

INMUNOESTIMULACIÓN CONDICIONADA¹

DUILIO CRUZ BECERRA*
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE COLOMBIA

NANCY YOMAYUSA G.**
ORGANIZACIÓN SANITAS INTERNACIONAL

Abstract

The objective of this research was to observe if the granulocytic colony stimulating factor (G-CSF) effect, can be transferred to 1% glucose solution using classical conditioning paradigm. The design was oriented by the established parameters in the conditioned immunosuppression with ciclofosfamide and saccharine. Previously, the neutrophil levels were tested as an effect of: the drinking time reduction to 15 minutes per day, the 1% glucose solution ingest during 15 minutes per day, and of one single intraperitoneal doses of 20 mg/K of (G-CSF). Then the conditioning of G-CSF and 1% glucose solution was tested after one and two pairing sessions. The results are according with the Ader, R. et al. (1991) view, who referring to Solvason, B. et al. (1998) findings, state that there is not yet enough experimental evidence that support the immunocompetence conditioning phenomenon.

Key words: immunocompetence, classical conditioning, rats, psychoimmunology.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue observar si el efecto del factor estimulante de colonias granulocíticas FECSG puede transferirse a una solución de glucosa al 1% utilizando el paradigma de condicionamiento clásico. El diseño se orientó por los lineamientos establecidos en la inmunosupresión condicionada con ciclofosfamida y agua azucarada. Previamente fueron evaluados los niveles de neutrófilos como efecto de: la reducción del tiempo de bebida a 15 minutos por día, el consumo de glucosa al 1% durante 15 minutos por día, y de una sola dosis intraperitoneal de 20 mg/k de FECSG. Posteriormente se evaluó el condicionamiento de FECSG con solución de glucosa al 1% luego de una y dos sesiones de emparejamiento. Los resultados están en consonancia con la postura de Ader, R. Y cols. (1991) quienes, refiriéndose a los hallazgos de Solvason, B. y cols. (1988) afirman que aun no existe suficiente evidencia experimental que demuestre el fenómeno de la inmunocompetencia condicionada.

Palabras claves: inmunocompetencia, condicionamiento clásico, ratas, psicoimmunología.

* Laboratorio de Psicología Universidad Católica de Colombia. E-mail: dcruzb@ucatolica.edu.co

** Departamento de Investigación en Ciencias Básicas. Organización Sanitas Internacional-Colombia.

¹ Los autores agradecen a los Investigadores Juanví Sánchez, José María Delgado y Claudia Fajardo por sus aportes a esta investigación.

La psiconeuroinmunología (PNI) es el estudio de la interacción entre la conducta, el sistema nervioso y el sistema inmune (Ader y Cohen, 1993; Ader, Cohen y Felten, 1995; Maier, Watkins y Fleshner, 1994; Stites y Terr, 1993). Se desarrolla como un campo integrador frente al estudio independiente de estos sistemas, poniendo de manifiesto una concepción interactiva de los sistemas inmunitario y neuroendocrino en la regulación y desarrollo de sus funciones, siendo el sistema inmune desde esta perspectiva, un verdadero órgano sensorial que capacita al organismo en su interacción con el ambiente (Maier y Cols. 1994).

Las interacciones que estudia la PNI se basan en el hecho de que el cerebro, los ganglios linfáticos, los nervios autónomos, las glándulas endocrinas, el timo y el bazo, se comunican a través de hormonas, neurotransmisores, neuropéptidos y citoquinas, elementos capaces de interactuar directamente en cada uno de estos órganos a través de receptores específicos (Ader, 1991; Kendall y Al-Shawaf, 1991 citado por Black, 1995; Maestroni, Conti y Pedrini, 1992; Reichlin, 1993; Blalock, 1994; Maier, Watkins y Fleshner, 1994; Abbas, Lichtman y Pober, 1995; Ader, Cohen y Felten, 1995; Blalck 1995; Chriusos, 1995; Goodkin, K., Fletcher, M., y Cohen, N., 1995; Savino y Dardenne, 1995).

