



47



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL DIAZEPAM EN LA PROLIFERACIÓN
DE LINFOCITOS DURANTE EL ESTRÉS CRÓNICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MARTÍN EDUARDO FLORES CONTRERAS

MÉXICO, D.F.

2002



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

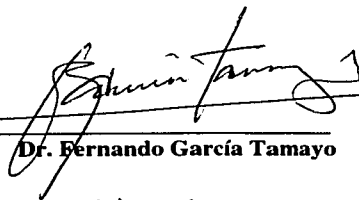
Presidente:
Vocal:
Secretario:
1er. Suplente:
2do. Suplente:

Prof. Saturnino de Leon Chapa
Prof. Elia Brosla Naranjo Rodríguez
Prof. Fernando García Tamayo
Prof. Patricia Elvira Barrón Ruiz
Prof. Alejandro Ortiz Osornio

Sitio donde se desarrolló el trabajo experimental :

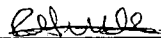
Laboratorio de Biología Molecular,
Sección de Inmunología, del Dpto. de Biología y
Laboratorio 1-E, Sección de Farmacología, del Dpto. de Farmacia.

Asesor del tema :



Dr. Fernando García Tamayo

Supervisor Técnico :



MC María Guadalupe Reyes García

Sustentante :



Martín Eduardo Flores Contreras

Antes que nada quiero agradecer a mis
dos mejores amigos los que siempre
estuvieron conmigo y me apoyaron
en todo, y más aún en los momentos
más difíciles y más importantes en mi vida:

**Martín Flores Prieto y
Lilia Contreras Jiménez**

Con respeto, admiración y cariño a los dos
seres que me dieron la vida y
a quienes les debo todo:

a mi Papá por darnos un gran ejemplo y principios
y a mi Mamá por todo su tiempo, cariño y educación.

A mis hermanos; Edna Lilian y Orlando
con mucho cariño por que las discusiones
siempre nos hicieron mas fuertes.
En especial a mi hermano Orlando por estar
aquí con nosotros (tienes mucho por hacer)
Los quiero mucho.

A mi primos:
Christian: Por estar conmigo desde el 1er
Año + 1 día, en momentos siempre importantes (eres mi brother)
Raúl: A pesar de todo siempre seremos primos
y nos estaremos.
Claudia: Por que vuelvas a ser esa prima tan linda
entusiasta y cariñosa de antes.
Vanesa, Pepe, Carla, Pedro, Tantaël, Cindy, Samanta, Andrea,
Maize, Naomi, Ariari, Tlacael y Atonatiu: Echelenle ganas por
que esta gran familia los respalda

Charly, Cesar e Iván: Por todos esos momentos de niños

Y a mi compadre Demian, Linda y Malcom
por esa gran Amistad, desde niños y hasta viejos.

A toda la familia Contreras:
Empezando con mis abuelitos:
Amalia (en paz descanse) y Luciano
Y en especial a las Familias:
López-Contreras, Retel-Contreras
Contreras-Mosqueda, Morales Contreras y
Martínez-Contreras por estar tan cerca
de nosotros siempre.
A mis tios Juan-Lorena e hijas por querernos
tanto desde tan lejos.
Gracias a todos por que para mi siempre
serán la mejor familia que se pueda tener.

A toda la familia Flores:
En especial a mis abuelitos Joaquín y Ana
y a mis tios, Joaquín, Santos y
Miguel Ángel por estar en los

momentos importantes.

A Lupita y al Doctor Tamayo por su gran paciencia y apoyo en este trabajo así como en otros aspectos de la vida.

A la Dra. Elia Brosla por su valiosísima ayuda en este trabajo y por profesar en su laboratorio ese gran sentido de humanidad, respeto y cooperación que todos deberíamos de tener.

A Alejandro y Ruth por que Además de ser unos excelentes Maestros son unos grandes amigos

**A todos ustedes por que además de ser unos grandes Investigadores, son unos grandes seres humanos que es lo que caracteriza a nuestra Universidad
(Además de tener buen sentido del Humor)**

A mis amigos de toda la vida:

Rene: Por su entusiasmo para hacer las cosas

Rafa: Por ser ese gran abuelito que se preocupa por todos y que todos queremos.

Chucho: Por darnos siempre de que hablar y además estar ahí.

Cesar: Por ser un tipo tan gracioso

Etiene: Por ser un tipo tan peculiar.

Samperio: Por sus apariciones tan mágicas en momentos que duraran toda la vida

Alex: Por vivir tan intensamente los momentos que pasamos y comer de esa manera.

Minirober: Por compartirnos tu casa (solo tu casa y nada mas) y tu gente.

Alma: Por ser la definición de amiga siempre.

Norma: Por ser otra buena amiga desde siempre

Hilda: Por ser una chava diferente, buena onda y además novia de mi compadre.

A todos por ser mis amigos y ser tan importantes desde siempre.

A mis compañeros de primer semestre
por que siempre nos reiremos
de esos momentos.

A mis compañeros del H.H. equipo
de Fútbol MTT; que nunca será olvidado:

Iñigo, Memito, Memo, Abel, El carnes y Alfredo

y a las muchachas que siempre
nos apoyaron incondicionalmente:

Chayo, Lety y Arminda,

A mis minicompadres:
Roberto, Chucho, Alberto, Javy,
Miguel, José, Ricardo David y Orlando.
Por todos esos momentos inolvidables y
Esperando les sirva de ejemplo.

A mis grandes amigas:
Paty y Cindy por todos
esos momentos tan especiales
y enriquecedores (de nivel).

A Juan Carlos por su ayuda técnica en
la realización de este trabajo y Andrea
por ser tan linda y atenta
(se merecen lo mejor).

A una personita valiosísima que conoci
en el momento indicado y que me ha dejado
tantas enseñanzas, gracias por compartir
conmigo algo mas que simple tiempo.
(Nunca cambies YTVATV)
Miriam Fitta Dorantes
y familia
C.A.P.S.

Todos ustedes son parte de esto y muchas cosas mas en mi vida

Vivan cada día como si fuera el último, quiéranse y respétense aunque sea a su manera.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	4
2.1 ESTRÉS	4
2.1.1. Definición	4
2.1.2. Estrés agudo y estrés crónico	4
2.1.3. Inductores del estrés	5
2.2. MEDIADORES DE LA RESPUESTA A ESTRÉS	5
2.2.1. Hormona liberadora de corticotropina (CRH)	7
2.2.2. Mineralocorticoides y glucocorticoides	7
2.2.3. Citocinas	10
2.3. INTERACCIONES NEURO-ENDOCRINO-INMUNOLÓGICAS	12
2.3.1. Prostaglandinas	12
2.3.2. Sustancia P	13
2.3.3. Dehidroepiandrosterona (DEA)	14
2.3.4. Serotonina	14
2.3.5. Opioides	15
2.3.6. Neuropéptidos	15
2.3.7. Vasopresina	15
2.3.8. La Hormona del crecimiento y la prolactina	16
2.3.9. Catecolaminas	16
2.3.10. Otras citocinas.	17
2.4. TRATAMIENTO DEL ESTRÉS	17
2.5. LAS BENZODIACEPINAS (BZP)	17
2.5.1 Historia	17
2.5.2. El diazepam	19
2.5.3. Farmacocinética	19
2.5.4 Farmacodinamia	20
2.5.5 Efectos adversos	20
2.5.6 Dependencia física	21
2.5.7 El receptor Gaba-Bzp.	22

3.	OBJETIVO	23
4.	HIPÓTESIS	24
5.	MATERIAL, MÉTODOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	25
5.1.	Animales	25
5.2.	Inducción del estrés	25
5.3.	Control de peso	26
5.4.	Tratamiento con diazepam	26
5.5.	Prueba del MTT	27
5.6.	Estandarización del ensayo del MTT	28
5.7.	Porcentaje de viabilidad	29
5.8.	Obtención de linfocitos de bazo.	29
5.9.	Ajuste de la concentración celular	30
5.10.	Linfoproliferación y reducción del MTT.	31
5.11.	Análisis estadístico de los resultados	31
6.	RESULTADOS	32
6.1.	Efecto del Hacinamiento en el peso de los animales	32
6.1.1.	Efecto del Tratamiento con diazepam	32
6.2.	Linfoproliferación.	34
6.2.1.	Efecto del hacinamiento sobre la reducción del MTT	34
6.2.2.	Efecto del diazepam sobre la linfoproliferación	35
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
8.	APÉNDICE	42
	Anexo I	47
9.	BIBLIOGRAFÍA	48

1. INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos mantienen una interacción continua con el medio ambiente que los rodea, de este modo pueden encontrar alimentos, reproducirse, acercarse a los ambientes más favorables o evadir aquellos que representan riesgos. En los animales pluricelulares, todas las señales que se reciben del medio ambiente se proyectan sobre los sistemas nervioso y endocrino e inducen una respuesta. Generalmente, esa respuesta neuroendocrina implica un cambio en la conducta del individuo.

De todas las respuestas del sistema neuroendocrino, probablemente las más conocidas son las respuestas "de alarma" identificadas también como "respuestas de estrés", gracias a ellas los seres vivos quedan preparados para defenderse mejor ante las situaciones adversas porque activan una serie de vías metabólicas y sistemas defensivos.

Sin embargo, sucede más a menudo de lo que sería deseable que las respuestas de alarma se repitan con una frecuencia elevada o se prolongan durante demasiado tiempo. En esos casos, aunque el objetivo de esas respuestas es indudablemente preservar la vida, las consecuencias pueden ser perjudiciales y la conducta resultante no siempre corresponde a la normalidad. Además, el estrés que se repite o se prolonga puede propiciar la aparición de algunas enfermedades como la úlcera gastroduodenal, hipertensión arterial o susceptibilidad a infecciones y/o cáncer. En los últimos años se le ha dado particular importancia a los efectos del estrés sobre la competencia del sistema inmune.

En todos estos últimos casos se ha buscado reducir la intensidad de las respuestas de alarma mediante la administración de fármacos que disminuyen la excitabilidad del sistema nervioso central. Uno de los fármacos más conocidos y de más amplia utilización es el diazepam (DZP), de la familia de las benzodiazepinas. El DZP se puede administrar a diferentes dosis y según la cantidad administrada puede actuar como sedante, anti-estresante, ansiolítico, hipnótico o anti-convulsivante. Ya que este fármaco produce dependencia, su venta se encuentra controlada, sin embargo al DZP no se le atribuye una toxicidad peligrosa y la mayor parte de la literatura no menciona si tiene o no un efecto sobre la competencia del sistema inmune. Más bien, se le utiliza para reducir el estrés y así evitar sus efectos sobre la inmunidad.

En el presente trabajo experimental se diseñó una situación en la cual un grupo de ratones eran sometidos a condiciones estresantes que podían afectar la respuesta del sistema inmune y, al mismo tiempo, recibían un tratamiento anti-estresante para reducir el compromiso de los linfocitos.

Los resultados fueron muy interesantes, en primer lugar, quedó claro que no todas las condiciones experimentales estresantes afectan automáticamente al sistema inmune. El estrés social por hacinamiento durante 4 semanas afectó el progreso del peso de los ratones, provocándoles un retraso en el desarrollo de su masa corporal. Sin embargo, ese mismo estrés no afectó significativamente la respuesta *in vitro* de los linfocitos del bazo de los ratones. En cambio con el tratamiento con diazepam se puede observar que los animales mostraron los cambios mas notables en la respuesta de los linfocitos estimulados *in vitro*. De esta manera el diazepam mostró inmunosupresión para los animales que, se esperaba, iban a mejorar su competencia inmunológica al recibir un tratamiento anti-estresante.

Los resultados del trabajo dejan abiertas numerosas puertas para estudiar los aspectos farmacológicos que resultan de las interacciones entre los sistemas

inmune, nervioso y endocrino. El significado biológico de los resultados obtenidos, por ejemplo, no formó parte de los objetivos de este estudio, ni tampoco medir las concentraciones reales del diazepam en la sangre de cada animal.

Sin embargo, se puede decir que, por la frecuencia clínica del estrés, los modelos experimentales que estudian los efectos de tratamientos anti-estresantes en animales de laboratorio siguen siendo recursos muy útiles para evaluar los riesgos que pueden tener los humanos, tanto por no controlar el estrés como por hacerlo de una manera inadecuada. Los resultados de este trabajo experimental, muy sencillo, pueden ser una información preliminar sobre la cual podrá ser posible más adelante evaluar con más fidelidad los riesgos inmunológicos del paciente estresado que recurre al diazepam como un tratamiento.

2. ANTECEDENTES

2.1 ESTRÉS

2.1.1. Definición. El estrés se define como una "respuesta de alarma" que inician los sistemas nervioso y endocrino de los seres vivos, cada vez que estos se encuentran en un medio ambiente hostil, cuando se sienten amenazados o creen estarlo y cuando sufren lesiones en diferentes tejidos. La respuesta de estrés se caracteriza por un aumento en la producción y en la liberación de glucocorticoides en la corteza de las glándulas adrenales y de catecolaminas en varios núcleos del sistema nervioso central que transmiten señales al sistema nervioso vegetativo periférico (1).

