



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE PSICOLOGIA

CONTROL CORTICAL DE LA INMUNOSUPRESION
CONDICIONADA

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL TITULO DE:
LICENCIADO EN PSICOLOGIA

P R E S E N T A:

VICTOR RAMIREZ AMAYA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FEDERICO BERMUDEZ RATTONI
INSTITUTO DE FIOLOGIA CELULAR U.N.A.M.

DIRECTOR DE LA FACULTAD:

DR. JUAN JOSE SANCHEZ SOSA

MEXICO, D. F. **TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1994



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 está 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.

Agradecimientos

Un muy especial agradecimiento al Dr. Federico Bermúdez Rattoni quien hizo posible un espacio para la realización de este trabajo y que con entusiasmo ha seguido el curso del mismo y gracias a su acertada asesoría nos ha permitido obtener los conocimientos necesarios para elaborar el marco conceptual y la metodología de este trabajo. Además un sincero agradecimiento por el apoyo e interés humano que brinda a todos sus alumnos.

Al Dr Ruy Pérez Montfort por su apoyo desde que se propuso esta investigación y por sus acertadas observaciones y aportaciones durante la elaboración de esta.

Al Dr. Ruben Darío Martínez Pérez por haberme guiado con acierto y paciencia en el vasto universo de la inmunología, además, por su valioso trabajo en esta investigación.

A Christopher E. Ormsby como compañero, por su colaboración en el trabajo de investigación y por su entusiasmo en el laboratorio y como amigo por que se que puedo contar contigo.

A todos los maestros de la facultad de psicología, quienes me ayudaron a formar como psicólogo y muy en especial a aquellos maestros como Hector Ayala, Carlos Bruner, María Corsi, Corina Cuevas, Damariz García, Jacobo Grimberg, Francisco Pérez Cota, Dolores Rodríguez, Alfonso Salgado, Victor Uriarte, entre otros, que me enseñaron el valor de la psicología científica.

Al Dr. Victor Manuel Alcaraz Romero quien a través de sus clases de neurofisiología fomentó mi interés en este maravilloso campo del conocimiento y me permitió trabajar con él, introduciendome formalmente en el trabajo de laboratorio, pudiendome así obtener los satisfactores que la investigación ofrece. Además quiero agradecerle las correcciones que le hizo a este trabajo.

A la Mtra Ana Eugenia Díaz de León por su apoyo, amistad y alegría con la que me ha permitido colaborar en sus investigaciones y por el interés que puso en la revisión de este trabajo.

Al Mtro. Raul Ávila Santibañez quien obsesivamente revisó este trabajo e hizo valiosas correcciones y aportaciones al texto de este trabajo. Además por la amistad y honestidad que siempre demuestra.

A mi esposa Erminda Rodríguez quien con el amor, amistad, comprensión y apoyo que siempre me ha dado, me ha entusiasmado a seguir adelante. Además, gracias por las correcciones ortográficas, que por cierto fueron muchas.

A mi Padre el Ing. Victor Ramírez Izquierdo que con su apoyo, enseñanza, cariño y amistad me ha motivado a ser lo que soy.

A mis compañeros de laboratorio, Anita, Benjamín, Elizabeth, Humberto, Maribel, Nicolas y Rolando por que saben ser compañeros, por su sincera amistad y por esas largas e ilustrativas pláticas que siempre amenizan el trabajo de laboratorio.

A mis amigos, Jorge Escandon, Oscar Galicia, Víctor Hernández, Carlos Lang, Hilda Maya, Bruno Raggi y a todos los que me han brindado su compañía y amistad.

A mi Madre y Hermana, que espero algun día podamos todos vivir en paz.

A la DGAPA por el apoyo económico al proyecto de investigación # IN201993 con lo cual se hizo posible este trabajo.

INDICE

RESUMEN	5	
INTRODUCCION	6	
Capítulo I		
La Medicina Psicosomática y el Surgimiento de la Neuroinmunología	6	
Capítulo II		
Esquema General de la Respuesta Inmune	11	
Capítulo III		
La Neuroinmunología	19	
Capítulo IV		
El Condicionamiento Clásico, la Escuela Rusa: Los Primeros Intentos de Condicionamiento de la Respuesta Inmune	28	
Capítulo V		
El Condicionamiento Aversivo a los Sabores y el Condicionamiento Inmunosupresor	35	
Capítulo VI		
La Corteza Insular y su Posible Relación con la Inmunosupresión Condicionada	44	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, DEFINICION DE VARIABLES E HIPOTESIS		50
METODO	52	
PROCEDIMIENTO Y RESULTADOS	55	
DISCUSION	65	
REFERENCIAS	69	