Se podría afirmar que dentro de la PNI, el condicionamiento pavloviano ha sido estudiado en dos momentos; el primero en la década de los 20s del siglo pasado, al interior de la antigua Unión Soviética en donde la propuesta de Pavlov sobre el condicionamiento de las respuestas fisiológicas con eventos externos llamaba la atención de quienes orientarían el estudio biológico del comportamiento en esa región del mundo. A

pesar de las deficiencias metodológicas propias de la época, se realizaron condicionamientos de eventos incondicionados tales como inyecciones de solución salina, estímulos dolorosos (calentamiento de las orejas en los conejos) y activadores inmunológicos que hacían el papel de estímulos incondicionados (Ader y Cohen, 1982; Ader, Felten y Cohen, 1991; Borrás, 1994).

El segundo período comenzó con la demostración experimental que hicieron Robert Ader y Richard Cohen en la Universidad de Rochester en 1975, sobre la denominada inmunosupresión condicionada en ratas. Fenómeno que identificaron durante el desarrollo de experimentos que buscaban poner a prueba la hipótesis de que la resistencia a la extinción de la respuesta condicionada (aversión al sabor dulce) era directamente proporcional al volumen de sacarosa consumida en una asociación única con ciclofosfamida (CY), sustancia que produce un efecto inmunosupresor, náuseas y alteraciones gastrointestinales. Los investigadores observaron que los animales a los cuales se les suministraba más cantidad de agua azucarada presentaban mayor probabilidad de muerte. Este hecho no tenía otra explicación que el condicionamiento clásico de la CY con el agua azucarada. Ader y Cohen trabajaron intensamente en la validación de esta hipótesis durante los siguientes 10 años (Ader y Cohen 1982; Ader, Felten y Cohen, 1991; Borrás, 1994). Paralelamente se realizaron estudios del mismo perfil pero con enfermedades como el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoidea (Ader, Felten y Cohen, 1991; Klosterhalfen y Klosterhalfen, 1983).

Así como la CY, con su efecto inmunosupresor, puede condicionarse a un estímulo inocuo como el agua azucarada, en sentido

contrario, un factor estimulante de colonias granulocíticas (FECG) como el filgrastim también debería poderse condicionar a estímulos neutros. Solvason, B., Ghanta, V. and Hiramoto, R. (1988) demostraron cómo la restricción física (estrés físico por inmovilización), por un lado, neutralizó el efecto del ácido polinosínico-policitidílico (poly I:C) el cual activa las células NK en ratones con mieloma MOPC 104E; y por otro, disminuyó el tamaño del tumor y aumentó el tiempo de supervivencia en ratones con osteosarcoma murino cuando se aplicaba junto a una inyección de Poly I:C (20 mg/K). Estos autores observaron que la respuesta de las células NK por efecto del poly I:C se podía condicionar con el olor a alcanfor. En 1988 confirmaron su observación al trabajar en un experimento en el cual, además, emparejaron con el mismo estímulo incondicionado (poly I:C), glucosa al 1% junto con 125 mg/k de cloruro de litio el cual genera alteraciones gástricas molestas. Sin embargo, Ader y cols. (1991) no avalaron estas observaciones. Queda planteada entonces la necesidad de dilucidar si el condicionamiento clásico entre un FECG y una sustancia inocua produce resultados satisfactorios.

Dentro de la inmunidad humoral y celular, la proliferación, diferenciación, desarrollo y función de las células progenitoras está mediada por hormonas proteicas llamadas citocinas; estas se dividen en tres grupos: monocinas, cuando las producen los fagocitos mononucleares; linfocinas, las producidas por los linfocitos T activados, y factores estimuladores de colonias que son producidos tanto por los monocitos como por los linfocitos T. En particular, el factor estimulador de colonias de granulocitos (FECG) sintetizado por las células T activas

y los fagocitos mononucleares, es un polipéptido capaz de estimular las células progenitoras de la médula ósea que han sido iniciadas hacia la formación de granulocitos. Su estructura molecular en humanos se ha estudiado en profundidad, tanto que esta sustancia se produce a gran escala a partir de la manipulación del gen que lo sintetiza y se conoce comercialmente como filgrastim (Abbas, Lichtman y Pober, 1995; Hardman, Limbird y Goodman, 1996; Dexter y Spooncer, 1987; Nicola, Metcalf, Matsumoto y Johnson, 1983). El filgrastim se utiliza en la práctica clínica para disminuir la incidencia de infección en pacientes con neutropenia febril secundaria a la terapia mieloablativa o mielosupresiva, en la terapia crónica de pacientes con neutropenia congénita, neutropenia cíclica o idiopática (Dexter y Spooncer, 1987; Hardman, Limbird y Goodman, 1996).

