inflammation in patients with obstructive sleep apnea. *Laryngoscope* 1995; 105:175-177.
- 23.-** Zhao Y, Jiang X, Liu Y. Observation of vasoactive intestinal peptide in patients with trigeminal neuralgia: a 16-cases report. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2002; 20:33-34.
- 24.-** Delgado M, Leceta J, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. *J Leukoc Biol* 2003; 73:155-164.
- 25.-** Delgado M. Inhibition of interferon (IFN) gamma-induced Jak STAT1 activation in microglia by vasoactive intestinal peptide: inhibitory effect on CD40, IFN-induced protein-10, and inducible nitric-oxide synthase expression. *J Bio Chem* 2003; 278:27620-27629.
- 26.-** Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide prevent activated microglia-induced neurodegeneration under inflammatory conditions: potential therapeutic role in brain trauma. *FASEB J* 2003; 17:1922-1924.
- 27.-** Wang ZY, Alm P, Hakanson R. PACAP occurs in sensory nerve fibers and participates in ocular inflammation in the rabbit. *Ann N Y Acad Med* 1996; 805:779-783.
- 28.-** Kinshult J, Egesten A, Uddman R, Cardell LO. PACAP enhances the expression of CD11b, CD66 and CD63 in human neutrophils. *Peptides* 2002; 23:1735-1739.
- 29.-** Delgado M, Abad C, Martínez C, Juarranz MG, Leceta J, Ganea D, Gomariz RP. PACAP in immunity and inflammation. *Ann N Y Acad Med* 2003; 992:141-157.
- 30.-** Zhou CJ, Shioda S, Yada T, Inagaki N, Pleasure SJ, Kikuyama S. PACAP and its receptors exert pleiotropic effects in the nervous system by activating multiple signaling pathways. *Curr Protein Pept Sci* 2002; 3:423-439.
- 31.-** Mcewen BJ, Barsoum NJ. Auricular chondritis in Wistar rats. *Lab Animals* 1990; 24:280-283.