2.1.2. Estrés agudo y estrés crónico. Se han observado dos tipos principales de respuesta al estrés (aguda y crónica), que dependen principalmente del tiempo durante el cual actúa el factor que provoca el estrés.

El estrés agudo esta provocado por eventos esporádicos que son percibidos de una manera sobresaliente. En cambio, el estrés crónico está provocado por estímulos continuos durante semanas o meses, cuyas consecuencias pueden ser exacerbadas por el uso del tabaco y el alcohol y reducidas por el ejercicio moderado. El estrés crónico se observa como fatiga, anorexia, perdida de peso, irritabilidad y hostilidad, así como aumento de la presión arterial, úlceras en el estómago y compromiso de la respuesta del sistema inmune lo cuál aumenta la susceptibilidad a infecciones (2,3).

2.1.3 Inductores de estrés.

Se pueden clasificar según su origen en :

a) **Físicos:** Entre los cuales se encuentran el calor excesivo, cambios de clima, el frío excesivo, el ruido molesto, el ejercicio intenso, la contaminación ambiental (p. ej. niveles excesivos de ozono), las quemaduras, radiaciones ionizantes, las cirugías y cualquier clase de herida, etc. (4,5,6).

b) **Biológicos:** Como las infecciones causadas por bacterias, hongos, parásitos y virus, así como las toxinas de los mismos. Algunas complicaciones conjuntamente con el envejecimiento y el embarazo pueden ser también factores estresantes (5,7).

c) **Químicos:** Como las exposiciones a sustancias tóxicas y la liberación excesiva de radicales libres.

d) **Psicológicos:** Como la depresión, el miedo, los periodos de exámenes estudiantiles, las preocupaciones, el desempleo, los asaltos, el divorcio, la pérdida de la autoestima, la proximidad de la muerte, las guerras, la enfermedad de los familiares, etc. (2,8).

2.2. MEDIADORES DE LA RESPUESTA A ESTRÉS.

Los factores responsables de los principales síntomas y/o efectos que caracterizan la respuesta de alarma o estrés (las catecolaminas y los glucocorticoides) ejercen siempre la misma estimulación de los diferentes tejidos del cuerpo. Los factores mediadores de la respuesta de estrés se liberan al comienzo y al final de la estimulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA).

Como se indica en la Fig. (1) al comienzo de la respuesta de alarma, en el hipotálamo se provoca un aumento en la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y de catecolaminas que estimulan los núcleos de células que controlan el sistema nervioso autónomo ó vegetativo. A continuación, la CRH del hipotálamo estimula las células de la hipófisis y aumenta así la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). Finalmente, la ACTH pasa a la sangre y ocasiona un aumento en la liberación de glucocorticoides en la corteza de las glándulas adrenales y esta hormona se distribuye por todo el cuerpo provocando una serie de cambios, particularmente en el metabolismo de los carbohidratos y de las grasas, así como en el tejido óseo (9,10,11).

A continuación se mencionan algunas características importantes de los principales mediadores de la respuesta de estrés:

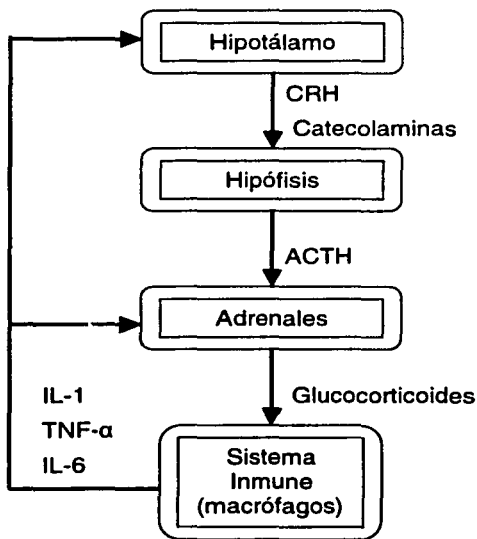


Fig (1). Diagrama que representa el circuito de regulación mutua entre el sistema inmune y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenales (12).

2.2.1 Hormona Liberadora de Corticotropina (CRH). Los resultados de las investigaciones realizadas en varios laboratorios indican que el CRH es el iniciador de la respuesta del estrés y que, después de transcurridos algunos minutos de iniciada la percepción de los estímulos estresantes, el RNAm del CRH aparece en el núcleo paraventricular. Esto significa que el hipotálamo es el principal productor de CRH (13,14).

Una vez que se secreta el CRH dentro de los capilares del plexo venoso portal hipofisial, el cual se extiende hacia el interior de la glándula pituitaria este actúa entonces, en las células basófilas del interior de la pituitaria para inducir la síntesis de propiomelanocortina, una poliproteína que subsecuentemente, a través de varios cambios post-traduccionales, va a formar corticotropina, β -endorfina y la hormona estimulante de α -melanocito (9,15,16,17,18).

Cuando el CRH llega a la hipófisis desarrolla una actividad estimulante extensa. Algunas neuronas contienen CRH y han sido encontradas por todo el cerebro, pero la mayor concentración de neuronas que contienen CRH se encuentran localizadas en el núcleo paraventricular del hipotálamo. En el curso de una respuesta de estrés, el CRH estimula la síntesis y la secreción de noradrenalina de las terminales nerviosas simpáticas. En consecuencia, las concentraciones de noradrenalina y adrenalina están elevadas durante el estrés. Estas catecolaminas, junto con los corticosteroides, representan las hormonas del estrés (18,19,20,21,22,23).

2.2.2. Mineralocorticoides y Glucocorticoides. Son las principales hormonas producidas en las glándulas adrenales, su estructura consta de 21 carbonos y es derivada del colesterol, los mineralocorticoides ejercen efectos predominantes sobre la excreción de sodio y potasio y los glucocorticoides tienen predominio sobre el metabolismo de la glucosa y de las proteínas. El aumento de su producción tiene numerosos efectos, sobre todas las células del cuerpo y algunos de esos efectos suelen ser perjudiciales. Así por ejemplo, se ha demostrado que

la atrofia de las dendritas puede ser provocada por un exceso en la producción de glucocorticoides, debido a que este efecto se ha podido anular al bloquear sus receptores.

Los glucocorticoides suprimen la acción pro-inflamatoria de las citocinas (IL-1, el TNF- α y la IL-6) y, a su vez, esas moléculas estimulan el eje HHA y provocan un aumento de los glucocorticoides *in vivo*. Las hormonas glucocorticoides regulan negativamente el eje HHA cuando se unen a sus receptores específicos en el interior de la glándula pituitaria, en el hipotálamo y en otras áreas del cerebro como el hipocampo, que es el lugar donde se ha encontrado la más alta concentración de receptores para glucocorticoides (24,25,26).

Los glucocorticoides como la corticosterona en los ratones o el cortisol en los humanos, se unen a sus receptores específicos que se encuentran tanto en las neuronas como en los astrocitos. Los corticosteroides actúan en el cerebro para regular una gran cantidad de funciones adaptativas y homeostáticas y también para regular la respuesta al estrés.

Los corticosteroides ejercen su acción principalmente en el cerebro a través de sus dos tipos de receptores (para glucocorticoides y mineralocorticoides) que se encuentran en el citoplasma y a los cuales se unen. Posteriormente los complejos formados pasan al interior del núcleo en donde se unen a los genes y actúan como factores de transcripción para regular la expresión de los neuropéptidos, de citocinas y otras sustancias. Los glucocorticoides, participan en el control de la excitabilidad basal y en respuestas al comportamiento, mientras que los mineralocorticoides como la aldosterona están involucrados en la terminación de la respuesta de estrés y en la supresión del incremento de la excitabilidad por estímulos excitatorios. El hipocampo contiene ambos tipos de receptores. Durante el estrés, los corticosteroides aumentan su concentración en

la sangre y en los tejidos y alteran las funciones de numerosas células (22,27,28,29).

Los receptores del hipocampo para corticosteroides desempeñan un papel importante en el mantenimiento del control de la homeostasis, ya que su expresión puede estar firmemente regulada (9).

La activación neuroendocrina del eje HHA por las citocinas que estimulan el hipotálamo se encuentran moduladas por una retroalimentación negativa mediada por los receptores para los glucocorticoides, lo cual resulta en un apagamiento de la respuesta de estrés. Varios sitios de retroalimentación para glucocorticoides han sido propuestos. Tanto en la hipófisis, el hipotálamo, el hipocampo y la corteza frontal se ha observado que después del estrés disminuye la cantidad de receptores para los glucocorticoides (29,30).

La habilidad de los organismos para responder al estrés se debe a su capacidad para modificar la expresión de los genes que codifican para el receptor de glucocorticoides. En ratas ya adultas el estrés agudo disminuye la expresión del RNAm del receptor para glucocorticoides y también los niveles de estos receptores en sitios específicos del hipocampo (29,31).

Una exposición a un estrés crónico agrava esta situación ya que provoca una disminución dramática en la expresión de RNAm del receptor de glucocorticoides en la región CA1, CA2 y el giro dentado, mientras que la expresión del RNAm del receptor glucocorticoideo en la región CA3 no es alterado. Pero al no estar disminuida la expresión de los receptores para glucocorticoides, esta área del hipocampo es la más susceptible a daño por estrés crónico. En cambio después de la exposición a un estrés agudo no se ha observado una disminución en la expresión del gene para ese receptor (32,33).

La importancia de regular la expresión del gene del receptor de los glucocorticoides después de una exposición a un efecto estresante reside en la facilitación del eje HHA para responder al estrés, lo cual se logra al disminuirse la capacidad de estimular la producción de glucocorticoides. Esto puede servir para proteger al hipocampo, de los efectos del estrés ya que sus neuronas son altamente sensibles a las concentraciones elevadas de glucocorticoides. Es posible que el mismo mecanismo sirva para proteger otras áreas (34,35,36).

2.2.3. Citocinas. Estas son proteínas solubles que transmiten señales de una célula emisora a otra receptora. Se ha reportado que algunas citocinas pueden activar el eje HHA e iniciar una respuesta de estrés. Como una consecuencia, se observa un incremento en la producción de los glucocorticoides que caracterizan la respuesta de estrés. Aunque la IL-1 ha sido considerada como la citocina que desempeña el papel más importante en la activación del eje HHA, ha sido evidente que otras citocinas como IL-6 y TNF- α ejercen acciones similares. Todas estas citocinas del sistema inmune estimulan las funciones de los sistemas nervioso y endocrino porque actúan a nivel del hipotálamo donde inducen la liberación del factor liberador de corticotropina (CRH), aunque también ha sido reportado a nivel de la glándula hipófisis y de la glándula adrenal. Cuando las citocinas son liberadas en el curso de una infección o de cualquier otra situación estimulante de los macrófagos del sistema inmune, pasan a la sangre y pueden llegar hasta el cerebro. En ese momento se observa que después de la estimulación del eje HHA se comienza a elevar la concentración de glucocorticoides de la sangre (37,38,39).

Varias áreas del cerebro, incluyendo el giro dentado, hipocampo, el plexus coroides y la corteza frontoparietal, tienen receptores para IL-1. Esta citocina generalmente es producida por las células presentadoras de antígenos (como los macrófagos y las células dendríticas, que se encuentran repartidas por todo el cuerpo), pero también la IL-1 puede ser producida en el sistema nervioso central por células de la glía (principalmente por astrocitos y microglía). Sin embargo, la

IL-1 y otras citocinas generalmente llegan al cerebro desde la sangre, utilizando regiones donde se ha comprobado que la barrera hematoencefálica es permeable. Se ha demostrado la presencia de receptores para la IL-1 y otras citocinas en los axones de neuronas hipotalámicas, las cuales están ramificadas extensamente hacia otras regiones del cerebro. Por esta razón la administración de citocinas en algunas enfermedades tales como cáncer y el SIDA o en casos de inmunodeficiencias pueden tener efectos neurotóxicos, o simplemente provocar algunos síntomas, por ejemplo anorexia o fiebre (29,40).

Cuando estas citocinas llegan al cerebro y se unen a sus receptores, son responsables de varios cambios en el metabolismo de corticosteroides y norepinefrina. Aunque la barrera hematoencefálica existe para excluir sustancias solubles en agua tales como péptidos circulantes y proteínas del cerebro, los resultados de algunos trastornos han demostrado que esta barrera no esta presente en el área preóptica del núcleo del hipotálamo. Esta situación puede explicar porque ciertas neuronas en el núcleo preóptico tienen receptores para IL-1, TNF- α e IL-6. Los resultados de varios trabajos sugieren que efectivamente esas citocinas pueden pasar de la circulación al cerebro (38,40).

También ha sido demostrado que, cuando se une a sus receptores en el cerebro, la IL-1 β incrementa la síntesis de monoaminas en el hipocampo, en el hipotálamo y en la corteza pre-frontal. En el hipocampo se encuentra una alta cantidad de receptores para IL-1 β y por lo tanto se ha reportado que esta citocina tiene varios efectos sobre esa área del cerebro. Se ha demostrado también que la IL-1 β inhibe la liberación de acetil colina y glutamato en el hipocampo (16,41,42,43).

