

Trabajos Originales

# *Efecto de la cocaína y las catecolaminas sobre la quimiotaxis y la quimioluminiscencia de neutrófilos humanos in vitro*

Ruth Valbuena, Pablo Patiño, Abel Díaz, Claudia Alzate, Claudia Forero, Mauricio Rojas, Verónica Lopera, María Toro

El objetivo fue determinar el efecto de la cocaína sola y mezclada con catecolaminas sobre la quimiotaxis y la explosión metabólica de los neutrófilos humanos y evaluar si la cocaína se une a estas células.

La quimiotaxis se realizó en un gel de agarosa utilizando el péptido quimiotáctico FMLP. La explosión respiratoria se determinó mediante la cuantificación de fotones

(quimioluminiscencia) emitidos por las células activadas con PMA. Para cada prueba, las células se expusieron a concentraciones de cocaína de 1 a 1.000 µg/mL y de catecolaminas 0.001 y 0.01 µg/mL y luego a la mezcla de 1.000 µg/mL de cocaína con 0.001 µg/mL de catecolamina. La unión de la cocaína a las células se evaluó mediante un ensayo de competición, con cocaína tritiada 10 nM y cocaína no radioactiva 500 µM.

Los resultados no mostraron efecto de la cocaína sobre la

quimiotaxis, pero sí aumento estadísticamente significativo ( $p=0.004$ ), de la quimioluminiscencia de los neutrófilos tratados con 1.000 µg/mL de cocaína. Los valores de quimioluminiscencia sin cocaína fueron  $1.2 \times 10^6 \pm 6 \times 10^4$  cuentas por minuto (cpm) y con cocaína  $1.7 \times 10^6 \pm 1 \times 10^5$  cpm. Las catecolaminas no modificaron los resultados obtenidos con la cocaína sola. La unión de la cocaína tritiada a los neutrófilos tuvo un valor de  $3.893 \pm 343$  cpm, que disminuyó significativamente a  $301 \pm 124$  cpm en el ensayo de competición ( $p=0.008$ ).

Se demostró un incremento en la actividad metabólica de los neutrófilos inducido por la cocaína, al parecer por su unión a estas células. Estos resultados no son extrapolables a la clínica; sin embargo, el aumento de quimioluminiscencia debe ser tenido en cuenta, puesto que la exposición recurrente a la cocaína podría eventualmente conducir al mismo efecto.

## Introducción

La cocaína es una droga de la cual se abusa frecuentemente en nuestro país (1). Es un estimulante del sistema nervioso central y clínicamente se ha asociado con toxicidad cardiovascular, accidentes cerebrovasculares, problemas pulmonares y complicaciones obstétricas (2).

Se ha investigado, principalmente en animales, el efecto que tanto *in vivo* como *in vitro*, puede tener sobre el sistema inmunológico y se ha encontrado que *in vitro* disminuye la respuesta proliferativa de células mononucleares murinas y humanas, estimuladas con mitógenos (3), al igual que afecta la producción de citoquinas por parte de células esplénicas murinas expuestas *in vivo* e *in vitro* a la droga (4-6). También influye en el fun-

Dra. Ruth Myriam Valbuena S: Investigadora Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Santa Fe de Bogotá; Dres. Pablo Javier Patiño G, María Fabiola Toro C: Profesores Departamento de Microbiología y Parasitología; Dr. Abel Díaz C: Profesor. Centro de Investigaciones Médicas; Dr. Mauricio Rojas L: Estudiante Doctorado, Laboratorio Central de Investigaciones; Dras. Claudia Forero S, Claudia Patricia Alzate C. Verónica Lopera V: Auxiliares de Investigación, Centro de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