La farmacodinamia y farmacocinética del filgrastim se ha estudiado en ratas, hamsters, perros, monos y humanos mostrando resultados consistentes *in vivo* e *in vitro*; en especial, lo relacionado con el crecimiento de células tumorales, los efectos según el tipo de administración, el conteo ascendente de neutrófilos en sangre periférica y su relación positiva con la dosis (Souza, Boone y Gabrilove, 1986; Donahue y Otros, 1986; Welte, K., Bonilla, M.A., Gabrilove, J., Gillio, A.P., Potter, G.K., 1987; Begley, Metcalf y Nicola, 1988; Clark y Kamen, 1987; Ulich, Del castillo y Souza, 1988; Berdel, Danhauser-Riedl, Steinhasuer y Winton, 1989; Morstyn, Lieschke y Cebon, 1989).

Esta investigación se orientó al estudio de una posible transferencia del efecto inmunoestimulante del FECG a la solución de glucosa al 1% bajo el paradigma de condicionamiento clásico.

MÉTODO

Sujetos

Se trabajó con 32 ratas *Rattus norvegicus* -wistar-, machos, adultos, con pesos entre 220 y 250 gramos, adquiridos en el Bioterio central de la Universidad Nacional de Colombia. Los animales fueron habituados durante 10 días a ciclos de luz - oscuridad de 12 horas (comenzando con luz a las 6 am) y a una temperatura de 23 ± 1 °C.

Técnicas e Instrumentos

Inmovilizador de ratas para la toma de muestras de sangre en la cola. Este instrumento fue diseñado en el laboratorio, se trata de un tubo plástico con una ventana transparente en el centro para observar al animal, un émbolo en uno de los extremos del tubo que permite restringir el movimiento sin importar el tamaño del animal y una compuerta en el otro extremo del tubo que facilita el acceso a la cola para la extracción de la sangre. Como toda restricción física genera estrés y dependiendo de su duración alteraciones en el sistema inmune, los animales fueron habituados al inmovilizador, mediante un programa de refuerzo de razón fija e intervalo variable 1.

Toma de muestras sanguíneas. Después de inmovilizado el animal, se frota la cola con xilol para lograr vasodilatación de la vena caudal, un minuto más tarde se presiona la parte proximal de la cola con el fin de generar congestión venosa. Pasados dos minutos se procede a extraer aproximadamente 0.005 ml de sangre.

Técnica de Wright. La tinción de Wright es una mezcla de eosina (colorante ácido) y azul de metileno (colorante básico), los cuales son compuestos sensibles a las variaciones del pH en diferentes estructuras celu-

lares, lo cual permite que las estructuras de carácter básico fijen principalmente la eosina y las que tienen carácter ácido fijen el azul de metileno. Esto explica por qué ciertas estructuras basófilas presentes en el núcleo (nucleolos) o en el citoplasma (ribosomas) se tiñen de color azul, mientras que otros componentes acidófilos como la hemoglobina adquieren un color rosado. Igualmente, las diferencias en la afinidad de ciertas granulaciones citoplasmáticas hacia dichos colorantes permite clasificar los leucocitos polimorfo-nucleares en tres grandes grupos: a) Granulocitos eosinófilos, en los que la granulación específica contiene compuestos predominantemente básicos que fijan los colorantes ácidos, por lo tanto se tiñen de color rojo. b) Granulocitos basófilos, en los que las granulaciones específicas poseen compuestos de fuerte carácter ácido como la heparina y sus derivados, por lo tanto fijan los colorantes básicos como el azul de metileno dando una apariencia azul oscura. c) Granulocitos neutrófilos, en los que las granulaciones poseen compuestos de carácter neutro por lo cual fijan ambos colorantes dando una tonalidad parda. El extendido de sangre se analiza a través de un microscopio óptico con el fin de hacer un recuento diferencial a 100 células obteniendo la distribución porcentual de cada una de las poblaciones celulares (Vives y Aguilar, 1997).