RESUMEN

Recientemente se ha demostrado la posibilidad de modular el sistema inmune a través de técnicas de aprendizaje. Tal es el caso del condicionamiento inmunosupresor (CIS), el cual se obtiene cuando después del apareamiento entre un sabor y una droga inmunosupresora, en una segunda exposición al estímulo gustativo, el animal presenta una atenuación de la respuesta inmune. Por otra parte, se ha demostrado que las lesiones de la corteza insular (CI) impiden la adquisición y retención de diversas tareas de aprendizaje, incluido el condicionamiento aversivo a los sabores. El objetivo del presente trabajo es evaluar los efectos que las lesiones de la CI tienen en el CIS. Con este propósito se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, las cuales fueron asignadas a 5 grupos: un grupo de animales recibió lesiones excitotóxicas en la CI (LxCI) producidas por micro inyecciones bilaterales de N-metil-D-aspartato (NMDA); otro grupo recibió lesiones excitotóxicas, en la corteza parietal (LxCP); el tercer grupo fué sometido al procedimiento de lesión, inyectandole solo el vehículo del NMDA en la CI (ShCI); el cuarto grupo de animales se mantuvo como control intacto (CS) y finalmente el quinto grupo, de animales intactos sirvió como control del condicionamiento (CSO). En el día 13 del protocolo experimental, a todos los animales se les presentó una solución de sacarina en su bebedero, e inmediatamente después, esta se apareó con una inyección ip de ciclofosfamida. El día 33 a todos los animales se les inmunizó con eritrocitos de camero, y 30 min después se les expuso de nuevo a la sacarina, excepto al grupo CSO. Se tomaron muestras de sangre a los 4, 8 y 12 días después de la inmunización y se analizaron con la técnica de hemaglutinación directa. Se realizaron 2 experimentos adicionales con el fin de evaluar los efectos de las lesiones de la CI sobre la respuesta inmune normal y en la inmunosupresión causada por la ciclofosfamida.

Los resultados mostraron que los animales con lesiones en la CI son incapaces de adquirir el CIS. Esto se refleja en el incremento significativo de los títulos de anticuerpos contra eritrocitos en comparación con los controles intactos y con los animales lesionados en corteza parietal, los cuales presentan una reducción significativa de su respuesta inmune. En los experimentos adicionales se observó que las lesiones de CI no afectan la respuesta inmune normal, ni el efecto inmunosupresor de la ciclofosfamida. Estos resultados sugieren que la CI está involucrada en la regulación de la inmunosupresión condicionada.

importante campo de investigación y una herramienta útil para la práctica clínica. Un ejemplo de estas técnicas son los programas de reducción de estrés y los métodos de autocontrol de conductas agresivas. Por otro lado, el descubrimiento de técnicas como la retroalimentación biológica, han dado nuevos rumbos a la investigación médica. En el caso particular de la retroalimentación biológica, hay evidencia de su utilidad para diversos padecimientos, incluyendo el tratamiento de problemas de tensión arterial (Blanchard., 1990; Fahrion, 1991; Wittrock y Blanchard., 1992), migraña (Holroyd y Penzien., 1990), estrés (Guthrie, Sargent, Speelman y Parks., 1990), trastornos en la tensión muscular (Asfour, Khalil, Waly, Goldberg, Rosomoff y Rosomoff., 1990) el control de músculos faciales afectados (Biedermann e Inglis., 1990) etc.

La técnica de retroalimentación biológica, consiste en darle al sujeto información de la actividad dinámica de sus sistemas orgánicos a los que normalmente no tiene acceso consciente. En términos técnicos, se utiliza una unidad de registro de alguna variable orgánica, como la presión arterial o la actividad cardíaca. Esta unidad de registro se conecta con un monitor ya sea auditivo o visual, el cual informa al sujeto de las fluctuaciones que presenta la variable de interés. Por último, mediante instrucciones particulares para cada tratamiento se entrena al individuo a controlar dichas fluctuaciones y mantenerlas en un rango determinado. A esta categoría pertenecen también los procedimientos de condicionamiento de respuestas orgánicas, o mal llamadas autónomas. Este tema se tratará detalladamente en una sección posterior.

En la última categoría descrita por Glass se encuentran los programas de prevención de enfermedades y algunos tipos de estrategias como los métodos de relajación, de asertividad y los programas de estimulación de conductas sanas.