La citocina IL-1 es uno de los mediadores clave inmunológico y patológico de la respuesta de estrés, cuando ocurren desafíos antigénicos intensos ó infecciones. La IL-1 tiene una potente acción neuroendocrina que incluye la

estimulación del eje HHA. Como ya se ha mencionado, el efecto de IL-1 está mediado a través de la unión a los receptores específicos de alta afinidad para la citocina (16,29,44).

2.3 INTERACCIONES NEURO-ENDOCRINO-INMUNOLÓGICAS

Desde hace años se conoce la existencia de las interacciones bidireccionales entre los sistemas inmune, nervioso y endocrino. Los tres sistemas comparten la capacidad para producir algunas citocinas similares y sus receptores específicos. Las citocinas son moléculas mensajeras que comunican las células de los tres sistemas. De modo que cuando uno de los tres sistemas (por ejemplo el sistema inmune) resulta sobre estimulado y aumenta la producción de algunas citocinas, sucede inmediatamente que esas moléculas no solo llevan mensajes a las otras células del sistema inmune, sino también a otras células del sistema nervioso y del sistema endocrino que comparten los receptores específicos para ellas. A continuación hablaremos de estas células y sus productos así como de sus receptores.

2.3.1 Prostaglandinas (PG). Estos son otros mediadores lipídicos que también participan en las interacciones entre los sistemas neuroendocrino e inmune. Las células neuronales o gliales en el SNC pueden sintetizar y liberar PG, de la misma manera que lo hacen los macrófagos del sistema inmune que se encuentran fuera del cerebro. En los últimos años se han publicado numerosos trabajos sobre la importancia funcional que tienen las PG en las reacciones inflamatorias y anti-inflamatorias, pero aún así ésta no ha sido completamente aclarada.

Se sabe que las prostaglandinas están involucradas en la modulación de la fiebre y otras funciones neuroendocrinas. Esto significa que las células del SNC tienen receptores para PG. Pero el estrés y otros traumas inducen cambios en su producción ya que por ejemplo las citocinas pueden inducir su síntesis. Ha sido

evidente que, bajo ciertas condiciones la producción de PG puede incrementarse y bajo otras se puede inhibir (45,46).

Una vez demostrado que el hipocampo tiene una gran cantidad de receptores para IL-1 y PG, esta región del cerebro ha sido el área más estudiada. Algunos estudios han tratado de aclarar como la IL-1 aumenta la producción de PG en el cerebro. (35,47,48).

2.3.2 Sustancia P (SP). La SP es un polipéptido neurotransmisor del sistema nervioso central que se encuentra en muchas áreas del cerebro así como en las innervaciones de los tejidos linfoides secundarios, tiene una amplia distribución en tejidos y es almacenada en las terminales nerviosas. Los receptores para SP se encuentran en las membranas de las células T y B, las células mononucleares fagocíticas y los mastocitos. Esta es liberada por las fibras nerviosas sensoriales y contribuye a la inducción de reacciones inflamatorias localizadas. A este respecto puede decirse que la SP tiene una actividad pro inflamatoria similar a algunas de las citocinas, como IL-1, IL-6, TNF α (49,50).

Varias evidencias muestran que la sustancia P puede mediar, al menos en parte, un aumento en los niveles de citocinas pro inflamatorias. En el caso del aumento en la IL-6, la mediación de la sustancia P ha quedado demostrada con el modelo de estrés en ratas, por inmersión en agua fría. Este tipo de estrés aumenta la producción de IL-6 por macrófagos peritoneales en respuesta al lipopolisacárido (LPS). Existen otras evidencias de la posible participación de la sustancia P en los efectos pro inflamatorios del estrés. Por ejemplo, se sabe que la innervación peptidérgica es necesaria para la inflamación local en la artritis reumatoide y la SP induce *in vitro* la producción de citocinas pro inflamatorias, prostaglandina E₂ (mediador de la respuesta de fase aguda) y tromboxano por macrófagos, así como la desgranulación de los basófilos. Estas evidencias hay que sumarlas a la participación de la SP en los mecanismos de la inflamación neurogénica (51).

2.3.3 Dehidroepiandrosterona (DEA). Este es un esteroide que se encuentra presente en pequeñas cantidades en la sangre de jóvenes adultos de ambos sexos. Una muy pequeña cantidad de la DEA producida se metaboliza hasta convertirse en testosterona. A pesar de ser una hormona sexual, la DEA es también un componente importante de la respuesta de estrés ya que su concentración es baja en muchos casos de depresión y/o angustia. Sus niveles disminuyen después de aplicar distintos estímulos estresantes y esto tiene importancia tanto desde un punto de vista gonadal como del SNC (52).

La DEA puede actuar directamente en receptores para el neurotransmisor inhibitorio GABA el cual se encuentra extensamente distribuido en el cerebro, siendo éste un posible mecanismo de su participación en enfermedades mentales, ya que la estimulación para el receptor de GABA disminuye la excitabilidad de las neuronas. En cambio la DEA ha resultado ser un buen estimulante de las funciones inmunes que decaen con el envejecimiento (53,54).

2.3.4 Serotonina. La serotonina es producida por las neuronas localizadas principalmente en el cerebro y también por plaquetas fuera del SNC, es un potente vasoconstrictor y estimulante de la contracción del músculo liso, esta se forma por hidroxilación y descarboxilación del aminoácido triptófano. El estrés también activa el sistema serotoninérgico ya que los niveles de serotonina y dopamina se elevan después de su inducción y aunque todavía no hay pistas concretas que indiquen exactamente el papel que desempeñan estos neurotransmisores como mediadores en las interacciones entre los sistemas inmune y neuroendocrino, se sabe que ellos pueden estimular la actividad del HHA. La serotonina también puede ser liberada por las células cebadas que se desgranulan durante los episodios alérgicos (25).

Las neuronas serotoninérgicas tienen un contacto sináptico con neuronas que contienen el factor liberador de corticotropina (CRH) y que están localizadas en el núcleo paraventricular del hipocampo. De esta manera, el sistema

serotoninérgico puede modular la liberación de CRH y participa en la modulación del eje HHA en respuesta al estrés (25).

2.3.5 Opioides. Los opioides (β -endorfina, encefalina y dinorfina) son un gran grupo de péptidos que tienen efectos analgésicos y que han sido aislados del cerebro y la glándula pituitaria. Los opioides pueden modificar la liberación de citocinas pro-inflamatorias, ya que disminuyen la producción de INF- γ , IL-2, IL-4 y afectan la producción de anticuerpos y la actividad de las células NK (25,52).

2.3.6. Neuropéptidos. Estas sustancias son muy importantes para las funciones del SNC. Las neuronas utilizan dos tipos de sustancias químicas para la comunicación interneuronal. Los primeros son las aminas y los segundos son los neuropéptidos; de ellos el más importante es el Neuropéptido Y. La producción de éste puede estar modificada por el estrés y además, esos cambios también pueden influir sobre los linfocitos del sistema inmune, ya que ellos poseen receptores para este neuropéptido, además de los macrófagos y las células dendríticas (55).

El área límbica del cerebro es particularmente importante en el humor, las emociones y las motivaciones. Esta región del SNC es muy rica en la producción de neuropéptidos, cuya síntesis aumenta después de aplicar un factor estresante. Esos factores estresantes aumentan la producción del CRH (16).

2.3.7. Vasopresina. La vasopresina es una hormona peptídica presente en la sangre, pero el cerebro la usa como neurotransmisor, principalmente en el sistema límbico. La vasopresina trabaja sinérgicamente con el CRH de la pituitaria y por lo tanto, también su producción y sus efectos pueden estar alterados en el curso de una respuesta de estrés (34,52).

2.3.8. La Hormona del crecimiento y la prolactina. Son hormonas polipeptídicas que son producidas por la hipófisis, estas hormonas tienen un efecto estimulante sobre la respuesta del sistema inmune. Diversos trabajos publicados han mostrado que ese efecto es posible desde el momento en que los linfocitos y los macrófagos tienen receptores de membrana para esas hormonas. En el curso de una respuesta aguda de estrés, esas dos hormonas aumentan su concentración en la sangre y pueden estimular varias actividades de los linfocitos T y de los macrófagos. Como estas células son importantes en la defensa contra las infecciones, su producción aumentada se traduce en una mayor resistencia contra la invasión de algunos microorganismos y este sería un efecto benéfico del estrés de corta duración.

Pero los estudios realizados sobre estas hormonas también han mostrado que si la estimulación estresante se vuelve recurrente o se prolonga y la estimulación del eje HHA se hace crónica, entonces disminuye la producción de la hormona del crecimiento y de la prolactina y, se observa una disminución de sus respectivas concentraciones en la sangre, con la consiguiente pérdida de sus efectos inmunoestimulantes (24,56).

2.3.9. Catecolaminas. Catecolaminas tales como dopamina, norepinefrina y epinefrina son sintetizadas a partir de la tirosina y actúan como neurotransmisores en el sistema nervioso central y en la periferia. La norepinefrina juega además un papel muy importante en el aprendizaje y la memoria. Las catecolaminas son importantes mediadores de la respuesta de estrés, de ahí que tanto el aprendizaje, como la memoria pueden resultar alterados en dichas circunstancias. Los linfocitos y los macrófagos también tienen receptores para las catecolaminas y sus funciones se modifican cada vez que aumenta la liberación a la sangre de esos neurotransmisores. A través de las catecolaminas, el estrés influye tanto en el SNC como en el sistema inmune (46,57).

2.3.10. Otras Citocinas. Durante el estrés la combinación de un aumento en la producción de glucocorticoides y catecolaminas resulta en la supresión de la síntesis de la IL-2 (necesaria para la estimulación de los linfocitos Th1) y en un aumento de la producción de IL-10 (inhibidor de Th1). Esta situación convierte a las personas estresadas de una manera crónica en individuos que tienen desviada su respuesta de Th1 a Th2, lo cual los convierte en sujetos vulnerables a ciertas enfermedades bacterianas y les debilita la defensa contra ciertos tumores (1,58).

2.4 TRATAMIENTO DEL ESTRÉS

El tratamiento farmacológico actual para trastornos de la ansiedad, consiste ante todo en agentes sedantes y ansiolíticos del grupo de las benzodiazepinas. A diferencia de muchos psicotrópicos, las acciones clínicas de las benzodiazepinas, se conocen mejor como reflejo de sus velocidades tempranas de absorción y su cinética de distribución. Las benzodiazepinas potentes, son eficaces en trastornos de pánico, lo mismo que en el trastorno generalizado de ansiedad.

Entre las desventajas de las benzodiazepinas se incluyen tendencia al desarrollo de dependencia psicológica, formación de metabolitos activos, efectos amnésicos y su costo mayor. Las benzodiazepinas ejercen un efecto de depresión aditiva sobre el sistema nervioso central cuando se administran con otros fármacos, incluyendo el etanol. Este es el caso de todos los fármacos de la clase sedante-hipnótica (59,60,61).

2.5. LAS BENZODIAZEPINAS (BZP)

2.5.1 Historia. Desde la antigüedad se han empleado bebidas alcohólicas pociones y hierbas para inducir el sueño. El barbital apareció en 1903 y el fenobarbital en 1912. Para 1960 se lanzaron al mercado cerca de una docena de otros sedantes hipnóticos. La separación parcial de las propiedades sedantes,

hipnóticas y anestésicas y las propiedades anticonvulsivas que caracterizaban al fenobarbital motivó la búsqueda de agentes que actuaran más selectivamente sobre las funciones del sistema nervioso central (SNC). En consecuencia, a finales del decenio de 1930 y a principios de 1940 aparecieron en el comercio anticonvulsivos relativamente no sedantes, en particular la fenilhidantoína y la trimetadona.

En 1957 Sternbach sintetizó el clordiazepóxido y Randall dio a conocer su peculiar patrón de acciones. Pocos años más tarde, en 1961, la introducción del clordiazepóxido en la medicina clínica inició la era de las benzodiazepinas. La mayor parte de las benzodiazepinas que llegaron al mercado se seleccionaron por su potencia ansiolítica alta, en relación con su función depresora del SNC. Sin embargo, todas poseen propiedades sedantes hipnóticas en grados variables, y estas propiedades se aprovechan con amplitud en la clínica, sobre todo para promover el sueño. Debido principalmente a su baja capacidad de causar depresión mortal del SNC, las benzodiazepinas han desplazado a los barbitúricos como sedantes hipnóticos (61).

Las benzodiazepinas tienen solo una capacidad limitada para producir depresión profunda y potencialmente mortal del SNC. Aunque pueden causar coma en dosis muy altas, no tienen capacidad para inducir un estado de anestesia quirúrgica por sí mismas y, de hecho, son incapaces de causar depresión respiratoria letal o colapso cardiovascular, a menos que se encuentren presentes también otros agentes depresores del SNC.