Diseño

Se utilizó un diseño intrasujeto con grupo de control; intrasujeto en tanto que los mismos sujetos fueron expuestos a diferentes variables independientes: disminución del tiempo de bebida, ingesta de solución de glucosa al 1%, administración de filgrastim 20 mg/k y emparejamiento o

condicionamiento clásico de estímulos. Y con grupo de control por cuanto la variable dependiente, recuento de neutrófilos en sangre, no solo se comparó longitudinalmente en el grupo experimental, sino transversalmente en toda la muestra bajo las diferentes condiciones experimentales.

Procedimiento

Todos los animales fueron habituados a las condiciones del módulo experimental durante 10 días y al inmovilizador para el muestreo de sangre. De igual forma, después de cada muestreo de sangre los animales se sometían a períodos de rehabilitación al inmovilizador durante al menos una semana. Los 32 animales se dividieron en 4 grupos al azar: 2 grupos controles y 2 experimentales de 8 animales cada uno.

Para evaluar si la reducción del tiempo de bebida a 15 minutos diarios altera el recuento de neutrófilos en sangre, al grupo experimental uno (GE1) se le redujo progresivamente durante 24 días el periodo de bebida hasta llegar a 15 minutos diarios; no se trata de privación de agua ya que las ratas bebieron durante los 15 minutos en promedio 28 ml, valor que se encuentra en el rango de la bebida diaria de animales *at libitum* (Marad y Rosenkranz, 1990). En el día 25 se tomaron las primeras muestras de sangre en los grupos control uno (GC1) y GE1.

Para saber si el consumo de solución de glucosa al 1% durante 15 minutos diarios genera alteraciones en el recuento de neutrófilos, al GC1 se le redujo el tiempo de bebida a 15 minutos y 24 horas después se tomaron las segundas muestras de sangre.

Para conocer el recuento de neutrófilos de las ratas inyectadas con FECG, al GE1 se le suministró, por vía intraperitoneal (IP), una dosis de 20 mg/K de filgrastim en 0.33

ml de dextrosa al 5%, y al GC1 se le aplicó inyección intraperitoneal de 0.33 ml de solución salina. Esta última inyección evita la contaminación de los resultados ya que el pinchazo podría condicionarse con el efecto de la droga; esto es, que cada vez que la rata sea inyectada se genere un incremento de neutrófilos. 24 horas después de la aplicación del fármaco se tomaron las terceras muestras de sangre. Las 24 horas obedecen a que, según los protocolos del medicamento, este es el momento que se produce el pico máximo en el recuento de neutrófilos.

Para comprobar si el efecto inmunoestimulante del filgrastim, o estímulo incondicionado (EI), puede transferirse a la solución de glucosa al 1%, o estímulo condicionado (EC), cuando ambos estímulos son emparejados clásicamente, al grupo GE1 se le suministró solución de glucosa al 1% durante 15 minutos y después de media hora se les aplicó una dosis de filgrastim 20 mg/K en 0.33 ml de dextrosa al 5% IP. Posteriormente, al GC1 después de beber solución de glucosa al 1% durante 15 minutos, y pasada media hora, se les aplicó una inyección IP de 0.33 ml de solución salina. El condicionamiento se comprobó 4 días después, suministrando glucosa al 1% durante 15 minutos a los dos grupos y extrayendo muestras de sangre 24 horas más tarde.