Una observación de importancia que emana de los estudios en medicina psicosomática y que subyace en gran parte a muchas de las investigaciones dentro de este campo, es que en un grupo de individuos expuestos a un mismo ambiente patogénico, solo algunos de ellos manifiesten la enfermedad. Sin duda es cierto que existen los agentes patógenos y esto ha generado gran cantidad de conocimiento acerca de las características de las enfermedades. Sin embargo, como señala Ader (1980), "aún cuando se realicen muchos cuidados para obtener uniformidad en la expresión del padecimiento, generalmente se observan claras diferencias individuales." Esto se refiere a que existe predisposición de algunos individuos para adquirir ciertos padecimientos lo que implica la posibilidad de que estas enfermedades tengan un carácter psicosomático, es decir, que el origen más probable de las diferencias individuales sean problemas psicológicos que se expresan a nivel orgánico. Es importante aclarar que existen otros factores importantes para explicar las diferencias individuales en la expresión de

padecimientos, como los factores genéticos y la condición homeostática del organismo, que finalmente pueden ser conceptualizados como factores orgánicos que pueden afectar la susceptibilidad del organismo ante los agentes patógenos. Sin embargo estos factores no son suficientes para aclarar el porqué algunos individuos son más susceptibles que otros.

El hecho de que la expresión de una enfermedad en un individuo dado se explique en términos de los factores psicosomáticos que le subyacen, implica en primer lugar la influencia moduladora del cerebro como un sensor e interprete del ambiente físico y psicosocial, y segundo un efecto somático, o dicho de otra manera, orgánico, que en el caso de padecimientos en los que esta involucrado un agente patógeno, el sistema que es modulado por el sistema nervioso, es el sistema inmune, encargado de controlar y destruir a estos organismos invasores.

A partir de estos supuestos, en los últimos años se ha desarrollado un nuevo campo de investigación multidisciplinaria que integra la función del sistema nervioso con la del sistema inmune, llamado psiconeuroinmunología. El término de psiconeuroinmunología alude a las interacciones funcionales que existen entre el sistema nervioso central, la conducta y el sistema inmune. A pesar de la gran cantidad de datos de diferentes disciplinas que coinciden en señalar este punto, no se acepta universalmente la premisa de que el sistema nervioso central y el sistema inmune están interconectados. Por ejemplo hasta hace algunos años se podía encontrar en un libro de texto de inmunología lo siguiente: "En todos los tipos de reacción inmune o alérgica, un individuo adquiere información específica (aprende) del contacto con el agente patógeno sin la mediación del sistema nervioso" (Sell, 1972). Otros textos presentan argumentos semejantes, o bien dan por hecho la autonomía del sistema inmune. Sin embargo en los últimos años se han podido observar cambios en cuanto a los conceptos de autonomía de la respuesta inmune, argumentando que al igual que cualquier otro sistema fisiológico importante para mantener la homeostasis, el sistema inmune es sensible a la actividad del sistema nervioso central (Ader, 1980). Así como el sistema inmune se presenta como un mediador potencial de gran parte de los fenómenos psicosomáticos, los procesos inmunológicos no serán entendidos en su totalidad hasta que los inmunólogos consideren el complejo huésped dentro del cual se llevan a cabo dichos procesos.

La aparición de la neuroinmunología como tal se dió a partir de mediados de siglo, adquiriendo más importancia para los inmunólogos y para los neurocientíficos en la última década. En esta disciplina han surgido dos grandes campos de investigación, uno concerniente al papel del sistema nervioso en la modulación del sistema inmune, y

el otro referente a la respuesta inmune dentro del tejido nervioso. Al respecto, es importante mencionar que durante mucho tiempo se consideró al sistema nervioso como inmunológicamente privilegiado, ya que la barrera hematoencefálica impide el libre paso de células linfoides al tejido cerebral. Sin embargo, últimamente se ha demostrado que en el sistema nervioso existen células como los astrocitos y la microglia, que sirven de presentadores de antígeno y están involucrados en la inmunidad dentro de este tejido (Frei y Fontana., 1989). Por lo tanto, es plausible distinguir entre ambos tipos de investigación dándole el nombre de neuroinmunología a los estudios de los mecanismos nerviosos de la modulación neural de la respuesta inmune y denominando al segundo como inmunidad en el sistema nervioso. Cabe señalar que dicha distinción no implica que en el estudio de los mecanismos de regulación del sistema inmune no se tomen en cuenta los mecanismos de retroalimentación de información del sistema inmune al sistema nervioso.