En general las benzodiazepinas, se usan para producir sedación y amnesia antes de los procedimientos quirúrgicos u operatorios o durante ellos, además se utilizan como antiepilépticos, ansiolíticos y hasta como relajantes musculares y antieméticos (62,63).

2.5.2. El Diazepam. El diazepam es una molécula que se usa principalmente como preanestésico, anticonvulsivo, ansiolítico, antiepiléptico y también como relajante muscular.

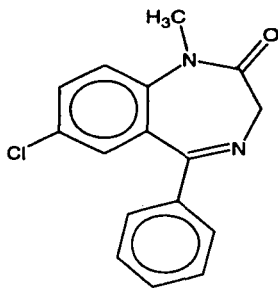


Fig (2). Estructura del diazepam. Donde se muestra el anillo de benceno fusionado con un anillo de diazepina de 7 miembros y su nombre químico es: 7-cloro-1,3,dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona. (60,62,64)

El diazepam ha sido usado mucho como preanestésico en dosis de 5 a 10 mg, generalmente administrado por vía oral. Su absorción es poco digna de confianza después de la administración parenteral; más aún, el solvente empleado en los preparados parenterales produce dolor y flebitis. Este fármaco tiene poco efecto sobre la respiración en las dosis ordinarias, y no potencia la depresión respiratoria que producen los opioides. En los adultos se pueden administrar dosis entre 5-10 mg tres o cuatro veces al día. En animales de laboratorio se administran dosis sedantes entre 1-10 mg/Kg peso (62,65,66).

2.5.3. Farmacocinética. El diazepam, como las demás benzodiazepinas es un fármaco débilmente básico que se absorbe mejor a un pH alcalino como el del duodeno. El diazepam se absorbe con rapidez y llega a concentraciones máximas en sangre, en 1 hora en el adulto, y hasta en 15-30 min en niños.

La mayor parte de las benzodiazepinas se fijan en gran proporción (85-95%) a las proteínas plasmáticas. El metabolismo hepático es el encargado de la depuración o eliminación de todas las benzodiazepinas; estas se excretan casi por completo por la orina en forma de metabolitos oxidados y conjugados con el ácido glucurónico (61,62).

2.5.4 Farmacodinamia. Los principales efectos del dizepám se observan a nivel del SNC. Normalmente, en éste se producen sustancias que estimulan o que inhiben la actividad de las neuronas. El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC. Estudios electrofisiológicos han demostrado que las benzodiazepinas potencian la neurotransmisión GABAérgica, a todos los niveles del neuroeje, incluyendo médula espinal, hipotálamo, hipocampo, sustancia negra, corteza cerebelosa y corteza cerebral. Las benzodiazepinas no sustituyen al GABA pero, al parecer, aumentan sus efectos sin activación directa de receptores de GABA o los conductos de cloro asociados. El aumento en la conducción de iones cloruro inducida por la interacción de las benzodiazepinas con GABA se traduce como un incremento en la frecuencia de eventos de apertura de conductos (60,61,67,).

La vida media ($t_{1/2}$) del diazepam en plasma es de 1-2 días mientras que la del N-desmetildiazepam es de casi 60 h. En el neonato prematuro y el anciano, la vida media del diazepam puede ser 3 ó 4 veces mas prolongada que en los adultos jóvenes, los niños o incluso los neonatos a término y patologías como la hepatopatía grave puede incrementar la vida media del diazepam de 2 a 5 veces mas de lo normal (60,61).

2.5.5 Efectos Adversos. Después de la administración intravenosa de diazepam puede ocurrir depresión cardiovascular y respiratoria, en particular si se han administrado otros anticonvulsivos con anterioridad. Los otros efectos adversos del diazepam se presentan cuando se deja de administrar después de haberlo tomado por cierto tiempo (68).

Los síntomas de supresión pueden consistir en intensificación temporal de los problemas que motivaron originalmente su empleo, p.ej. insomnio o ansiedad. También puede ocurrir distrofia, irritabilidad, sudoración, sueños desagradables,

temblores, anorexia y desmayos o mareos. De ahí que sea prudente disminuir el régimen de dosificación de manera gradual cuando se va a interrumpir el tratamiento.

A pesar de los efectos adversos las benzodiazepinas son fármacos relativamente seguros. Incluso a dosis grandes son rara vez mortales, a menos que se tomen junto con otras sustancias. El etanol contribuye en forma frecuente a las defunciones en que participan las benzodiazepinas (69).

2.5.6 Dependencia Física. Si se administran benzodiazepinas durante periodos prolongados, y a continuación se interrumpen de manera repentina, pueden sobrevenir síntomas graves de abstinencia como son: ansiedad, agitación, incremento de la sensibilidad a la luz y el ruido, parestesias, sensaciones extrañas, calambres, sacudidas mioclónicas, trastornos del sueño, mareos y, después de dosis muy altas, convulsiones y delirio como consecuencia de su larga vida media y la conversión de metabolitos activos durante la acción de larga duración (69).

2.5.7 El Receptor Gaba-Bzp. El receptor para GABA es una glucoproteína heterooligomérica de 200 a 400 KDa y es el principal receptor neurotransmisor inhibitorio en el SNC del mamífero. Es un canal de Cl^- de compuerta de ligando que se abre después de la descarga de GABA, a partir de las neuronas presinápticas.

El receptor GABA consiste en un pentámero de subunidades homólogas. Hay 14 subunidades diferentes, que se clasifican según la semejanza de su secuencia de aminoácidos, en cuatro familias de subunidades. Se han identificado seis variantes α , tres β , tres variantes γ y dos δ . No ha podido investigarse la estructura subunitaria precisa de los receptores GABA nativos (59,60,70).

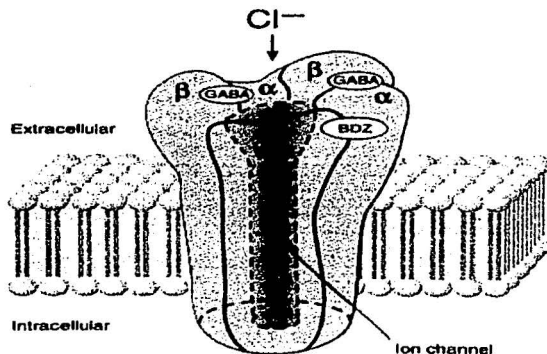


Fig (3). Receptor de GABA donde se muestran sus cinco subunidades y el conducto de cloro (59).

3 OBJETIVO

- Conocer la eficiencia del tratamiento anti-estresante con diazepam para mejorar la inmunidad comprometida.

4 HIPÓTESIS

- **El hacinamiento de los ratones durante cuatro semanas debe provocar un estrés que afecta la respuesta proliferativa de los linfocitos del sistema inmune.**
- **Un tratamiento con diazepam mejorará la respuesta inmunológica de los ratones estresados por hacinamiento.**

5 MATERIAL, MÉTODOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1. ANIMALES

Se emplearon 66 ratones macho proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Química, cepa CFW de 4 semanas de edad y peso de 20 a 25g.

5.2. INDUCCIÓN DEL ESTRÉS

El estrés fue inducido de acuerdo al modelo del hacinamiento "overcrowding" en base a otros trabajos (71) que consiste en hacer convivir durante cierto tiempo un número elevado de animales en un espacio reducido. Este modelo de estrés se conoce como "estrés social" y puede ser aplicado durante intervalos de tiempo variables, al mismo tiempo que también pueden ser variables las dimensiones de la jaula y el número de los animales. Naturalmente, el grado de estrés será mayor en la medida que aumenten el número de animales o el tiempo de permanencia en la jaula, así como en la medida que disminuyan las dimensiones de ésta. Pero, en líneas generales, se acepta que un estrés moderado se puede inducir cada vez que se aumenta aproximadamente al doble el número de ratones colocados en una jaula, ya que esto hace difícil la convivencia y el mantenimiento de los límites de la territorialidad para cada uno de ellos.

En este trabajo se utilizaron cajas de policarbonato sencillas (28X17X12cm) construidas para 6 animales. En el caso de los animales estresados se colocaron

12 ratones por caja, conservando 6 ratones/caja como grupos control y los animales tuvieron siempre libre acceso a alimento y agua.

Este modelo, con las características señaladas, nos pareció una manera sencilla y natural de generar una respuesta de estrés, respetando los lineamientos internacionales sobre el cuidado de los animales y evitando cualquier tratamiento cruel de los mismos. Además, el modelo simula situaciones que se pueden presentar en las comunidades humanas con relativa frecuencia.

5.3. CONTROL DE PESO

La pérdida de peso es el parámetro más fácil de medir en los seres vivos colocados en condiciones experimentales, aunque otros prefieren contar el número de ulceraciones en el estómago o los niveles de cortisol en la sangre o la saliva. Por ello, para evaluar si los ratones de este experimento se estaban estresando, de acuerdo al modelo de hacinamiento, se llevó un registro de los pesos de los animales, cada tercer día, durante todo el experimento (un mes).

5.4. TRATAMIENTO CON DIAZEPAM

Para evaluar el efecto del diazepam sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos de los ratones, 36 de ellos, 18 del grupo I (estresado) y 18 del grupo II (no estresado) fueron inyectados IP con una solución de diazepam, cada tercer día, durante un mes.

La dosis de diazepam utilizada fue seleccionada por su efecto sedante. Sin embargo, se decidió tener animales separados en tres grupos y que recibían tres dosis sedantes diferentes, todas ellas seleccionadas de acuerdo con Crawley et al (72), quienes han utilizado dosis de la benzodiazepina desde 25 mg/Kg hasta 0.5 Kg/ml para obtener este efecto en los ratones. Por otra parte, las dosis empleadas

fueron seleccionadas después de haber realizado pruebas preliminares en ratones que recibieron diferentes diluciones de la BDZ, comenzando en 25 mg/Kg y terminando en 0.625 mg/Kg y que fueron colocados bajo observación durante la siguiente hora para corroborar el efecto sedante de las cantidades administradas.

Una vez seleccionadas las tres dosis, hubo necesidad de subdividir a cada grupo de ratones en 5 subgrupos, según la dosis recibida : el subgrupo a) recibió una dosis de 5.0 mg/Kg/ratón (Da), al subgrupo b) 2.5 mg/kg/ratón (Dm) y al subgrupo c) le correspondió una dosis de 1.25 mg/kg/ratón (Db), mientras un cuarto subgrupo control (d) no recibía ningún tratamiento y los ratones de un grupo (e) eran inyectados con solución salina isotónica. Esta subdivisión de los grupos según la dosis del fármaco administrada se empleó tanto para los animales estresados como para los no estresados. Al final se tuvieron 10 subgrupos de animales, cinco de ellos estresados por hacinamiento y los otros cinco no estresados.

5.5. PRUEBA DEL MTT (Bromuro de 3 (4,5-dimetiltiazolil-2-il)- 2,5 difeniltetrazolio)

Es una prueba que fue diseñada por Mossman (73) para medir la actividad mitocondrial de células que se multiplican activamente. El ensayo ha sido utilizado en numerosos estudios, tales como viabilidad celular, citotoxicidad, viabilidad de parásitos, resistencia o sensibilidad de células cancerosas a ciertos fármacos (74,75,76). En Inmunología, la misma prueba del MTT suele utilizarse, como una prueba paralela a la incorporación de la timidita tritiada, para medir los índices de proliferación de los linfocitos estimulados *in vitro* con algunos mitógenos.

Este ensayo está basado en el rompimiento del anillo de la sal de tetrazolium (MTT), por la actividad mitocondrial de células viables, formando un compuesto de color amarillo denominado formazán que, al solubilizarse, da un color púrpura que es cuantificado espectrofotométricamente a 630nm como una medida proporcional al número de células vivas presentes.

Este método presenta numerosas ventajas frente a otras metodologías como la rapidez de la reacción, ya que una gran cantidad de muestras pueden ser procesadas en corto tiempo y con un alto grado de precisión, utilizando un lector de placas de ELISA; además se evitan los lavados intermedios empleados en otras técnicas (73,77,78,79,80), también se evita el uso de isótopos radiactivos. El método es cualitativo ya que se presenta un cambio de coloración y además es cuantitativo por la diferencia en los picos de absorbancia entre el sustrato inicial y el producto final, que es una medida proporcional al número de células viables capaces de reducir el MTT.

Por estas razones se ha propuesto que la reducción del MTT resulta un método sencillo, rápido, preciso y confiable que ofrece una gran cantidad de aplicaciones en el laboratorio clínico y de investigación.

5.6. ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DEL MTT.

Antes de comenzar a utilizar la prueba del MTT fue necesario estandarizar las condiciones en las que se iba a desarrollar, para encontrar las que fueran óptimas, así como los tiempos de incubación y de lisis idóneos para los experimentos. Es decir, se trató de tener las condiciones que permitieran apreciar mejor las diferencias que existían entre la reducción del MTT por las células linfoides estimuladas y las no estimuladas por un mitógeno, así como para tener una viabilidad de los linfocitos mayor al 90%.