Para comprobar si el efecto inmunoestimulante del filgrastim (EI) puede transferirse a la solución glucosa al 1% (EC) cuando ambos estímulos son emparejados en dos ensayos separados 24 horas, al grupo experimental dos (GE2) se le suministró solución de glucosa al 1% durante 15 minutos y después de media hora se les aplicó una dosis de filgrastim 20 mg/K en 0.33 ml de dextrosa

al 5% IP. Este procedimiento se repitió pasadas 24 horas. Con el GC2 se utilizaron inyecciones intraperitoneales de 0.33 ml de solución salina. A los 4 días, período en el cual ya se ha regresado a la línea de base en el nivel de neutrófilos, a los dos grupos se les suministró solución de glucosa al 1% durante 15 minutos y 24 horas después se tomaron las últimas muestras de sangre.

RESULTADOS

Para hallar el tamaño de la diferencias entre los niveles medios de neutrófilos entre cada pareja de muestras sanguíneas, acorde con el procedimiento resumido en la siguiente tabla, se utilizó la prueba *t* de student.

GE2: post- emparejamiento doble de filgrastim y glucosa al 1%					
GE1: post- emparejamiento sencillo de filgrastim y glucosa al 1%					
GE1: Inyección—20 µg/k IP de filgrastim					
GE1: Disponibilidad de solución de glucosa al 1% durante 15 min/día					
GE1: 15 minutos de disponibilidad de agua al día					
	Versus	Versus	Versus	Versus	Versus
GC1: Agua <i>at limitum</i>	$t= 0.72$ $p= 0.483$				
GC1: 15 minutos de disponibilidad de agua al día		$t= 0.26$ $p= 0.79$			
GC1: Inyección de solución salina 0.33 mL IP			$t= 5.6$ $p= 0.001$		
GC1: post- emparejamiento sencillo de solución salina y glucosa al 1%				$t= 0.27$ $p= 0.78$	
GC2: post- emparejamiento doble de solución salina y glucosa al 1%					$t= 0.88$ $p= 0.39$

GC1: Grupo control 1

GC2: Grupo control 2

GE1: Grupo Experimental 1

GE2: Grupo Experimental 2

La Figura 1. muestra el recuento de neutrófilos del grupo experimental y control frente a las variables que podrían haber influido en el condicionamiento. En la Figura 2 se observa cómo uno o dos empare-

jamientos entre el factor estimulante de colonias granulocíticas y la solución de glucosa no permite establecer un condicionamiento clásico inmunoestimulantes entre las dos sustancias.

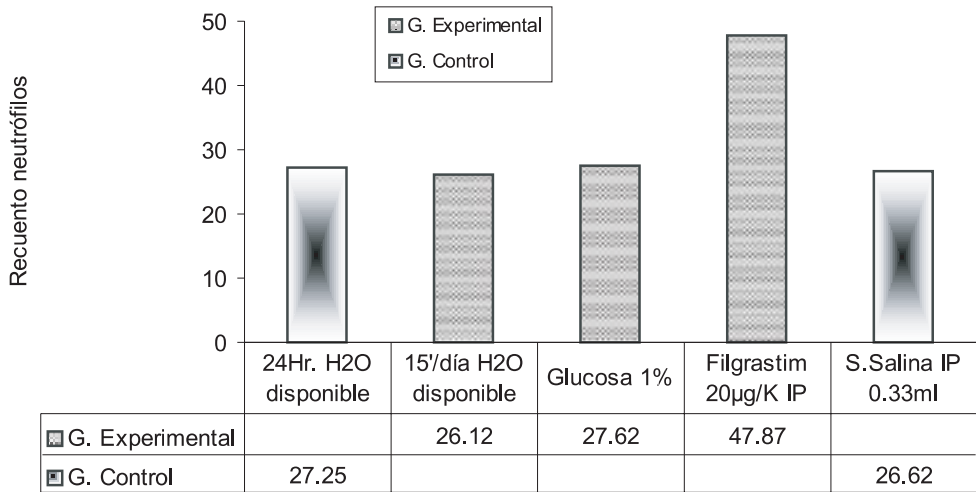


Figura 1. Recuento de neutrófilos en los grupos experimental y control durante cada una de las condiciones de control.