Antes de seguir adelante con lo referente al tema de la neuroinmunología, hemos de hacer un breve paréntesis para explicar lo que es la respuesta inmune y los mecanismos que en ella están implicados, para así poder detallar algunos aspectos de la modulación que el sistema nervioso ejerce sobre el sistema inmunitario.

Cap II

Esquema General de la Respuesta Inmune

Nuestro organismo está protegido en contra de diversos agentes infecciosos como bacterias, virus, hongos y parásitos, por un sistema de defensa conocido como sistema inmunológico. Cualquier deficiencia de este sistema puede ser fatal, a menos que se aisle al organismo de una posible infección. Es bien sabido que un individuo que ha padecido alguna enfermedad infecciosa, después de haberse recuperado, se vuelve inmune a esa enfermedad, es decir disminuye considerablemente la probabilidad de que el sujeto padezca nuevamente la infección. La inmunidad es altamente específica, por lo cual, un individuo que se ha recuperado de sarampión estará protegido en contra del virus del sarampión pero no en contra de otros virus comunes. Muchas de las respuestas del sistema inmune se inician con la destrucción y eliminación del organismo invasor y de las moléculas tóxicas producidas por él. Debido a que esta reacción es destructiva es esencial que la respuesta inmune se limite solo a moléculas externas y que no destruya a las moléculas del propio organismo. Esta capacidad de distinguir entre moléculas foráneas y moléculas propias es otra característica fundamental del sistema inmune y se conoce como tolerancia, sin embargo en ocasiones esta capacidad del sistema falla y se generan los daños autoinmunes.

Existen principalmente dos grandes clases de respuestas inmunitarias: 1) respuestas con anticuerpos o respuesta humoral y 2) respuesta inmune mediada por células o respuesta celular. La respuesta humoral involucra la producción de anticuerpos, los cuales son proteínas llamadas inmunoglobulinas. Estos anticuerpos circulan en el torrente sanguíneo y pueden penetrar a algunos otros fluidos corporales, en donde se acoplan específicamente al antígeno que los indujo. El enlace del anticuerpo inactiva a virus y toxinas bacterianas, bloqueando su habilidad de unirse a receptores localizados en la célula blanco. El enlace de anticuerpos también marca a microorganismos para su destrucción, haciendo más fácil para las células fagocíticas la ingesta del antígeno, o bien, mediante la activación de un sistema de proteínas sanguíneas, comúnmente llamadas complemento, las cuales son un conjunto de enzimas dedicadas a destruir al invasor (Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts, y Watson., 1989).

La segunda clase de respuesta inmune involucra la producción de células especializadas que reaccionan con el antígeno en la superficie de otra célula. La célula activada puede eliminar a una célula que ha sido infectada por un virus que contiene

proteínas virales en la superficie, destruyendo a la célula infectada antes de que esta se reproduzca. En otros casos la célula reactiva secreta señales químicas que activan a los macrófagos, los cuales destruyen a los microorganismos invasores.

Entre las células que circulan en la sangre se encuentran los glóbulos blancos, de los cuales un subtipo conocido como linfocitos, son los responsables de la especificidad inmunológica. Los linfocitos se encuentran en grandes cantidades en la sangre (aproximadamente 2×10^{12} en todo el cuerpo), en el fluido de los vasos linfáticos, y en órganos linfoides especializados, como el timo, los nodos linfáticos, el apéndice y el bazo (Gowans y McGregor., 1965)

A través de experimentos en los que se provocaba la lisis de una gran parte de los glóbulos blancos de algunos animales se pudo establecer el papel de las células blancas en la respuesta inmune, observándose que los animales cuyos globulos blancos se habían destruido, se mostraban incapaces de efectuar una respuesta inmune ante cualquier antígeno. Al administrar diferentes tipos de células blancas, se pudo observar que solo los linfocitos eran capaces de restaurar la respuesta inmune. Ciertamente, los linfocitos pudieron restaurar tanto la respuesta humoral como la celular, lo que demostró el papel de este tipo de células blancas en ambos mecanismos de acción inmunológica. Más adelante se encontró que las dos grandes clases de respuesta inmunitaria están mediadas por diferente tipo de linfocitos (Greaves, Owen y Raff., 1973), los linfocitos T, que se desarrollan en el timo, son los responsables de algunas respuestas mediadas por células y los linfocitos B, que en el caso de los mamíferos se desarrollan en la médula ósea y en el hígado fetal, son los responsables de la respuesta humoral. Estos hechos se demostraron en experimentos con animales recién nacidos a los que se les removía el timo, observando que la respuesta inmune mediada por células se deterioraba dramáticamente, mientras que la respuesta mediada por anticuerpos era poco afectada. En aves, al remover la bolsa de Fabricio, se deterioró la respuesta mediada por anticuerpos, mientras que la mediada por células se mantuvo. Estos resultados indicaban que las células de este órgano eran las responsables de la respuesta humoral. En adelante se denominó a la células de este órgano como células B.