cionamiento de los neutrófilos humanos inhibiendo la agregación, la producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ), la liberación de enzimas lisosomales y la expresión de receptores para el complemento en estas células *in vitro* (7). Igualmente, los neutrófilos provenientes de individuos consumidores de basuco, cuyo componente psicoactivo es la cocaína, presentan disminución de la producción de  $O_2^-$  (García de OD y cols., no publicado). Al contrario de lo observado en neutrófilos, otras células fagocíticas, como los macrófagos peritoneales y alveolares de ratones tratados intraperitonealmente con cocaína, muestran aumento de la actividad metabólica, que se detecta por el aumento de la liberación de energía fotónica (quimioluminiscencia) (8). La cocaína administrada a voluntarios humanos incrementa además la actividad de las células asesinas naturales (NK) (9); este hallazgo ha sido atribuido a un efecto indirecto de la droga, mediado a través de catecolaminas, las cuales se incrementan extracelularmente, por acción central de la cocaína (10). Estos neurotransmisores afectan también el funcionamiento del sistema inmunológico, así: la administración de adrenalina o noradrenalina en humanos *in vivo* aumenta la actividad NK (11,12), la adrenalina además, *in vitro*, afecta la proliferación de células MN (13), disminuye la quimiotaxis (QT), la QL y la producción de  $O_2^-$  de los neutrófilos (14, 15).

De esta manera la cocaína puede afectar la respuesta inmune directa e indirectamente, éste último, a través de mediadores neuroendocrinos. El mecanismo de acción directo sobre las células

inmunológicas aún no se ha establecido; aunque existen algunas hipótesis de una actividad como anestésico local (7). El efecto directo *in vivo* es discutido debido a la vida media tan corta que tiene en circulación (30 a 60 minutos) (10); pero en un consumidor crónico, es posible que las células inmunes estén permanentemente expuestas tanto a la cocaína como a las catecolaminas y a otros neuromediadores.

El objetivo de esta investigación fue, en primer lugar, determinar si la cocaína tiene efectos sobre los polimorfonucleares (PMN) humanos *in vitro* y, en segundo lugar, hacer una aproximación a sus mecanismos de acción sobre estas células, para ello se determinó primero la capacidad de unión de la droga a las células y luego, el efecto que pudieran tener las catecolaminas sobre la acción de la cocaína en la migración dirigida y la explosión respiratoria.

#### Material y método

##### *Preparación de las células*

Las células PMN y mononucleares (MN) fueron obtenidas de sangre venosa heparinizada de individuos adultos sanos, de ambos sexos, utilizando un gradiente de densidad, histopaque (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), previa sedimentación de los eritrocitos con dextrán 70 al 6% (ICN, Biomedicals, Ohio, USA) para purificar los PMN (16,17). La viabilidad y la pureza de las células se determinaron mediante la exclusión del azul de tripano (Gibco Laboratories, Life Technologies, NY, USA) y la coloración con violeta de genciana (VDH Chemical, Poole, England), respectivamente, las cuales estuvieron siempre por encima de 95%. La viabili-

dad celular no se afectó por el tratamiento con las diferentes drogas. Todos los ensayos se hicieron con concentraciones de cocaína de 1, 10, 50, 100, 500, 1.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y con concentraciones de noradrenalina y adrenalina de 0.001 y 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las mezclas de drogas se hicieron con 1.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cocaína y 0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de catecolaminas.

##### *Estudios de la quimiotaxis de los PMN*

Para los estudios de quimiotaxis (QT) se empleó una modificación de la técnica descrita por Nelson y col. (18), en un medio de soporte de agarosa, utilizando como agente quimiotáctico el péptido sintético formil metionil leucil fenilalanina (FMLP) (Sigma) a una concentración de  $4,5 \times 10^{-8}$  M.

Las células ( $5 \times 10^5$ ) resuspendidas en solución de Hanks (Gibco) en presencia y ausencia de cocaína (Merck Darmstadt, Germany) y de catecolaminas (Sigma) fueron expuestas al factor quimiotáctico en un medio de agarosa (Sigma) por 2.5 horas, a 37°C. Después se fijaron con glutaraldehído (Sigma) al 2.5% en solución tampón de fosfatos (PBS) (Gibco) y se colorearon con Wright (Sigma). En un microscopio de luz (Olympus) al cual se adaptó un ocular calibrado en unidades (unidad = 0.1 mm) se realizó la lectura de la migración espontánea y dirigida de las células. La diferencia de estos dos valores correspondió al diferencial quimiotáctico.