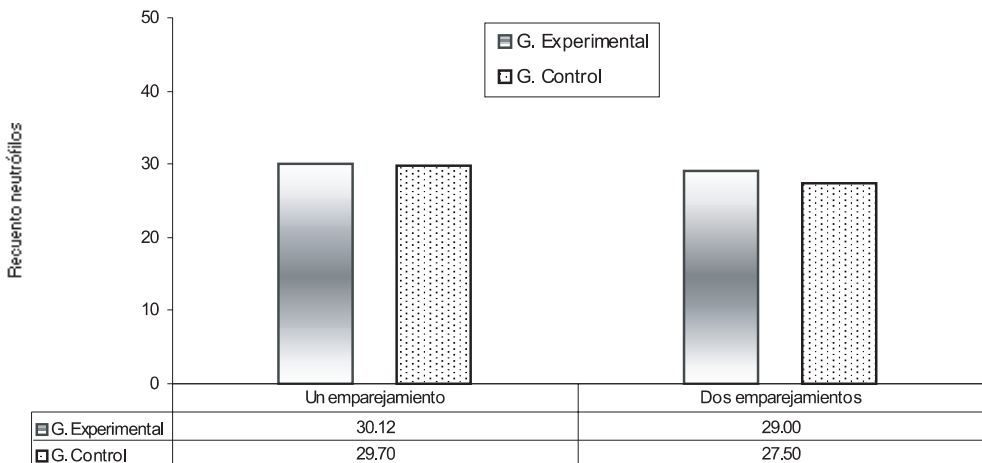


Figura 2. Recuento de neutrófilos como efecto del supuesto estímulo condicionado luego de uno y dos emparejamientos.

DISCUSIÓN

En el proceso de inmunosupresión condicionada, un estímulo neutro para el sistema inmune, pasa a ser reconocido como aversivo (inmunosupresor) después de emparejarse clásicamente con un estímulo que por su naturaleza disminuye la respuesta inmune. Luego, si el condicionamiento clásico se da independientemente de las propiedades del estímulo; entonces, una sustancia que por su composición incrementa o potencia la respuesta inmunitaria, podría transferir sus propiedades a un estímulo neutro. Este último fue el razonamiento que motivó el tema central del presente trabajo.

Teóricamente el paradigma de la inmunosupresión condicionada, descrito en la introducción, conlleva tanto escepticismo como el que, en su época, produjo Pavlov con la salivación condicionada y, es que para el lector desprevenido la conclusión resulta sencilla y un tanto inválida; si el condicionamiento funciona con un estímulo inmunológicamente inactivo, cualquier tipo de evento que sea capaz de activar el organismo se podría volver inmunológicamente reactivo al activar los sistemas sensoriales mientras un inmunosupresor hace su efecto. Algo como que los colores de la habitación donde se recibe la droga inmunosupresora, serían capaces a posteriori, de generar la misma respuesta de la droga. En principio esto puede ser así, máxime cuando se busca apoyo en las descripciones clínicas de humanos que, por ejemplo condicionan un olor con los síntomas que les produce el tratamiento de quimioterapia. Sin embargo, experimentalmente no está del todo comprobado, y resulta aún más alejada la aceptación científica al no existir una aproximación explicativa a nivel celular o molecu-

lar. Aunque revisando la historia, la descripción del condicionamiento clásico que realizó Pavlov y que lleva cien años provocando líneas de investigación y muchas publicaciones, está lejos de ser explicada en términos moleculares, a pesar de los ingentes esfuerzos que han producido evidencias claras, por lo menos en organismos simples como la *Aplysia* y *Hermisenda*.

Otro elemento metodológicamente controvertible, son las magnitudes de los estímulos; cada vez que se intenta verificar un condicionamiento inmunológico de una nueva sustancia, se deben establecer las medidas eficaces; esto es, la dosis que produce el mayor efecto en la respuesta condicionada, hecho que no resulta simple cuando se piensa que por cada unidad en que se incrementa el número de ensayos de una variable como el emparejamiento, se debe realizar un experimento. En ese sentido el estudio resulta metodológicamente exploratorio a pesar de existir manipulación de variables por parte del experimentador.