En la actualidad, se sabe que la deficiencia inmunitaria ocasionada por la ausencia de células T no solo deteriora la respuesta mediada por células sino también la producción de anticuerpos. Este hallazgo se explica por la evidencia que muestra que los linfocitos T tienen un papel crucial en la inmunidad y ayudan a las células B a realizar las respuestas con anticuerpos. De hecho, los linfocitos T tienen una función reguladora sobre la respuesta inmune, tanto incrementando como suprimiendo la respuesta de otras células blancas. Dichas células, llamadas en general células T reguladoras,

involucran a células supresoras de la actividad inmunitaria y células ayudadoras o estimuladoras de la inmunidad. Por otro lado se tiene a las llamadas células efectoras, que incluyen a los linfocitos T citotóxicos y a linfocitos B involucrados directamente en la defensa en contra de la infección.

Todas las células sanguíneas, incluyendo las células rojas, las plaquetas y las células blancas, se desarrollan a partir de células hematopoyéticas pluripotenciales. Estas células se encuentran en el hígado en el caso de los fetos y en la médula ósea en el caso de los adultos. En todos los vertebrados las células T se desarrollan en el timo a partir de células precursoras que migran al timo vía el torrente sanguíneo y provienen del tejido hematopoyético. Los lugares donde se desarrollan los linfocitos y las células precursoras se denominan órganos linfoides primarios. Se conoce por órganos linfoides secundarios a los nodos linfáticos, el bazo e intestino asociado a tejidos linfáticos, y es principalmente en estos en donde las células B y T reaccionan con el antígeno (Cooper y Lawton., 1974).

Como se mencionó anteriormente una de las características más importantes del sistema inmune es la alta especificidad de su respuesta. Este hecho sugiere la pregunta de: ¿cómo es que el sistema inmune es capaz de producir tal diversidad de anticuerpos?.

Una de las hipótesis propone que la conformación final de la cadena polipeptídica de un anticuerpo es determinada por el antígeno. Sin embargo esta hipótesis se abandonó al demostrarse que la estructura tridimensional de una proteína, así como un anticuerpo, está determinada únicamente por la secuencia de aminoácidos. De hecho, un anticuerpo desnaturalizado puede regresar a su forma original aún en ausencia del antígeno. Posteriormente se postuló otra hipótesis que propone que durante el desarrollo cada linfocito se compromete a reaccionar ante un antígeno en particular, antes de que sea expuesto a él. Esto implica que la célula contiene receptores que se enlazan específicamente al antígeno, y cuando esto sucede, la célula se activa, causando tanto su proliferación como su maduración (Ada y Nossal., 1987). A esta teoría se le ha llamado teoría de selección clonal, que deriva del postulado de que el sistema inmune está compuesto de millones de clones diferentes de células, las cuales consisten en células T y B descendientes de un ancestro común.

Gran parte de lo que se sabe acerca de la inmunidad ha surgido de estudios con animales de laboratorio, a los que se les inyectan diversas sustancias capaces de evocar una respuesta inmune. Las macromoléculas orgánicas capaces de inducir una respuesta inmune son referidas como antígenos. En general, las macromoléculas que son capaces de inducir una respuesta inmune son proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos. Cabe

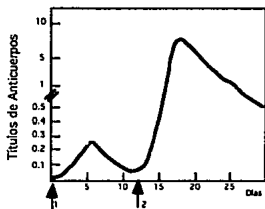
señalar que el sistema inmune puede distinguir entre antígenos que son muy similares, tales como dos proteínas que difieren en un solo aminoácido o entre dos isómeros ópticos de una misma molécula.