También se hicieron las pruebas necesarias para disminuir al máximo posible el tiempo invertido en sacrificar a los animales y separar las células, ya que el factor tiempo influye de una manera significativa sobre la viabilidad de las células. Igualmente se estandarizó el procedimiento para producir la lisis de los eritrocitos, con soluciones hemolizantes a diferentes concentraciones y tiempos de

tratamiento, ya que se pudo observar como pequeñas variaciones en el tiempo de lisis así como en la concentración de la solución hemolizante, al igual que su pH, alteraba considerablemente la viabilidad de los linfocitos y la cantidad de glóbulos rojos contaminantes presentes en la cuenta de las células.

5.7. PORCENTAJE DE VIABILIDAD

El porcentaje de viabilidad se obtiene tomando en cuenta que las células muertas son las que se tiñen, ya que se utilizó un colorante vital, como lo es el azul tripano, así se lleva acabo la cuenta de células vivas y muertas y después se saca el porcentaje de viabilidad de la siguiente manera (81) :

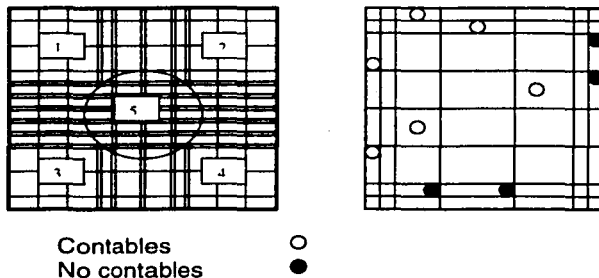
$$\text{Viabilidad} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ Total de células}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células vivas}} \times 100$$

5.8. OBTENCIÓN DE LINFOCITOS DEL BAZO.

Al término de las 4 semanas de inducción del estrés y de las inyecciones con diazepam, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente se sumergieron durante unos segundos en una solución de etanol al 70%. Posteriormente, los ratones fueron trasladados a la campana de flujo laminar (área estéril previamente sanitizada), donde se procedió a cortar la piel del abdomen, se abrió el peritoneo y se extrajo el bazo. Este órgano linfoide se perfundió con 5 ml de solución de Hanks enfriada en hielo, recolectando las células en una caja Petri estéril con 5 ml adicionales de la misma solución, y pasándolas luego a un tubo de 15 ml estéril, donde se les agregó 1 ml de solución hemolizante durante 3 minutos 2 veces y se lavaron cada vez con 5 ml de solución de Hanks para eliminar la solución hemolizante.

5.9. AJUSTE DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR

Las células obtenidas del bazo en el procedimiento anterior se resuspendieron en 1ml de medio RPMI 1640 suplementado y una alícuota de 20 μ l de ellas se mezcló con un volumen igual del colorante azul tripano, en un vial de 1.5 ml, de esta mezcla se transfirieron 20 μ l cuidadosamente a la cámara de Neubauer para contabilizar el número de células vivas, bajo un microscopio invertido, usando el objetivo 40x. Las células a contar son las que se encuentran en los 5 cuadrantes (correspondientes a los linfocitos) mostrados en la siguiente ilustración sin contar las que se encuentren sobre los bordes inferior y derecho. (82)



El número de células viables /ml se determina de acuerdo a la siguiente ecuación :

$$\# \text{ células viables/ml} = \frac{\text{número de linfocitos contados}}{\text{número de cuadros de doble cuadrícula}} \times 25 \times 10^4 \times \text{dilución}$$

Una vez conocida la cantidad de células que existen en la suspensión de células inicial, éstas se ajustan a 3×10^6 células/ml, agregándoles el volumen necesario de medio RPMI suplementado y manteniéndolas en baño de hielo, antes de sembrarlas en las placas de microcultivo.

5.10 LINFOPROLIFERACIÓN Y REDUCCIÓN DEL MTT.

Una alícuota de 100 μ l de las células del bazo provenientes de cada ratón, conteniendo 3×10^5 células, se sembró por sextuplicado en una placa de microcultivo estéril de 96 pozos. Inmediatamente, a tres de los 6 pozos conteniendo las células anteriores se les añadió 20 μ l de una concentración de 5 μ g/ml del mitógeno Con-A y se introdujeron en una incubadora, a 37°C con 5% de CO₂, dejándose ahí por 48 horas. Al finalizar el periodo de incubación necesario para la proliferación, las células recibieron en condiciones estériles 20 μ l de una solución de MTT estéril (5mg/ml) para evaluar la proliferación de los linfocitos en el cultivo, mediante la reducción de este colorante. Luego, las placas de microcultivo conteniendo las células se regresaron a la incubadora, en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, donde estuvieron por 4 horas más, tiempo suficiente para la actividad mitocondrial.

Los cristales del formazán producidos durante la reducción del MTT por los linfocitos en proliferación se disolvieron con 100 μ l de la solución de lisis, dejándose en las mismas condiciones de incubación toda la noche. Al día siguiente se cuantificó la absorbancia del MTT a 630nm, utilizando un lector de placas para ELISA. Los valores de la absorbancia obtenidos se emplearon para calcular la respuesta linfoproliferativa de cada ratón.

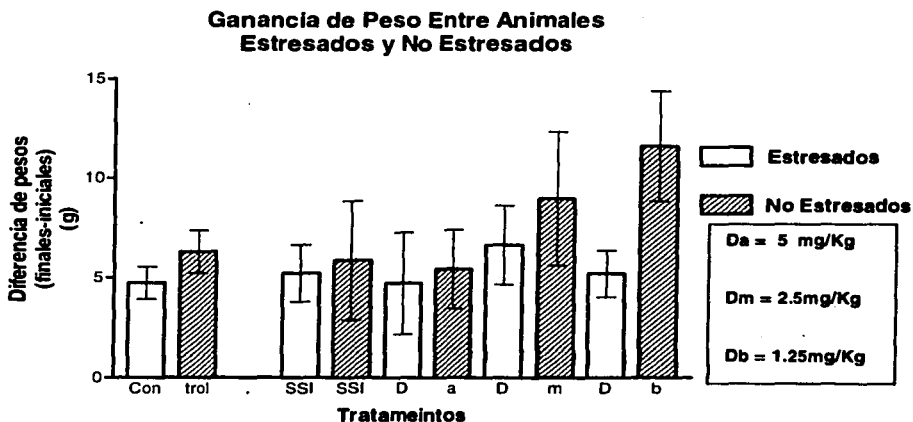
5.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para analizar si existieron diferencias significativas en la respuesta proliferativa de los linfocitos provenientes de los animales del experimento que fueron estresados o no y que además recibieron el tratamiento con diazepam, con respecto a sus controles y vehículo, se utilizó el programa de computo estadístico SPSS para Windows versión 9.0.

6 RESULTADOS

6.1 EFECTO DEL HACINAMIENTO EN EL PESO DE LOS ANIMALES.

El modelo de estrés utilizado provocó que, durante las 4 semanas del experimento, los animales expuestos a una situación de hacinamiento ganaran menos peso corporal que los animales que no estaban estresados como lo muestra la Graf (1). El peso corporal de los animales estresados al final del experimento fue inferior al de los no hacinados. Al comparar la ganancia de peso de los animales no hacinados con la de los animales estresados, se pueden observar diferencias de peso muy discretas entre los promedios que carecen de importancia para poder determinar el grado de estrés en los ratones a excepción del grupo de Db donde si se observa una diferencia importante. Por lo que podemos decir que el modelo utilizado no estresó de una manera significativa a los ratones como para poderse apreciar en los valores de linfoproliferación.



Graf. 1. Diferencias en la ganancia de peso corporal (gramos) de los animales no estresados y estresados después de cuatro semanas de experimento. La ganancia de peso se calculó restando el promedio del peso final al promedio del peso inicial.

6.1.1. Efecto del tratamiento con diazepam. En los animales no estresados y en los estresados que recibieron diazepam como tratamiento se pudo observar que la administración del fármaco influyó en el progreso de peso, pero no tanto en los animales estresados como en los no estresados. La administración de diazepam en estos últimos conllevó a un aumento de casi el doble (11.6 g en el caso del diazepam bajo) del peso corporal en relación al aumento observado en los estresados y respecto al Dm también hay una diferencia considerable aunque no es significativa. Por esa razón, las diferencias (peso final menos peso inicial) resultaron ser cantidades mayores a las de los estresados en el caso de los animales que fueron tratados con dosis bajas y medias de diazepam, como se puede observar en la Tabla I. En cambio, los animales estresados no mostraron cambios significativos en su progreso de peso, independientemente de la dosis de diazepam recibida, excepto por una ligera tendencia no significativa al elevar la ganancia de peso cuando recibían las dosis medias y bajas de diazepam.

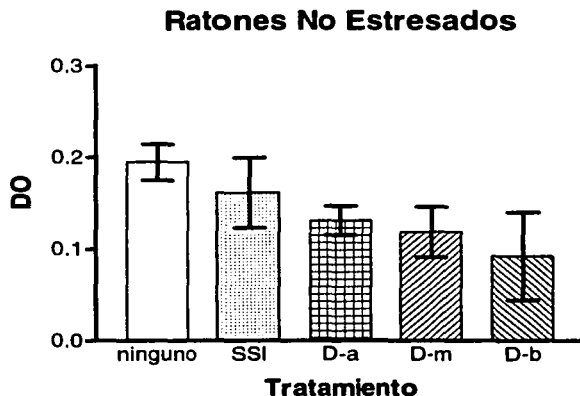
Ratones	Tratamiento	N	Diferencia de Peso (final-inicial)
	Ninguno	5	4.7
	SSI	5	5.2
Estresados	Dzp-a	5	4.7
	Dzp-m	5	6.6
	Dzp-b	5	5.2
	Ninguno	5	6.3
	SSI	5	5.9
	Dzp-a	5	5.4
No Estresados	Dzp-m	5	8.9
	Dzp-b	5	11.6

Tabla I. Diferencias entre los pesos corporales de los ratones (al inicio y al final de los experimentos, cuatro semanas más tarde), según estuvieran o no estresados y, además, según recibieran o no tres dosis diferentes de diazepam o una inyección de solución salina isotónica.

6.2 LINFOPROLIFERACIÓN.

Los resultados de la reducción del MTT, como una medida de la linfoproliferación de los linfocitos esplénicos de los ratones, estresados y no estresados, mostraron diferencias que fueron congruentes con las anteriores de peso demostrando la ausencia de un estrés considerable.

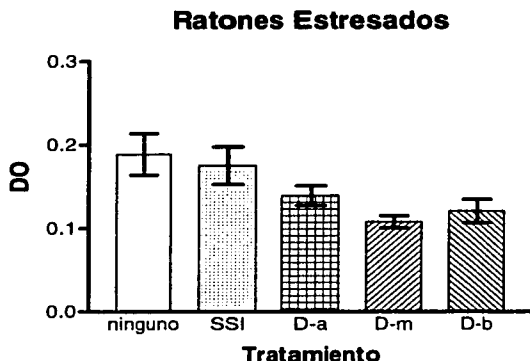
6.2.1. Efecto del hacinamiento sobre la reducción del MTT. Los animales que estuvieron 4 semanas en hacinamiento no mostraron diferencias con respecto a los animales no estresados, al momento de estudiar la respuesta linfoproliferativa de sus linfocitos como lo demuestran los gráficos 2,3 y 4.



Graf. 2. Valores promedio, expresados como barras \pm 1 desviación estándar, de las absorbancias obtenidas a 630 nm de los cultivos de linfocitos esplénicos obtenidos de ratones no estresados. Las células fueron estimuladas *in vitro* con Concanavalina-A en presencia de MTT y la lectura de la absorbancia se realizó en un lector de placas para ELISA. Los valores corresponden a los cinco grupos experimentales de animales que fueron utilizados.

* Para ver las Pruebas Estadísticas refiérase al Anexo I

6.2.2. Efecto del diazepam sobre la linfoproliferación. La Graf (2) muestra que el tratamiento con diazepam disminuyó la respuesta proliferativa de los linfocitos. Los animales que, sin estar estresados, recibieron las dosis más bajas de diazepam mostraron el mayor grado de reducción ya que tuvieron las lecturas de DO más bajas. La dosis mas alta de diazepam dio un valor superior que no fue estadísticamente diferente al de las otras dosis de diazepam mas baja pero si diferente con respecto a los controles.



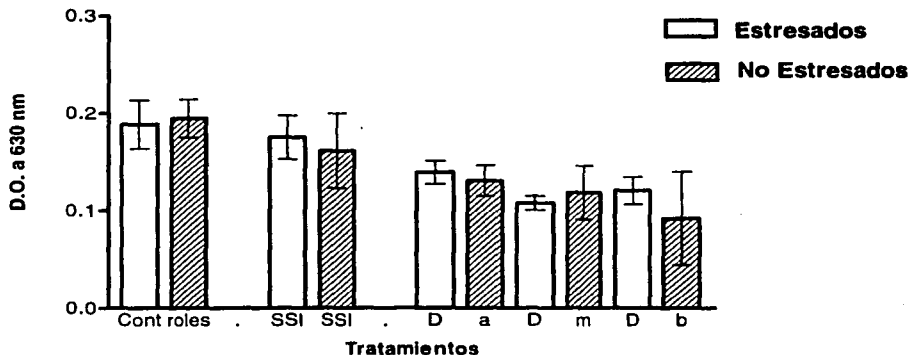
Graf. 3. Valores promedio, expresados como barras \pm 1 desviación estándar, de las absorbancias obtenidas a 630 nm con los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos esplénicos obtenidos de ratones estresados. En estos animales, las células también fueron estimuladas *in vitro* con Concanavalina-A en presencia de MTT y la lectura de la absorbancia se realizó en un lector de ELISA. Los valores corresponden a los cinco grupos experimentales de animales que fueron utilizados.