Los datos obtenidos corresponden a un estudio experimental, que pese al control impuesto por el diseño, resultan exploratorios en tanto que solo muestran si se da o no un fenómeno como la inmuoestimulación condicionada en las condiciones experimentales dadas, esto es: a) utilizando una dosis de 20 mg/K de filgrastim cuyos efectos en ratas fueron debidamente estudiados y que en la figura 1 muestra un incremento significativo ($p = 0.001$) en el recuento de neutrófilos; b) una solución de glucosa al 1% considerada como estímulo neutro ya que al ser bebida por las ratas, aún durante 15 minutos diarios, no produjo ninguna alteración en el recuento de neutrófilos (véase Figura 1); c) realizar uno y dos emparejamientos entre estímulos

neutro e incondicionado. La inmunosupresión condicionada se obtuvo con un solo emparejamiento por eso en el primer experimento se trabajó con un solo ensayo y luego se llevaron a cabo dos asociaciones de estímulos, siempre con resultados que no apoyaron la hipótesis nula como se muestra en los resultados (véase Figura 2).

En conclusión, estos resultados están en consonancia con las afirmaciones de Ader, R., Felten, D. & Cohen, N. (1991) frente a los hallazgos de Solvason, B. y Cols (1988) en cuanto a que no hay suficiente evidencia experimental que demuestre el fenómeno de inmunostimulación condicionada.

Algunos puntos importantes para tener en cuenta junto con afirmaciones tan generales, como que la inmunostimulación no se produce bajo el paradigma de condicionamiento clásico, son: a) La elección del tipo de estímulo incondicionado, esto por cuanto existe un sin número de fármacos cuyo efecto puede implicar una respuesta muy gruesa como en el caso de la inmunología celular o respuestas humorales que exigen condiciones especiales de laboratorio para poderseles controlar como respuestas condicionadas. b) La validez y la confiabilidad del método de medida utilizado para cuantificar la respuesta inmune. En el caso del recuento de células se debe validar la eficacia del experto que hace el conteo y con ello la confiabilidad de los extendidos de sangre. Se pueden hacer extendidos del mismo animal, y más exactamente de la misma muestra; de tal forma que pueda comprobarse su experticia. También se podría trabajar con jueces; esto es, pasando placas de la misma muestra por el conteo de diferentes técnicos. c) Las características del emparejamiento, específicamente del tiempo que tarda la presentación de los estí-

mulos neutro e incondicionado y el tiempo entre estímulos. d) El tipo de diseño experimental. Son llamativos para el trabajo con respuestas inmunotemporales los diseños intrasujeto en donde cada animal es control de si mismo; no obstante, es indispensable tener en cuenta el hecho del muestreo, ya que la inmovilización y la extracción de sangre, venga del seno cavernoso o de las venas de la cola, implican respuestas de estrés y de inflamación. e) Un último aspecto tiene que ver con las características onto y filogenéticas de la especie en la que se trabaja. Son pocos los estudios que presentan resultados en torno al papel del ambiente sobre la estructuración de competencias por parte del sistema inmune. Pareciera ser que se hace a un lado la propiedad mnesica, que como el sistema nervioso, tiene el sistema inmunológico y que por lo tanto permite se le puede potenciar o debilitar dependiendo del tipo de relación que se establezca con su entorno. ¿Qué tipo de relación es la óptima? es una pregunta que hace turno en los laboratorios de psiconeuroinmunología. Al final, como en muchos casos, se tienen más preguntas e inquietudes que respuestas contundentes. Parece ser la dinámica epistemológica que rige las áreas del conocimiento nacientes y sin modelos de trabajo estandarizados como el de la psiconeuroinmunología.

REFERENCIAS

- Abbas, A., Lichtman, A. & Pober, J. (1995). *Inmunología celular y molecular* (2a. Ed.). España: Interamericana.
- Ader, R. & Cohen, N. (1982). Behaviorally conditioned immunosuppression and systemic lupus erythematosus. *Science*, 215, 1534-1536.
- Ader, R., & Cohen, N. (1993). Psychoneuroimmunology: conditioning and stress. *Annual Review of Psychology*, 44, 53-85.