Las partes de la molécula antigénica que se combina con el sitio de enlace al antígeno en una molécula de anticuerpo o en un receptor del linfocito, son llamadas epítopes o determinantes antigénicos. Así mismo, las moléculas que se unen a un sitio específico de enlace antigénico, pero que no inducen respuesta inmune son llamadas haptenos, las cuales son generalmente moléculas orgánicas pequeñas incapaces de evocar una respuesta inmunitaria por sí mismas, pero se pueden hacer antigénicas si se acoplan con otra molécula llamada acarreador. La mayoría de los antígenos tienen una variedad de determinantes antigénicos que estimulan la producción de anticuerpos o la respuesta de las células T, y se sabe que unos determinantes son más inmunogénicos que otros. Un solo determinante antigénico puede, en general, activar muchas clonas y cada cual producirá un sitio de enlace al antígeno con sus propias características de afinidad por el este. Cuando varias clonas se activan se trata de una respuesta policlonal, si solo unas pocas clonas responden, la respuesta es llamada oligoclonal; y cuando la respuesta está hecha por una sola clona de células B o T se denomina monoclonal. La respuesta a la mayoría de los antígenos es policlonal.

La producción de anticuerpos es de vital importancia para los vertebrados, ya que los defienden de las infecciones, mediante la inactivación de los virus y de las toxinas de las bacterias, reclutando al sistema del complemento y a varios tipos de células blancas que matan a microorganismos y parásitos. Los anticuerpos son sintetizados exclusivamente por los linfocitos B, en general se les conoce como inmunoglobulinas que constituyen aproximadamente el 20% del peso proteico del plasma. En los vertebrados superiores existen cinco clases de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, los cuales se distinguen por la denominada cadena H, la cual tiene características particulares para cada clase de anticuerpo.

Una de las características más importantes del sistema inmune es que puede *recordar*, lo que explica el desarrollo de la inmunidad ante muchas enfermedades virales comunes después de una exposición inicial al virus. Si a un animal se le inyecta por primera vez un antígeno A, su respuesta aparecerá después de un período de demora de algunos días, incrementándose lentamente hasta alcanzar una pequeña cima de la que decaerá gradualmente. Esta es la característica de lo que se ha llamado respuesta inmune primaria, en la cual participan principalmente inmunoglobulinas del tipo M (IgM). Después de algunas semanas, meses o aún años, al inyectar al animal por segunda ocasión con el antígeno A, se produce una respuesta inmune secundaria, para

la cual la latencia de la respuesta es más corta, su potencia es mayor y el tiempo de duración es más largo (ver Esquema 1). Esta respuesta secundaria refleja una memoria inmunológica específica al antígeno A. En la respuesta secundaria la inmunoglobulina que participa principalmente es del tipo G (IgG).



Esquema 1. Se representa la respuesta inmune primaria y secundaria en un organismo humano. Las flechas indican el momento de la primera y segunda inmunización

En los animales maduros las células T y B en los órganos linfáticos secundarios son una mezcla de células en tres estados de maduración que son denominados de la siguiente manera: células vírgenes, células de memoria, y células activas. Cuando las células vírgenes se encuentran con un antígeno por primera vez, algunas de ellas se convertirán en células activas y otras serán estimuladas y se multiplicarán para convertirse en células de memoria, las cuales por sí mismas no pueden producir una respuesta pero están listas para convertirse en células activas por una segunda exposición al mismo antígeno (Rajewky, Forster, y Cumano., 1987). Se cree que mientras las células vírgenes sobreviven por un corto tiempo, las células de memoria parece que viven por muchos meses o aún años, sin dividirse y recirculando continuamente. Es importante señalar que las células de memoria responden más rápidamente al antígeno que las células vírgenes, lo cual explica la aceleración de la respuesta inmune después de la segunda inmunización.

Cuando el sistema inmune tiene que responder ante un organismo extraño como una bacteria, una célula infectada o una célula tumoral, puede ocurrir la producción de anticuerpos para antígenos de superficie de la célula invasora, lo cual activa al sistema de complemento por el reconocimiento de la interacción antígeno anticuerpo, pudiendo así eliminar a la célula. Por otro lado, también se puede dar una respuesta celular mediada, ya sea por linfocitos T citotóxicos o bien por células NK o asesinas naturales, las cuales son células muy parecidas a los linfocitos que pueden matar a células tumorales, o a células infectadas por virus de manera espontánea y relativamente inespecífica, en ausencia de anticuerpos (Herberman, Reynolds y Orlando., 1986). La manera en que las células NK discriminan a las células anormales de las normales es

todavía un enigma. La respuesta inmune ante un tumor puede involucrar también la actividad de otras células conocidas como macrófagos, los cuales funcionan como presentadores de antígeno para desarrollar una respuesta humoral. Las células T citotóxicas destruyen principalmente a células infectadas, reconociéndolas con bastante especificidad (Nabholz y MacDonald., 1983). Estas células también cumplen funciones moduladoras sobre otras células linfoides, tal es el caso de las células T ayudadoras y las T supresoras, que mientras los linfocitos T citotóxicos y los linfocitos B son las principales células efectoras del sistema inmune, los linfocitos T ayudadores y supresores cumplen funciones reguladoras de la respuesta, mediante la secreción de factores como las citocinas, las cuales incluyen a las interleucinas y los interferones.