* Para ver las Pruebas Estadísticas refiérase al Anexo I

En el caso de los animales estresados, como se puede observar en la Graf. 3, el tratamiento con diazepam también disminuyó la respuesta proliferativa de los linfocitos esplénicos al disminuir la capacidad de estas células para reducir el MTT: Las diferencias fueron significativas respecto al control y a la SSI y no entre las diferentes dosis de diazepam. No hubo diferencias entre la reducción del MTT de los ratones sin tratamiento de los dos grupos de animales (estresados y no estresados).

Por último se presenta una gráfica comparativa de los grupos estresados y no estresados que permite apreciar las diferentes respuestas linfoproliferativas que tienen los ratones estresados y los no estresados después del tratamiento con diazepam donde se observa que no existen diferencias significativas.

**Comparación Entre E y NE
Efecto del Tratamiento en la Linfoproliferación**



Graf. 4. Valores promedio + 1D.S. de los valores de absorbancia del sobrenadante de los cultivos de linfocitos de ratones estresados y no-estresados, estando las células estimuladas in vitro con la Con-A y en presencia de MTT.

* Para ver las Pruebas Estadísticas refírase al Anexo I

7 DISCUSIÓN

Una parte de los resultados obtenidos coincide con otros que ya han sido reportados en la literatura consultada. Sin embargo, otros resultados ofrecieron información novedosa que no se esperaba obtener al momento de iniciar estos experimentos.

Comparando el grado de disminución en la ganancia de peso y la Inmunidad de los animales estresados por hacinamiento, con el obtenido al aplicar otros modelos de estrés se puede concluir que, en nuestro experimento, el hacinamiento no fue un factor estresante suficiente que provocara una pérdida de peso exagerada ni la disminución notable de la respuesta proliferativa de los linfocitos T. Otro factor que es necesario mencionar es la edad de los animales. En otros trabajos realizados previamente en el mismo laboratorio, con modelos de estrés aplicados a ratones recién nacidos que estaban en plena etapa de crecimiento, se obtuvieron reducciones drásticas en el peso de los animales con un grado mucho más avanzado de compromiso inmunológico. En los experimentos del presente trabajo los ratones eran adultos jóvenes que tenían un progreso de peso diario sumamente pequeño.

En algunos trabajos que utilizan el modelo de estrés por hacinamiento se ha encontrado que aumenta la susceptibilidad a infecciones y el desarrollo de tumores, los diferentes grados de compromiso inmunológico que se pueden provocar experimentalmente aún utilizando el mismo modelo ya han sido estudiados (71). Todo esto depende de la edad de los ratones, el número de animales por caja, las dimensiones de la misma y el tiempo que permanecen hacinados. Cada una de estas variables puede introducir diferencias en los

resultados. Sin embargo, conviene aclarar que, para nosotros el modelo de estrés no fue elegido para medir los efectos sobre la inmunidad, sino más bien para tener animales con la inmunidad comprometida en los cuales se pudiera administrar un tratamiento anti-estresante, que teóricamente les iba a mejorar la inmunidad pero que al mismo tiempo podía tener un efecto negativo sobre esta. Considerando que es ésta precisamente la situación en la que se encuentran la mayoría de las personas que consumen el diazepam, nos pareció adecuado que el presente modelo fuera seleccionado para estudiar la inmunidad. (71)

En el diseño experimental seleccionado se propuso conocer el efecto del diazepam sobre la proliferación de linfocitos esplénicos de ratones estresados por hacinamiento (12 animales por caja). La hipótesis proponía que en la medida que el diazepam redujera el estado de estrés, iba a disminuir el exceso en la producción de catecolaminas y glucocorticoides y se iba a reducir el compromiso inmunológico. Se supuso que siendo el diazepam un fármaco utilizado ampliamente para reducir la ansiedad de las personas estresadas, no debía tener un efecto negativo sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos.

Es conveniente tener en cuenta que no todas las cepas de ratones tienen el mismo grado de alteración del sistema inmune cuando se colocan hacinados en una caja. Por otra parte también influye el número de animales por caja y las dimensiones de la misma. Además, es necesario recordar que la respuesta proliferativa de los linfocitos es solamente una de las múltiples respuestas del sistema inmune que pueden ser evaluadas y que un animal estresado puede tener comprometida una respuesta (producción de anticuerpos por ejemplo) sin haber cambiado su capacidad para sintetizar algunas interleucinas o la expresión de receptores sobre la membrana de los linfocitos.

Para el presente trabajo se decidió seleccionar solamente animales machos porque existen trabajos en la literatura consultada que estudian el efecto del sexo sobre el estrés y muestran que solamente los machos hacinados aumentan lo

suficiente sus niveles de glucocorticoides. Sin embargo, en otros trabajo se ha observado que, según la cepa utilizada, los ratones de los dos sexos pueden estresarse al mismo grado mediante el procedimiento del hacinamiento. Esto sugiere que las hormonas sexuales en algunas cepas de animales influyen en las alteraciones del sistema inmune.

Esas diferentes respuestas al estrés y la edad que tenían los animales en el momento de iniciar el experimento pueden explicar el que no se observara una pérdida de peso como tal (como un indicador de estrés), sino que se haya observado un retraso en su progresión de peso. Algunos autores han observado que, en ratas, el grado de estrés por hacinamiento puede provocar respuestas de estrés tan intensas que, cuando se mantiene por un par de meses, induce una pérdida de peso significativa y provoca la formación de autoanticuerpos contra antígenos del sistema nervioso central (83).

En cuanto a los efectos del diazepam, la revisión de la literatura mostró que se han publicado algunos trabajos que mencionan el efecto de ésta y otras benzodiazepinas sobre la inmunidad. Los principales efectos que se han estudiado han sido sobre los fagocitos, ya que el diazepam disminuye significativamente la fagocitosis y el número de los macrófagos y monocitos. Sin embargo, también existe literatura que señala otros efectos no menos perjudiciales tales como la disminución de la linfoproliferación frente a mitógenos no-específicos como PHA y Con A, el aumento en la concentración plasmática de cortisol, la reducción de la cantidad de células formadoras de placas (PFC), es decir productoras de anticuerpos, la mayor susceptibilidad a infecciones por *Mycobacterium bovis* en el caso de hamsters y, también, la disminución de la densidad de receptores para benzodiazepinas periféricas (PBR) (65,84,85,86,87,88,89,90).

Los estudios experimentales sobre los efectos directos del diazepam en animales y células humanas reportan un aumento en la susceptibilidad a infecciones en ratones retados con *Salmonella typhimurium*, una supresión de la actividad de las células NK, una disminución de la síntesis de anticuerpos y la linfoproliferación y una inhibición completa de las funciones ejercidas por los PMN y monocitos (89,91,92,93,94,95,96,97,98,99,).

No obstante, se pueden encontrar trabajos que mencionan que el diazepam tiene un efecto estimulante sobre la respuesta inmune, ya que los resultados muestran como la administración de la benzodiacepina estimula la migración fuera de los vasos sanguíneos y la fagocitosis, a través de la activación de los PBR, así como supresión de la actividad inmunosupresora de la liberación de CFR (100,101,102,).

En nuestros experimentos se obtuvieron resultados que, por lo general, no variaban con la dosis de diazepam administrada, sin embargo definitivamente, si afectaban la linfoproliferación considerablemente al compararlos con sus controles. El diazepam no tuvo un claro efecto dosis-dependiente, lo cual puede explicarse por el hecho de que a los animales sanos el diazepam les reduce aún más su capacidad de respuesta linfoproliferativa como lo mencionan algunos autores (89, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99). Esto lo podríamos esperar más para los ratones hacinados ya que teóricamente tienen más comprometida su respuesta, pero como se produjo un estrés moderado los animales pudieron haberse adaptado a este y así sufrir menos daño que los no estresados por hacinamiento. Otro dato interesante es que en los animales no hacinados el efecto de las dosis no es diferente del ocasionado por la solución salina lo cual puede explicar que en este grupo experimental de animales el hecho de inyectar a los ratones también pudo haberles causado estrés.

No se puede pensar que la dosis administrada fue excesiva ya que coincide con la utilizada por la gran mayoría de los trabajos publicados que fueron

revisados. Generalmente se utilizan dosis que caen en el rango de 1-10 mg/Kg y éstas varían dependiendo del modelo, la técnica y el animal utilizado. Nosotros realizamos pruebas para elegir nuestras dosis según el efecto sedante, ansiolítico o hipnótico que mostraran los ratones. En el trabajo no se estudió la condición clínica de los animales inyectados ni tampoco su consumo individual de alimentos porque éstas variables no formaron parte de nuestros objetivos.

Los resultados representan una señal de alarma. Aparentemente todavía no está completamente estudiado el efecto adverso que puede tener el diazepam sobre los linfocitos del sistema inmune y el fármaco se consume con demasiada confianza porque, aparentemente, se consideran discretos sus efectos sobre la inmunidad. Es por eso que nos parece conveniente crear una conciencia de que el compromiso inmunológico es un riesgo aunque el sistema tenga mecanismos que amortiguan sus deficiencias y no provocan la expresión inmediata de síntomas graves.

Al existir interacciones bidireccionales entre los sistemas inmune, nervioso y endocrino, se puede pensar que, sistemáticamente, casi cualquier tratamiento que afecte las funciones del sistema nervioso va a repercutir sobre las funciones del sistema inmune. Algunos pueden opinar que esto es un precio que bien se puede pagar si se normalizan funciones tan nobles como las del cerebro. Pero, no se debe olvidar que, a la inversa, casi cualquier alteración en las funciones del sistema inmune (particularmente la producción de citocinas o la formación de autoanticuerpos) puede afectar las funciones del sistema nervioso.

Los resultados de este trabajo permiten sugerir que 1) se debe ampliar el estudio de los efectos del diazepam sobre las múltiples funciones del sistema inmune y 2) se debe insistir más abiertamente en los riesgos que representa consumir un medicamento que, al menos experimentalmente, compromete algunas de las funciones del sistema inmune.

8 APENDICE

A.1. EQUIPO:

- Campana de flujo laminar (Veco EL 4078)
- Placas de 96 pozos estériles (NALGE NUNC INTERNATIONAL)
- Micropipetas automáticas (Finnipipette)
- Puntas de micropipeta estériles (AXIGEN)
- Hemocitómetro con cubreobjetos
- Jeringas de 5 ml estériles (BECTON-DICKINSON)
- Agujas de jeringas de 1ml estériles (TERUMO)
- Tubos de centrifuga estériles de 15ml (FALCON)
- Estufa de cultivo con CO₂ (FORMA SCIENTIFIC MOD 3110)
- Centrifuga clínica
- Microscopio invertido (OLYMPUS)
- Pipetas de 10 ml estériles (NALGE NUNC INTERNATIONAL)
- Viales Eppendorff de 1.5 ml (AXIGEN)
- Cajas petri estériles. (TECHNICARE)
- Lector de ELISA (Dynex)
- Equipo de disección

A.2. REACTIVOS :

- Medio de Cultivo RPMI 1640 suplementado (GIBCO Grand Island, N.Y.)
- Solución amortiguadora de HEPES (GIBCO Grand Island, N.Y.)
- Solución de aminoácidos no esenciales (GIBCO Grand Island, N.Y.)
- Solución antibióticos antimicóticos (GIBCO Grand Island, N.Y.)

- Solución hemolizante (solución de Tris-Base 0.17M (RESEARCH ORGANICS Cleveland Ohio) y solución de NH_4Cl 0.16M (RESEARCH ORGANICS, Cleveland, Ohio)
- Solución de Tris-base (100 ml)
- Solución de cloruro de amonio 0.16 M
- Solución de Concanavalina-A (SIGMA St. Louis MO)
- Solución de Hanks. (GIBCO Grand Island N.Y.)
- Colorante Azul tripano al 0.4% (RESEARCH ORGANICS Cleveland Ohio)
- Fosfato de sodio monobásico (RESEARCH ORGANICS Cleveland Ohio)
- Fosfato de sodio dibásico (RESEARCH ORGANICS Cleveland Ohio)
- Cloruro de sodio (J.T. Baker edo. de México)
- Solución de MTT (Thiazol Blue) (SIGMA St. Louis MO)
- Solución de lisis (Ácido clorhídrico 0.1M y SDS al 10%)

A.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

➤ **Medio RPMI 1640 suplementado.** Al medio líquido conteniendo L-glutamina 200mM y rojo de fenol se le agrega 10% de suero bovino fetal estéril, el cual deberá estar previamente inactivado por calor (56°C durante 30 min). En el momento de su uso a este medio también se le añade penicilina-estreptomycin y anfotericina B al 1%, estériles, ácido N-2-hidroxietil piperina N-2 etanolsulfónico (HEPES) 25 mM estéril, aminoácidos no esenciales al 1%, estériles. El medio de cultivo se mantiene a 4°C y es suplementado el mismo día de su uso, en condiciones estériles.