- Ader, R., Cohen, N., & Felten, D. (1995). Psychoneuroimmunology: Interaction between the nervous system and the immune system. *The Lancet*, 345, 99-103.
- Ader, R., Felten, D. & Cohen, N. (1991). *Psychoneuroimmunology* (2a. Ed.). New York: Academic press.
- Begley, C., Metcalf, D. & Nicola, N. (1988). Binding characteristics and proliferative action of purified G-CSF on normal and leukaemic human promyelocytes. *Exp. Hematol.*, 16, 71-79.
- Berdel, W., Danhauser-Riedl, S., Steinhasuer, G. & Winton, E. (1989). Various human hematopoietic growth factors stimulate clonal growth of non-hematopoietic tumor cells. *Blood*, 73, 80-83.
- Black, P. (1995). Psychoneuroimmunology: brain and immunity. *Cientific American Science & Medicine*, 16-25.
- Blalock, J. (1994). The syntax of immune- neuroendocrine communication. *Immunology Today*, 15, 504-510.
- Borras, X. (1994). Condicionamiento clásico de las respuestas inmunológicas. *Revista de Psicología General y Aplicada*. 47, 429-439.
- Chrusos, G. (1995). Seminars in medicine of the beth Israel, hospital, Boston: The hipotalamic-pituitary-adrenal axis and immunogy- inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 322, 1352-1359.
- Clark, S. & Kamen, R. (1987). The human hematopoietic colony stimulating factors. *Science*. 236, 1229-1237.
- Dexter, T. & Spooncer, E. (1987). Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3, 473-4841.
- Donahue, R., Wang, E., Stone, D., Kamen, R. & Wong, G. (1986). Stimulation of hematopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF. *Nature*, 321, 872.
- Goodkin, K., Fletcher, M., & Cohen, N. (1995). Clinical aspects of psychoneuroimmunology. *The Lancet*, 345, 183-184.
- Hardman, J., Limbird, L. & Goodman, A. (1996). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (9ª. Ed.) México: McGraw-Hill Interamericana.
- Klosterhalfen, W. & Klosterhalfen, S. (1983). Pavlovian conditioning of immunosuppression modifies adjunct arthritis in rats. *Behavioral Neuroscience*, 97, 663-666.
- Maier, S., Watkins, M., & Fleshner, M. (1994). *Psichoneuroimmunology: The interface between behavior, brain, and immunity*. *American psychologist*, 49, 1004-1017.
- Marad, A. & Rosenkranz, A. (1990). Guía para el uso de animales de laboratorio. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias, Departamento de Farmacia.
- Morstyn, G., Lieschke, G. & Cebon, J. (1989). Pharmacology of the colony-stimulating factors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 10, 154-159.
- Nicola, N., Metcalf, D., Matsumoto, M. & Johnson, G. (1983). Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony stimulating factor. *J. Biol. Chem.* 285, 9017-9023.
- Reichlin, S. (1993). Neuroendocrine-immune interactions. *The New England Journal of Medicine*, 329, 1216-1253.
- Savino, W., & Dardenne, M. (1995). Immune-neuroendocrine interactions. *Immunology Today*, 16, 318-321.
- Solvason, B., Ghanta, V. & Hiramoto, R. (1988). Conditioned augmentation of natural killer cell activity. Independence from nociceptive effects and dependence on interferon-beta. *J Immunol.* 15, 140, 661-665.
- Souza, L., Boone, T. & Gabilove, J. (1986). Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*; 232, 61-65.
- Stites, D. & Terr, A. (1993). *Inmunología básica y clínica* (7a. Ed.). Mexico: Manual Moderno.
- Ulich, T., Del Castillo, J. & Souza, L.M. (1988). Kinetics and mechanisms of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-induced neutrophilia. *American Journal of Pathol*, 133, 630-638.
- Vives, J., & Aguilar, J. (1997). *Manual de técnicas de Laboratorio en hematología*. (2 Ed) Barcelona: Masson SA.
- Welte, K., Bonilla, M., Gabilove, J., Gillio, A. & Potter, G. (1987). Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in vitro an in vivo effects on myelopoiesis. *Blood*, 13, 17-30.

Recibido, junio 30/2003

Revisión recibida, julio 17/2003

Aceptado, julio 30/2003