##### *Estudio de la quimioluminiscencia de los neutrófilos*

La QL fue evaluada de acuerdo con una modificación del método de De Dechatelet y Shirley

(19). Los PMN a una concentración de  $1 \times 10^5$  células resuspendidos en PBS fueron tratados con acetato de forbol miristato (PMA) (Sigma)  $0.1 \mu\text{g/mL}$ , luminol  $0.2 \mu\text{g/mL}$ , simultáneamente con y sin las drogas en estudio. Después de 10 minutos a temperatura ambiente se cuantificó la liberación de energía fotónica en un contador de centelleo beta (Beckman, Fullerton, CA, USA), que tenía incorporada una tarjeta de QL (Single Monitor photon).

#### *Unión de cocaína tritida a las células PMN y MN*

Se empleó una modificación de la técnica presentada por Bennet y col (20) para el estudio de receptores de IL-2 en linfocitos T. En tubos de microcentrifuga (Robbins Scientific Corp., Sunnyvale, CA, USA), se mezclaron  $20 \times 10^6$  células/mL con cocaína - $\text{H}^3$  (New England Nuclear Corporation, Boston, MA, USA)  $10 \text{ nM}$  en presencia y ausencia de un exceso de cocaína sin tritiar ( $500 \mu\text{M}$ ) /  $3 \text{U min}/4^\circ\text{C}$ , se centrifugaron luego a  $4.000 \text{ rpm}/2 \text{ min}$ , se recortaron los tubos a la altura del botón celular, se colocaron en viales de centelleo, se adicionó coctel (PPO, POPOP y tolueno, Merck) conteniendo 20% de tritón X-100 (Sigma) y se realizó la lectura en el contador de centelleo beta. En experimentos previos se definieron las condiciones óptimas del ensayo: la concentración de células, la dosis de cocaína tritida, la dosis de cocaína fría, la temperatura y el tiempo de incubación.

#### *Análisis estadístico*

Para el análisis de los datos de quimiotaxis y quimioluminis-

encia se trabajó con el promedio de 10 repeticiones, correspondientes a 10 individuos diferentes. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante análisis de varianza de una vía para la QT y mediante la t de Student para la QL. Los experimentos de unión de la cocaína a las células PMN y MN se realizaron por triplicado y para el análisis estadístico se empleó un método no paramérico, la prueba de Mann Whitney. Se utilizó el programa Statgraphics, versión 5.0 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, Maryland, USA).

### **Resultados**

#### *Efecto de la cocaína y las catecolaminas sobre la QT y la explosión respiratoria de los PMN*

En vista de que la cocaína ejerce un efecto inhibitorio *in vitro* sobre la agregación y la producción de anión superóxido por los PMNs humanos (7), se evaluó la migración dirigida y la explosión respiratoria de estas células en presencia de cocaína con y sin noradrenalina y adrenalina, dado que *in vivo* éstas se aumentan a nivel circulante por acción de la cocaína (10). En primer lugar se evaluaron ambas respuestas en presencia de diferentes concentraciones de cocaína (1, 10, 50, 100, 500 y  $1.000 \mu\text{g/mL}$ ) y en presencia de dos concentraciones de catecolaminas (0.001,  $0.01 \mu\text{g/mL}$ ). En vista de que estas últimas no produjeron ningún efecto sobre la QT y la QL de los PMN en las concentraciones usadas (no mostrado), se escogió para la mezcla de cocaína y catecolaminas, la concentración de adrenalina y noradrenalina de  $0.001 \mu\text{g/mL}$ ,