La fase efectora tanto de la inmunidad natural como de la específica son en gran parte mediadas por hormonas protéicas conocidas genéricamente como citocinas (Abbas, Lichtman y Pober., 1991). En el caso de la inmunidad natural, las citocinas efectoras son producidas por células fagocíticas mononucleares, por lo cual se les denomina monocinas. Para la inmunidad específica las citocinas son producidas principalmente por los linfocitos T, de ello se le da el nombre de linfocinas. Finalmente tanto los linfocitos como las células fagocíticas mononucleares producen citocinas conocidas como factores reguladores.

Si se divide a las citocinas por su función se tiene en primer lugar a aquellas involucradas en la inmunidad natural, de las cuales el interferon α y el interferon β , que son producidos por las células fagocíticas mononucleares, tienen como efectos principales el de funcionar como factores antiproliferativos, antivirales e incrementar la expresión de moléculas antigénicas del tipo MHC I, las cuales son importantes para el reconocimiento de células extrañas y para los efectos de rechazo a un tumor. El factor de necrosis tumoral, se produce también por células fagocíticas y esta involucrado en la activación de procesos inflamatorios; la interleucina 1 (IL 1) es liberada por fagocitos mononucleares, macrófagos y monocitos, actuando principalmente sobre células T y B como un factor coestimulante de la proliferación de estas células, así como en procesos inflamatorios y febriles; la interleucina 6 (IL 6) es liberada por fagocitos, células T y células endoteliales, actuando sobre células T y células B maduras como coactivador de estas células entre otras funciones.

Otro tipo de interleucinas son las que están implicadas en la diferenciación, crecimiento y activación de los linfocitos. Entre éstas se incluyen a la interleucina 2 (IL 2), la cual es liberada por células T y actúa sobre células T, B y células asesinas naturales provocando su activación, estimula la liberación de anticuerpos en células B y de citocinas en células T; la interleucina 4 (IL 4) es secretada por linfocitos T del tipo CD4, y

actúa sobre células T y B promoviendo su crecimiento.

La interleucina 5 (IL 5) que es liberada por las células T interviene en procesos inflamatorios produciendo la activación de células B y eosinófilos. La interleucina 7 (IL 7) liberada por fibroblastos, células fagocíticas mononucleares y células endoteliales, estimula la diferenciación de granulocitos en procesos hematopoiéticos (ver Tabla I 1).

Tabla I 1: Se presentan las diferentes citocinas involucradas en la modulación de la respuesta inmune, así como las células que las producen y el efecto sobre células del sistema inmunitario.

Citocina	Célula Productora	Célula Blanco y Función
IL 1	Monocitos, Macrófagos y Fagocitos	Proliferación de células T principalmente y en menor grado en células B
IL 2	Células T CD4 ⁺	Crecimiento de células T y activación de células B
IL 3	Células T	Crecimiento de células hematopoiéticas y células cebadas
IL 4	Células T CD4 ⁺	Crecimiento de células B y en algunas células T
IL 5	Células T CD4 ⁺	Crecimiento y secreción de inmunoglobulinas en células B. Diferenciación y crecimiento en eosinófilos
IL 6	Células T, fagocitos y células endoteliales	Síntesis de proteínas en células T, su activación y secreción de IL 2. Secreción de inmunoglobulinas en células B.
IL 7	Fibroblastos, fagocitos, células endoteliales y algunas células T	Crecimiento de células T y B. Diferenciación de granulocitos.
IL 8	Producida por muchos tipos celulares	Actúa como un factor quimiotáctico para neutrófilos y granulocitos

<i>Interferon γ</i>	<i>Células T CD4+ activadas</i>	<i>Activa a las células T citotóxicas, a las células NK y a macrófagos. Induce la expresión de moléculas de la clase MHC II</i>
---------------------------------------	---------------------------------	---

Se han mencionado hasta aquí, los conceptos generales del funcionamiento de la respuesta inmune, lo cual permitirá entender como este sistema, a pesar de que presenta mecanismos autónomos de modulación, puede ser controlado por el sistema nervioso.