➤ **Solución hemolizante:** Se prepara mediante la mezcla de dos soluciones diferentes:

Sol. A: NH₄Cl 0.16M (0.87g en 100ml de agua destilada).

Sol. B: Tris-base 0.17M (2.5g en 100ml de agua destilada).

Se toman 8 partes de la solución A + 2 partes de la solución B y se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza por filtración en membrana de nitrocelulosa con poro de 0.22 um. Se guarda en refrigeración.

➤ **Concanavalina-A** Se prepara a partir del polvo liofilizado conteniendo 5 mg de Con-A Se le agregan 5 ml del medio de cultivo RPMI, suplementado, este para tener una concentración de 1 mg/ml que se guarda en alícuotas de 1 ml en congelación. Esta es la solución concentrada a partir de la cual se hacen las diluciones hasta que el mitógeno tenga una concentración de 5µg/ml.

➤ **Azul Tripano (0.4%)**

0.4 g del colorante azul tripano

100 ml de SSI estéril. Se guarda a temperatura ambiente.

➤ **Solución de Lisis (HCl + SDS):**

10 g de SDS

100 ml de HCl 0.01N. Guardar a temperatura ambiente.

➤ **Solución balanceada de fosfatos PBS:**

0.02645g de NaH_2P_4

0.21689g de Na_2PO_4

0.9g de NaCl

Todas las sales se mezclan en un volumen de 800 ml, se ajusta el pH a 7.2 – 7.4 y luego se afora a un litro. Finalmente se esteriliza por filtración en membrana de 0.22 μm . Guardar en refrigeración.

➤ **Solución de MTT:**

5 mg de MTT

1 ml de SSI y se esteriliza por filtración en membrana de 0.22 μm . Guardar en congelación protegiendo de la luz.

➤ **SSI estéril:**

0.85g de NaCl

100 ml de agua destilada.

Se esteriliza por filtración con membrana de 0.22 μm o por calor, en autoclave, a 121°C y 0.5 lb de presión durante 15 minutos. Guardar en refrigeración.

ANEXO I

Comparación de los Valores de Linfoproliferación

Ratones No Estresados

Tukey HSD				
Tratamientos	N°	Subrangos para $\alpha = 0.05$		
		1	2	3
Db	5	0.0348		
Dm	5	0.0546	0.0546	
Da	5		0.0896	
SSI	5		0.1006	
Ctrl	5			0.1512

Se muestran las medias para grupos en subrangos homogéneos.

Ratones Estresados

Tukey HSD				
Tratamientos	N°	Subrangos para $\alpha = 0.05$		
		1	2	3
Db	5	0.0582		
Dm	5	0.0634		
Da	5	0.0814	0.0814	
SSI	5		0.1172	0.1172
Ctrl	5			0.1406

Ratones Estresados y No Estresados

Test de Levine para igualdad de varianzas o prueba de t para igualdad de medias.

Grupos	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
Ctrl	0.005	0.94	0.78	8	0.458	0.0106	0.014
SSI	1.28	0.29	-0.87	8	0.409	-0.0166	0.019
Da	2.01	0.19	0.37	8	0.721	0.0082	0.022
Dm	1.49	0.26	-0.25	8	0.808	-0.0036	0.014
Db	0.66	0.44	-2.27	8	0.053	-0.0286	0.013

9

BIBLIOGRAFIA

- (1) Pedrizel A.G. (1997). Heat Shock response and Organ Preservation: Model of Stress Conditioning. Ed. Chapman and Hall, p99.
- (2) Herbert J. (1997). Stress the Brain and Mental Illness. *British Medical Journal* **315**:530.
- (3) Mc heyzer W.M. and Ahmed R. (1999). B cell Memory and the Long Lived Plasma cell. *Current Opinion in Immunology*. **11**: 172.
- (4) García T.F (1999). El Estrés del Recien Nacido y los Autoanticuerpos Anticerebro en Adulto. *Acta Pediátrica México*. **20**:15
- (5) Abbas A. K., Lichtman A., Pober J. (1995). *Inmunología Celular y Molecular*. 2ª Ed. Editorial Interamericana Mc Graw-Hill, 3-13, 423-442.
- (6) Dhabhar F.S. Mc Ewen B. (1997). Acute Stress Enhance While Chronic Stress Suppresses Cell-Mediated Immunity in vivo: A Potential Role for Leukocyte Trafficking. *Brain, Behavior, and Immunity*. **11**:286.
- (7) Szabo S. (1998). Hans Selye and the Development of the Stress Concept. *Annals of New York Academy of Sciences*. **251**: 19.
- (8) Luecken L., Suarez E.C. and Kuhn C.M. (1997). Stress in Employed Women: Impact of Marital Status and Children at Home on Neurohormone Output and Home Strain. *Psychosomatic Medicine*. **59**:352.
- (9) Endo Y., Nishimura J.L. and Kobayashi S. (1997). Long-Term Glucocorticoid Treatment Decreases Local Cerebral Blood Flow in the Rat Hippocampus, in Association With Histological Damage. *Neuroscience*. **79**:5745.
- (10) Sapolsky R.M. (1996). Why Stress is Bad for you Brain. *Science*. **273**:749.
- (11) Pike L. J., Smith L.T., Hauger R., Nicassio P. M., and Patterson T. (1997). Chronic life Stress Alters Sympathetic, Neuroendocrine and Immune Responsivity to an Acute Psychological Stressor in Human. *Psychosomatic Medicine*. **59**:447.
- (12) Espinosa E., Bermúdez-Rattoni. (2001). Relación Conducta-Inmunidad: Papel de las Citocinas. *Revista de Investigación Clínica*. **53 (3)**: 240.
- (13) Jezoba D., Ochedalski T., Glickman M., Kiss A. and Aguilera G. (1999). Central Corticotropin Releasing Hormone Receptors Modulate Hypotalamic-Pituitary-Adrenocortical and Sympathoadrenal Activity During Stress. *Neuroscience*. **94**:797.
- (14) Mc Ewen B.S. (1999). Stress and Hippocampal Plasticity. *Annual Reviews Neuroscience*. **22**:105.
- (15) Ockenfels M.C., Porter L., Smyt J. and Kirschbaum C. (1995). Effect of Chronic Stress Associated with Unemployment on Salivary Cortisol: Overall Cortisol Levels, Diurnal Rhythm, and Acute Stress Reactivity. *Psychosomatic Medicine*. **57**:406.

- (16) Balabanov R., Beamont T. and Dore D.P. (1999) Role of Central Nervous System Microvascul. Pericytes in Activation of Antigen Primed Splenic T-Lymphocytes. *Journal of Neuroscience Research*. **55**:578.
- (17) Scaccianoce S., Nicolai R., Cigliana G. (1995). Reduced Glucocorticoid Response to Corticotropin Secretagogues in the Aged Sprague Dawley Rat. *Neuroendocrinology*. **62**:32
- (18) Npacak K., Baffi J., Kvetnansky R., Golstein D.S. and Miklos P., (1998). Stressor-Specific Activation of Catecholaminergic Pathway: Implication for Stress-Related Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Responses. *Advances in Pharmacology*. **42**:561.
- (19) Irani D., Lin K., and Griffin D. (1997). Regulation of Brain T Cell During acute Central Nervous System Inflammation. *Journal of Immunology*. **158**: 2318.
- (20) Marines L. W., Keck J.B., Dugar A. and Lakoski J.M. (1998). Age Dependent Loss of Corticosterones Modulation of Central Serotonin %HT1A Receptor Binding Sites. *Journal of Neurosciences Research*. **53**:86.
- (21) Sung N.J., Joung L.E., Sook K.J., Ryon K.H. and Joo. G.B. (1999). Neurotoxic and Neuroprotective action of Catecholamines in Cortical Neurons. *Experimental Neurology*. **159**: 217.
- (22) Redei E., Rittenhouse P.A., Revskoy S., Mc Given R. And Aird F. (1998). A Novel Endogenous Corticotropin Release Inhibiting Factor. *Annals of New York Academy of Sciences*. **840**:456.
- (23) Joels M., Karten Y., Hesen W. and Kloet R. (1997). Corticosteroid Effects on Electrical Properties of Brain Cell; Cell Temporal Aspects and Role of Antigluccorticoids *Psychoneuroendocrinology*. **22**:581.
- (24) Bonneau R.H., Morméde P., Vogler G.P., Mc Clearn G. and Jones B.C. (1998). A Genetic Basis for Neuroendocrine Immune Interactions. *Brain Behavior and Immunity*. **12**:83.
- (25) Shah P.T., Yoon K.W., Xu X.M., and Broder L.D., (1997). Apoptosis Mediates Cell Death Following Traumatic Injury in Rat Hippocampal Neurons. *Neuroscience*. **79**:999.
- (26) Mizoguchi K., Yuzurihaca M., Ishige A., Sasali H., Chui D.H. and Tabira T. (2000). Chronic Stress Induces Impairment of Spatial Working Memory Because of Prefrontal Dopaminergic. *The Journal of Neuroscience*. **20**:1568.
- (27) Crumeyrolle A.M. and Haour F. (1995). Effect of Bacterial Endotoxin and Interleukin-1 on Receptors and Glucocorticoids. *Neuroendocrinology*. **62**:39.
- (28) Aloisi F., De Simone R., Columba C.S., Renna G. and Adorini L (2000). Functional Maturation Adult Mouse Resting Microglia into an APC is Promoted by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interaction with Th1 Cells. *Journal Immunology*. **164**:1705.
- (29) Meterola B., Longorbardi, Colao A. Somma Di C., Ferrone D., Rossi E., Covelli V. And Lonbardi G. (1994). Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Neuropsychiatric Disorders. *Annals of New York Academy of Sciences*. **741**:263.
- (30) Finaly J.M. and Zigmond M.J. (1997). The Effects of Stress on Central Dopaminergic Neurons: Possible Clinical Implication. *Neurochemical Research*. **22**:1387.
- (31) Kim J.J. and Yoon K.S. (1998). Stress: Metaplastic Effects in the Hippocampus. *Trends Neuroscience*. **21**:505.

- (32)** Lampson L.A. (1998) Beyond Inflammation: Site-Directed Immunotherapy. *Immunology Today*. **19**:17.
- (33)** Mitrovic A.D., Maddison .E., Johnston G.A. (1999) Influence of the Estrus Cycle on L-glutamate and L-aspartate Transport in Rat Brain Synaptosomes. *Neurochemistry International*. **34**: 101.
- (34)** Reinholz M., Haggard J., Curran G. And Poduslo J. (1999). Plasma Pharmacokinetics Nervous System Biodistribution and Biostability and Spinal Cord Permeability at the Blood-Brain-Barrier of Putrescine-Modified Catalase in the Adult Rat. *Experimental Neurology*. **159**:191-203.
- (35)** Correa S., Rodriguez Galan M. y Rivero V.E. (1998). Chronic Varied Stress Modulates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Wistar rats. *Brain Behavior and Immunity*. **12**:134-148.
- (36)** Jankovic B.D. (1994). Neuroimmunomodulation from Phenomenology to Molecular Evidence. *Annals of New York Academy Science*. **741**: 12.
- (37)** Lawson L. J., Perry V.H., Dri P. And Gordon S. (1990). Heterogeneity in the Distribution and Morphology of Microglia in the Normal Adult Mouse Brain. *Neuroscience*. **39**: 151-70
- (38)** Gartside S.E. Francoise S.C. and Tappaz M. (1995). Evidence that the Activation of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis by Electrical Stimulation of the Noradrenergic A1 group is not Mediated by Noradrenaline. *Neuroendocrinology*. **62**: 2-12.
- (39)** Huang T. L. (1998). Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α Suppress Desamethasone Induction of Glutamine Synthetase in Primary Mouse Astrocytes. *Journal of Neurochemistry*. **71**:1436.
- (40)** Aloisi F., Ria F., Adorri L. (2000). Regulation of T-Cell Responses by CNS Antigen Presenting Cell Different Roles for Microglia and Astrocytes. *The Journal of Neuroscience Research*. **21**:143.
- (41)** Murray C.A. and Clements M.P. (1999). Interleukin-1 Induces lipid peroxidation and Membrane Changes in the Rat Hippocampus: An Age-Related Study. *Gerontology*. **45**:136-142.
- (42)** Betancur C. Borell J. And Guaza C. (1995). Cytokine Regulation of Corticosteroid Receptors in the Rat Hippocampus: Effects of IL-1, IL-6, TNF and Lipopolisaccharide. *Neuroendocrinology*. **62**:47.
- (43)** Thomas S.A. and Palmiter R.D. (1997). Disruption of the dopamine β -Hydroxylase gene in Mice Suggests Roles for Norepinephrine in Motor Functions, Learning, and Memory. *Behavioral Neuroscience*. **11**: 579.
- (44)** Zinder D. And Unanue E. (1982). Communications. *The Journal of Immunology*. **129**:1803-1805.
- (45)** Mc Ewen B.S. (1998). Protective and Damaging effects of Stress Mediators. *The New England Journal of Medicine*; **338**:171.
- (46)** Turbull A.V. and Rivier C.L. (1999). Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal-Axis by Cytokines: Actions and Mechanism of Action. *Physiological Reviews*. **79**: 1.
- (47)** San R. and Shwartz B. (1998). Optical imaging Reveals Elevated Intracellular Chloride in Hippocampal Pyramidal Neurons After Oxidative Stress. *The Journal of Neuroscience*. **19**: 9209.