de acuerdo con dosis farmacológicas reportadas para noradrenalina y adrenalina en algunas patologías (21). La QT no se afectó por la cocaína en ninguna de las concentraciones ensayadas (no mostrado), ni en la dosis de  $1.000 \mu\text{g/mL}$  mezclada con  $0.001 \mu\text{g/mL}$  de cada una de las catecolaminas (Tabla 1); sin embargo, la QL se incrementó significativamente con cocaína a  $1.000 \mu\text{g/mL}$  con valores de  $1,7 \times 10^6 \pm 1 \times 10^5 \text{ cpm}$  comparado al control sin cocaína  $1,2 \times 10^6 + 6 \times 10^4 \text{ cpm}$  ( $p=0.004$ ) (Figura 1); las concentraciones de cocaína menores de  $1.000 \mu\text{g/mL}$  no produjeron ningún efecto en la QL de los PMN (no mostrado). La mezcla de cocaína con noradrenalina o adrenalina dio resultados similares a la cocaína sola (Figura 1).

#### *Unión de la cocaína a células PMN y MN humanas*

Para probar que la cocaína tiene un efecto directo sobre las células estudiadas, se determinó la unión de cocaína tritida a PMN y MN en presencia o no de un exceso de cocaína fría ( $500 \mu\text{M}$ ). Se encontró una mayor unión de la cocaína a los PMN comparado con los MN con valores de  $3893 \pm 343 \text{ cpm}$  y  $600 \pm 159 \text{ cpm}$ , respectivamente ( $p = 0.027$ ). La unión parece ser específica en los PMN ya que se inhibió con un exceso de cocaína no tritida dando un valor de  $301 \pm 124 \text{ cpm}$  ( $p = 0.008$ ) (Figura 2).

### **Discusión**

Los resultados de esta investigación mostraron un aumento de la explosión respiratoria de los PMN humanos expuestos *in vitro* a la cocaína, en la concentración de

1.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Un hallazgo similar fue obtenido por Vaz A y col (8) en macrófagos peritoneales y alveolares de ratones inoculados intraperitonealmente con concentraciones de cocaína de 5 y 10 mg/kg de peso.

Aparentemente, la cocaína es un estímulo para la liberación de radicales de oxígeno por parte de las células fagocíticas, tanto PMN como MN; sin embargo, en un estudio similar al nuestro, realizado por Haines KA y col (7), se mostró una disminución en la producción de anión superóxido en neutrófilos humanos tratados con una concentración de cocaína 5 mM y una inhibición completa, con una concentración de 10 mM. Los estudios de estos autores no son comparables con el nuestro dado que utilizaron un estímulo diferente para desencadenar la explosión respiratoria (el péptido FMLP) y concentraciones mayores de la droga. No podría descartarse la posibilidad de que existan otras vías metabólicas generadoras de QL, como la de las prostaglandinas, en la cual pudiera actuar la cocaína. Se sabe que durante la reducción de PgG2 a PgH2 se produce una reacción de dismutación con generación de oxígeno simple, lo cual se refleja en un aumento en la emisión de fotones (22). Otra posibilidad sería la participación de la cocaína en la producción de una QL, independiente de  $\text{O}_2$ , como en el caso de la estimulación de los neutrófilos con el virus de influenza (23).

Aunque no sería válido extrapolar los hallazgos de este trabajo al individuo adicto intoxicado en forma aguda, debido a que la concentración utilizada *in vitro* fue 1.000 veces superior a

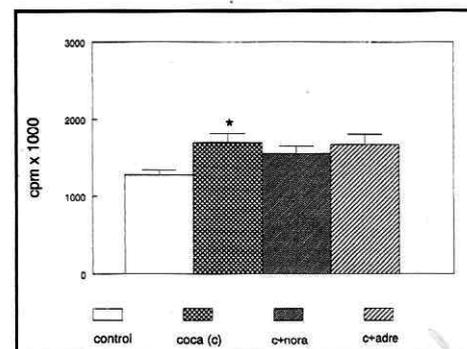
la dosis farmacológica, sería interesante investigar el efecto del consumo de cocaína a largo plazo, sobre la QL de las células fagocíticas, no solamente en neutrófilos sino también en monocitos y macrófagos. Es posible que un aumento en la actividad metabólica de los PMN, inducido por la cocaína *in vivo*, pueda contribuir al daño vascular reportado por algunos investigadores en adictos a esta droga (24) y al daño pulmonar en consumidores de cocaína (2) y adictos al basuco.