- (48)** Phillips L.M., Simon P.J. and Lampson L.A. (1999). Site Specific Immune Regulation in the Brain: Differential Modulation of Major Histocompatibility Complex (MHC) Proteins in Brainstem vs. Hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*. **405**:322-333
- (49)** Kaltreider H.B., Ichikawa S., Byrd PK, Ingram D.A., Kishiyama J.L., Sreedharan S.P., Warnock M.L., Beck J.M., Goetzel E.J. (1997). Upregulation of Neuropeptide and Neuropeptide Receptors in a Murine Model of Immune Inflammation in Lung Parenchyma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. **16**: 133.
- (50)** Tang S.C., Fend F, Muller L., Braunsteiner H., Widermann C.J., C.J., (1993). High-affinity Substance P Binding Sites of Neurokinin-1 Receptors Type Autoradiographically Associated with Vascular Sinuses and High Endothelial Venules of Human Lymphoid Tissues. *Laboratory Investigation*. **69**: 89.
- (51)** Chorusos P.G., Torpy J.D. and Gold W.P. (1998). Interaction Between the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the Femal Reproductive System Clinical Implication. *Annals of Internal Medicine*; **129**:229-240.
- (52)** Mc Ewen B.S. (1998). Protective and Damaging Effects of Stress Mediators. *The New England Journal of Medicine*. **338**: 171.
- (53)** Acarin L., Gonzalez B., Castro A.J., Castellano B. (1999). Primary Cortical Glial Reaction versus Secondary Thalamic Glial Response in the Excitotoxically Injured Young Brain Microglial/Macrophage Response and Major Histocompatibility Complex Class I and II Expression. *Neuroscience*. **89**: 549.
- (54)** Petitto S, Xiao R.P., Hohl C, Altschuld R, Lakatta E.G. (1997). "Cross-talk" Between Opioid peptide and adrenergic Receptor Signaling in Isolated Rat Heart. *Circulation*. **95**: 2112.
- (55)** Dhabbar F.S., Miller A.H., Mc Ewen B.S. and Spencer R.L. (1995). Effects of the Stress on Immune Cell Distribution. *The Journal of Immunology*. **154**: 214.
- (56)** Crumeyrolle A.M. and Haour F. (1995). Effect of Bacterial Endotoxin and Interleukin-1 on Prostaglandin Biosynthesis by the Hippocampus of Mouse Brain Role of IL-1 Receptors and Glucocorticoids. *Neuroendocrinology*. **62**:39.
- (57)** Docentes de la Universidad de Chile. (2000) Central de Apuntes N° 5.
- (58)** Katsung B.G. 1996. *Farmacología Basica y Clínica*. Ed. El Manual Moderno México. Pag 407-421
- (59)** Usdin, E., Skolnick, P., Tallman, J.F., Greenblatt, O., and Paul, S. M., eds *Pharmacology of Benzodiazepines*. Mc Millan Press, London, 1982)
- (60)** Goodman and Gilman (1996). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, Cap 17,18 y 19 Ed. Panamericana, Mex
- (61)** Halsband S.A. (1998). Usos de las Benzodiacepinas. *Vertex Rev. Argentina de Psiquiatria*. **9**: 67.
- (62)** Costa E. (1983). *The Benzodiazepines: From Molecular Biology to Clinical Practice*. Raven Press New York
- (63)** Greenblatt, D.J., Shader, R.I., and Abernethy, D.R. (1983). Drug therapy: Current Status of Benzodiazepines. *N. Engl. J. Med.*, **309**: 354-358, 410-416.

- (64)** Galdiero F, Bentivoglio, Unzo I, Ianniello R, Capasso C., Mattera S., Nazzaro C., Galdiero M. and Romano Carratelli. (1995). Effects of Benzodiazepines on Immunodeficiency and Resistance in Mice. *Life Science* **57**: 2413.
- (67)** Avi Avital M.A., Gal Richter-Levin, Ph.D., Svetlana Leschiner, Ph.D., Ilana Spanier, B.Sc., Leo Veenman Ph. D., Abraham Weizman, M.D., and Moshe Gavish, Ph. D. (2001). Acute and Repeated Swim Stress Effects on Peripheral Benzodiazepines Receptors in the Rat Hippocampus, Adrenal, and Kidney. *Neuropsychopharmacology*. **25**:669.
- (68)** Woods, J.H., Katz J.L., and Winger, G (1987). Abuse liability of benzodiazepines. *Pharmacol. Rev.***39**:251-413
- (69)** Woods J.H., Katz .L. and Winger, G. (1992). Benzodiazepines: Use, Abuse and Consequences. *Pharmacology Rev.***44**: 151.
- (70)** Schofield P.R., M.G., Fujita, N., Burt D.R., Stephenson F.A., Rodríguez H., Rhoe L.M., Ramachandran J., Reale V., Glencoure T.A., Seeburg, P.H. and Barnard.(1987). Sequence and Functional Expression of the GABA_A receptors Shows a Ligand-Gated Receptor Superfamily. *Nature*. **328**: 221.
- (71)** Rabin B.S. *Stress, Immune Function and Health*. Cap. 1 y 2. Ed. Wiley-Liss. USA, 1999.
- (72)** Crawley J.N. (1981). Neuropharmacologic Specificity of a Simple Animal Model for the Behavioral Actions of Benzodiazepines. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. **15**:595.
- (73)** Mossman, T. (1983) : Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*. **65**: 55.
- (74)** Compley, J.C.; Rees, M.J.; Turner, C.H.; Jenkins, D.C (1989) . : Colorimetric Quantitation of Filarial viability. *J. Parasitol.*, **19**: 77.
- (75)** Page; M.; Bejaqui, N., Lemieux, P. : Optimization of tetrazolium-based colorimetric assay for the measurement of cell number and cytotoxicity. *J. Immunopharmacol.*, 1988, **10**:785.
- (76)** Prince, P.; Mcmillan, T.J. (1990) : Use of Tetrazolium Assay in Measuring the response of human tumor cells to ionizing radiation. *Cancer Res*. **50**:1392.
- (77)** Denizot, F.; Hang, R. : Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival: Modifications to Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensivity and Reliability. *J. Immunol. Methods*, 1986, **89**:271.
- (78)** Tada, H.; Shiho, O.; Kuroshima, K.; Koyama, M.; Tsukamoto, K (1986) . : An Improved Colorimetric Assay for Interleukin 2. *J. Immunol. Methods* **93**: 157.
- (79)** Gerlier, D., Thonasset, N. (1986) : Use of MTT colorimetric Assay to Measure cell Activation. *J. Immunol. Methods*. **94**:57.
- (80)** Gallagher, G.; Taylor, N.; Willdrige, J. (1987): Maturation Signals for Human B Cells. Use of the MTT Assay and EBV-transformed Cell Lines to Define signals which Promote Cell Growth or Immunoglobulin Secretion. *J Immunol. Methods*. **105**:229.
- (81)** Sigma. *Reactivos y Productos Quimicos Para la Vida*. (2002)
- (82)** Hudson, L and Hay F.C. (1989). *Practical Immunology*. 3rd. Blackwell Scientific Publications. USA. p94.

- (83) Andrejevic S., Bukilica M. et al. (1997). Stress-Induced Rise in Serum Anti-Brain Autoantibody Levels in the Rat. *Intern. J. Neuroscience*. **89**: 153.
- (84) Salman H, Bergman M, Weizman A, Bessler H, Weizz J, Strausberg R, Djaldetti M. (2001). Effect of Diazepam on the Immune Response of Rats Exposed to Acute and Chronic Swim Stress. *Biomed Pharmacotherapy*, **54**: 311.
- (85) Pericic D, Manev H, Boranic M, Poljak-Blazi M, Lakic N. (1987). Effect of Diazepam on Brain Neurotransmitters, Plasma Corticosterone, and the Immune System of Stressed Rats. *Ann N Y Academy Science*. **496**: 450.
- (86) Okimura T, Nigo Y. (1986). Stress and Immune Response. I. Suppression of T cell Function in Restraint-Stressed Mice. *Japan Journal of Pharmacology*. **40**: 505.
- (87) Covelli V., Maffione A.B., Nací C, Tato E, Jirillo E. (1998). Stress, Neuropsychiatric Disorders and Immunological Effects exerted by Benzodiazepines. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. **20**: 199.
- (88) Sacerdote P, Panerai A.E., Frattola L, Ferrarese C. (1999). Benzodiazepine-Induced Chemotaxis is Impaired in Monocytes from Patients with Generalized Anxiety Disorder. *Psychoneuroendocrinology*. **24**: 243.
- (89) Domínguez-Junior M, Pinheiro SR., Guerra JL., Palermo-Neto J. (2000). Effects of Treatment with Amphetamine and Diazepam on Mycobacterium bovis-Induced Infection in Hamsters. *Immunopharmacol Immunotoxicology*. **22**: 555.
- (90) Morgulis MS, Rodríguez PM, Palermo-Neto J. (1999). Benzodiazepine Receptors and Avian Macrophage Activity: Diazepam Decreases Spreading and Phagocytosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **21**: 787.
- (91) Massoco CO, Palermo-Neto J. (1999). Diazepam Effects of Peritoneal Macrophage Activity and Corticosterone Serum Levels in Balb/C mice. *Life Science* **65**: 2157.
- (92) Stepien H, Agro A, Padol I, Stanisiz A. (1994). Inhibitory Effect of Diazepam on Human Natural Killer Activity in Vitro. *Cytobios*. **77**: 131.
- (93) Ramseier H, Lichtensteiger W, Schlumpf M. (1993). *In vitro* Inhibition of Cellular Immune Responses by Benzodiazepines and PK 11195. Effects on Mitogen-and Alloantigen-Driven Lymphocyte Proliferation and on IL-1, IL-2 Synthesis and IL-2 receptor Expression. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **15**: 557-82.
- (94) Covelli V, Maffione AB, Greco B, Cannuscio B, Calvello R, Jirillo E. (1993). *In vivo* Effects of Alprazolam and Lorazepam on the Immune Response in Patients with Migraine without Aura. *Immunopharmacology Immunotoxicol*. **15**: 415.
- (95) Covelli V, Munno I, Decandia P, Altamura M, Cannuscio B, Maffione AB, Jirillo E. (1991). Effects of the Benzodiazepines on the Immune System. *Acta Neurol* **13**: 418.
- (96) Covelli V, Decandia P, Altamura M, Jirillo E. (1989). Diazepam Inhibits Phagocytosis and killing Exerted by polymorphonuclear Cells and Monocytes from Healthy Donors. *In vitro Studies*. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **11**:701-14.
- (97) Pawlikowski M, Lyson K, Kunert-Radek J, Stepien H. (1988). Effect of Benzodiazepines on the Proliferation of Mouse Spleen Lymphocytes in vitro. *J. Neural Transm*. **73**: 161.

(98) Shanks N, Renton C, Zalzman S, Anisman H. (1994). Influence of Change from Grouped to Individual Housing on a T-Cell Dependent Immune Response in Mice: Antagonism by Diazepam. *Pharmacol Biochem Behavior*. **47**: 497.

(99) Marino F, Cattaneo S, Cosentino M, Rasini E, Di Grazia L, Fietta AM., Lecchini S and Frigo G. (2001). Diazepam Stimulates Migration and Phagocytosis of Human Neutrophils: Possible Contribution of Peripheral-Type Benzodiazepine receptors and Intracellular Calcium. *Pharmacology* **63**: 42.

(100) Irwin M, Hauger R.L., Britton K. (1993). Benzodiazepines Antagonize Central Corticotropin Releasing Hormone-Induced Suppression of Natural Killer Cell Activity. *Brain Research*. **631**:114.

(101) Okimura T., Nagata I. (1986). Effect of Benzodiazepines Derivates: I. Augmentation of T-Cell-Dependent Antibody Response by Diazepam in Mouses Spleen Cells. *J. Immunopharmacol.* **327**:46.

(102) Koenig A., Mallman P, Nadstawek j. (1988). The Immune System and Benzodiazepines. *Anasth Intensivther Notfallmed* **23**: 136.