El efecto de la cocaína sobre los PMN podría ser directo ya que esta sustancia *in vitro* se unió de manera específica a estas células; contrario a lo que se observó en células MN. En vista de que no se tienen informes sobre la unión de la cocaína a las células linfoides y puesto que en este estudio preliminar no se logró definir el número de sitios de unión por célula, sería interesante continuar este trabajo y definir si los linfocitos T no unen cocaína y si las alteraciones en la respuesta linfoproliferativa (3) se deben más bien a una acción accesorio de las células fagocíticas como los monocitos y los macrófagos.

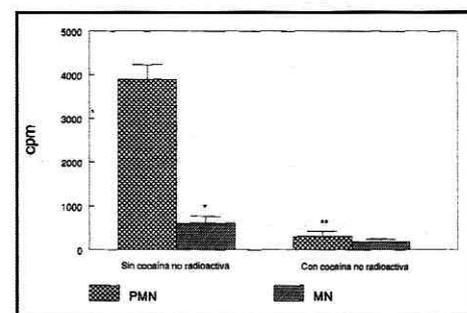
Un efecto *in vivo*, de la cocaína, es el aumento en la actividad de las catecolaminas endógenas, provocado por una inhibición en la recaptación de noradrenalina por el sistema nervioso simpático y por la liberación de catecolaminas de la médula adrenal (25, 26). Estos neurotransmisores se han asociado con el aumento de la actividad de las células NK inducido por la cocaína (9). Por esta razón, se evaluó el efecto, *in vitro*, de la mez-

Tratamiento	Diferencial quimiotáctico (X $\pm$ EE)
Ninguno	6.29 $\pm$ 0.51
Cocaína	6.43 $\pm$ 0.60
Cocaína + Noradrenalina	6.52 $\pm$ 0.45
Cocaína + Adrenalina	6.32 $\pm$ 0.66

**Tabla 1.**  $5 \times 10^5$  PMN en presencia o no de cocaína 1.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sola o mezclada con catecolaminas 0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se colocaron a migrar en un medio de agarosa hacia el factor quimiotáctico FMLP  $4.5 \times 10^{-8}$  M, 2.5 h / 37°C. Se informa el promedio del diferencial quimiotáctico en unidades  $\pm$  error estándar de diez experimentos.



**Figura 1.**  $1 \times 10^6$  PMN fueron estimulados con PMA 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en presencia de cocaína sola o mezclada con catecolaminas en las mismas dosis empleadas en los ensayos de quimiotaxis. Se cuantificó la energía fotónica dependiente del luminol en diez experimentos con y sin cocaína y en diez experimentos con la mezcla de cocaína y catecolaminas. Se presentan las cpm promedio  $\pm$  error estándar. \*  $p = 0.004$ .



**Figura 2.**  $4 \times 10^6$  células PMN o MN fueron expuestas a cocaína tritada 10 nM en presencia o no de cocaína no tritada 500  $\mu\text{M}$  1 h / 4°C. Se cuantificó la radioactividad asociada a las células. Se muestra el promedio  $\pm$  error estándar de tres experimentos para cada tipo celular. \* $p = 0.027$ , \*\* $p = 0.008$ .

cía de cocaína con noradrenalina o adrenalina. Los resultados no mostraron ningún efecto de las catecolaminas solas o mezcladas con cocaína, sobre la QT y la explosión respiratoria de los PMN; aunque existe la posibilidad de que los efectos de la cocaína sean mediados por otro tipo de hormonas neuroendocrinas inducidas por la droga. La administración de cocaína *in vivo* estimula la secreción de ACTH, beta endorfina y prolactina, hormonas con actividad inmunomoduladora (10). No se conocen los efectos de estas sustancias sobre la QL de las células fagocíticas, pero es posible que alguna de ellas, particularmente, la prolactina, esté involucrada, por su actividad proinflamatoria (27).

Todo lo anterior hace pensar que la situación en el individuo adicto es bastante compleja y difícil de reproducir en un modelo *in vitro*, ya que los efectos, *in vivo*, podrían ser la consecuencia de una acción simultánea de un coctel de mediadores neuroendocrinos, conjuntamente con la cocaína.

#### Summary

The two major objectives of this work were first, the determination of the effect of cocaine, alone or in the presence of adrenaline and noradrenaline, on directed migration and on the metabolic burst of human neutrophils and second, determine if cocaine binds to these cells.

Formil-metionil-leucil-phenilalanine (FMLP) was used to direct the migration of neutrophils under agarose and phorbol-miristate-acetate, was the inducing agent used to trigger photon release which was detected by

luminol dependent chemiluminescence. Cells were exposed to increasing doses of cocaine (1-10-100-1.000 µg/mL) in addition to either adrenaline or noradrenaline (0.001-0.01 µg/mL), or the mixture of the three agents in a dose of 1.000 µg/mL of cocaine and 0.001 µg/mL of each of the catecholamines. Binding of cocaine was tested by a competition assay with tritiated (10 nM) and cold (500 µM) cocaine. Only the largest dose of cocaine, 1.000 µg/mL, induced a significant increase on chemiluminescence ( $p=0.004$ ), while catecholamines did not modify the results. The binding of cocaine to neutrophils was significant since the addition of cold cocaine reduced more than tenfold the radioactive reading ( $p=0,008$ ).

We conclude that cocaine does bind human neutrophils and induces an increase metabolic activity. These results although not directly applicable to the human situation where concentrations of cocaine near to 1.000 µg/mL are never reached, may still be clinically important because the continuous use of the drug could add up to the same effect.

#### Agradecimientos

A Colciencias por la financiación del proyecto, a la Universidad de Antioquia por el apoyo para la realización del mismo y al doctor Jorge Ossa por la revisión del manuscrito y la traducción del resumen al idioma inglés.

#### Referencias

1. Posada JA, Torres Y, Calderón H, Rojas MC. Alcoholismo y consumo de sustancias psicoactivas. En: Estudio Nacional de Salud Mental y Consumo de Sustancias Psicoactivas, Colombia 1993. República de Colombia, Ministerio de Salud, Santafé de Bogotá, D.C. 1994: 233- 290.
2. Van Dette JM, Cornish LA. Medical complications of illicit cocaine use. *Clin Pharmacol* 1989; **8**: 401 - 411.
3. Klein TW, Newton CA, Friedman H. Suppression of human and mouse lymphocyte

- proliferation by cocaine. In: Bridge P, et al, eds. Psychological, Neuropsychiatric and Substance Abuse Aspects of AIDS. New York: Raven Press, 1988: 139-143.
4. Watzl B, Chen G, Scuderi P, et al. Cocaine induced suppression of interferon gamma secretion in leukocytes from young and old C57BL/6 mice. *Int J Immunopharmacol* 1992; **14**: 1125- 1131.
5. Wang Y, Huang DS, Watson RR. In vivo and in vitro cocaine modulation on production of cytokines in C57BL/6 mice. *Life Sci* 1994; **54**: 401-411.
6. DiFrancesco P, Marini S, Pica F, et al. In vivo cocaine administration influences lymphocyte production and humoral immune response. *Immunol Res* 1992; **11**: 74-79.
7. Haines KA, Reibman J, Callegari PE, et al. Cocaine and its derivatives blunt neutrophil functions without influencing phosphorylation of a 47 kilodalton component of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *J Immunol* 1990; **144**: 4757-4764.
8. Vaz A, Lefkowitz SS, Lefkowitz DL. Cocaine alters the respiratory burst and phagocytic activity of murine macrophages. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; **69**: 161-166.
9. Van Dyke C, Stessin A, Jones R, et al. Cocaine increases natural killer cell activity. *L Clin Invest* 1986; **77**: 138 7-1390.
10. Watzl B, Watson RR. Immunomodulation by cocaine. A neuroendocrine mediated response. *Life Sci* 1990; **46**: 1319-1329.
11. Tonnesen E, Tonnesen J, Christensen J. Augmentation of cytotoxicity by natural killer (NK) cells after adrenaline administration in man. *Acta Path Microbiol Immunol Scand* 1984; **92**: 81-83.
12. Kraus L, Locke S, Kutz I, et al. Altered natural killer cell activity during norepinephrine infusion in humans. Annu Meeting Am Psychosomatic Soc, New York. 1983.
13. Cray B, Borysenko M, Sutherland DC, et al. Decrease in mitogen responsiveness of mononuclear cells from peripheral blood after epinephrine administration in humans. *J Immunol* 1983; **130**: 691- 697.
14. Davis JM, Albeert JD, Tracy KJ, et al. Increased neutrophil mobilization and decreased Chemotaxis during Cortisol and epinephrine infusions. *J Trauma* 1991; **31**: 725- 731.
15. Bazzoni G, Dejana E, Del Maschio A. Adrenergic modulation of human polymorphonuclear leukocyte activation. Potentiating effect of adenosine. *Blood* 1991; **77**: 2042-2048.
16. Yanai M, Quie P. Chemiluminescence by polymorphonuclear leukocyte adhering to surface. *Infect Immun* 1981; **32**: 1181-1186.
17. Boyum A. Ficoll- Hypaque method for separating mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest (Suppl)* 1986: 77.

18. **Nelson RD, Quie PG, Simmons RL.** Chemotaxis under agarose. A new and simple method for measuring Chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclearleukocytes. *J Immunol* 1975; **115**: 1650- 1656.
19. **De Chatelet LR, Shirley PS.** Chemiluminescence of human neutrophils induced by soluble stimuli. Effect of divalent cations. *Infect Immun* 1982; **35**: 206-212.
20. **Bennet F, Giannotti J, Cark SC, Turner KJ.** Cytokines and their cellular receptors. In: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, et al, eds. *Current Protocols In Immunology*, Current Protocols, N. Y. 1991: 6.1.1 - 6.1.15.
21. **Karlsberg RP, Cryer PE, Roberts R.** Serial plasma catecholamine response early in the course of clinical acute myocardial infarction. Relationship to infarct extent and mortality. *Am Heart J* 1981; **102**: 24-29.
22. **Cadenas E, Sies H, Graf P, et al.** Exited oxygen epecies pyridine nucleotides and calcium transport. *Prostaglandins* 1984; **27(Suppl)**: 3.
23. **Hartshorn K, Kamad A, Tauber A.** Influenza A virus and neutrophil A model of natural immunity. *J Leukocyte Biol* 1990; **47**: 176-186.
24. **Bacharach JM, Colville DS, Lie JT.** Accelerated atherosclerosis, aneurysmal disease and aortitis: Possible pathogenetic association with cocaine abuse. *Int Angiol* 1992; **11**: 83-86.
25. **Rowbotham ML, Jones RT, Benowitz NL, et al.** Trazodone oral cocaine interactions. *Arch Gen Psychiatry* 1984; **41**: 895-899.
26. **Chiueh CC, Kopin IJ.** Centrally mediated release by cocaine of endogenous epinephrine and norepinephrine from the symptoadrenal medullary system of unanesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1978; **205**: 148-154.
27. **Meli R, Gualillo O, Mattace G, DiCarlo R.** Further evidence for the involvement of prolactin in the inflammatory response. *Life Sciences* 1993; **53**: 105-110.