Cap III

La Neuroinmunología

Durante mucho tiempo se pensó que el sistema inmune era automodulable, mediante sistemas celulares como los linfocitos T ayudadores y supresores. Sin embargo la mayoría de los estudios que apoyaban la idea de autonomía se habían realizado en sistemas "in vitro", ignorando el hecho de que "in vivo" los procesos inmunoreguladores ocurren dentro de un ambiente neuroendócrino que constantemente está cambiando ante las demandas del ambiente exterior. A partir de esto, surgió evidencia que mostró que factores ajenos al sistema inmunitario estaban implicados en su regulación, haciéndose cada vez más claro que el sistema nervioso induce el mismo tipo de control sobre el sistema inmune que el que ejerce sobre el sistema endócrino, y probablemente haciendo uso de mecanismos de retroalimentación similares. Al principio se le atribuyó un papel importante en la regulación neuroinmune a las hormonas, como los cortico esteroides, los cuales se sabe que modulan la respuesta inmune, por lo cual uno de los primeros temas a tratar fué el estudio de la regulación neuroendócrina del sistema inmune.

Uno de los casos más tratados en el campo de la neuroinmunología es el del estrés, el cual se refiere a una circunstancia natural, o experimental, que amenaza la integridad psicobiológica del individuo, ya sea una amenaza real o percibida como tal. En los animales, las condiciones ambientales que son percibidas aparentemente como una amenaza al organismo, y a las cuales éste no se puede adaptar, estarán acompañadas de cambios psicofisiológicos transitorios y otros de larga duración, los cuales contribuyen al desarrollo de diversas enfermedades, sobre todo cuando el animal esta expuesto a agentes patógenos (Weiner., 1977). Este hecho se había reconocido tiempo atrás con investigaciones en donde diferentes estresores producían efectos en el mantenimiento y disparo de diversas enfermedades (Ader y Cohen., 1993). Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de investigaciones que ilustraban este hecho, no se tenía evidencia de que estos efectos estuvieran mediados por alteraciones en la función inmunitaria inducida por factores conductuales.

No fué una tarea fácil observar efectos claros en la respuesta inmune de animales sujetos a estrés, debido a que al inmunizar a animales y medir su respuesta humoral, los animales sujetos a estrés presentaban un decremento estadísticamente no significativo de su respuesta inmune, aún cuando en algunos casos se observaba que ésta se demoraba (Feng, Pagniano, Tovar, Benneau, Glaser, y Sheridan., 1991). Esto se debe a

que en situaciones experimentales, al inmunizar a un animal para producir una respuesta primaria robusta, se utilizan concentraciones de antígeno que no se comparan a las que experimenta un organismo en una situación natural. Por esta razón Moynihan, Ader, Grotta, Schachtman y Cohen (1990) estudiaron los efectos de un choque eléctrico sobre la respuesta inmune ante una baja dosis de antígeno, la cual era insuficiente para evocar una respuesta inmune primaria, pero servía para cebar al ratón. Se observó que los ratones expuestos al choque eléctrico mostraron una respuesta inmune decrementada en comparación a los animales no expuestos al estímulo estresante.

Otros trabajos demostraron que diversos estresores como el enfrentamiento entre animales por la defensa del territorio (Fauman., 1987; Fleshner, Laudenslager, Simons y Maier., 1989), la experiencia de separación temprana de la madre (Coe, Rosenberg, y Levine., 1988), o las restricciones físicas (Okimura y Nigo., 1986) producían deficiencias en la respuesta inmune humoral.

Las hormonas a las que se les atribuyó el papel de la regulación neuro-inmune del estrés fueron los corticoesteroides, debido a que se correlacionaban frecuentemente con el estrés (Basedovsky, Del Rey, y Sorkin., 1985). Los corticoesteroides son factores moduladores de la respuesta inmune, en virtud de que suprimen la actividad de respuestas dependientes del timo, incluyendo la producción de algunas inmunocitocinas por células T y la síntesis de anticuerpos en células B (Munck, Guyre, y Holbrook., 1984). Aún cuando también se ha descrito que en algunos casos los corticoesteroides estimulan la producción de inmunoglobulinas (Grayson, Dooley, Koski, y Blaese., 1981). El efecto de los glucocorticoides en los linfocitos incluye tanto linfoцитólisis como la redistribución de algunos subtipos de estas células dentro del organismo (Onsrud y Thorsby, 1981; Munck, y cols., 1984). Usualmente también suprimen la formación o secreción de linfocinas, observándose un papel benéfico para el organismo al suprimir la liberación de ácido araquidónico, evitando así el proceso inflamatorio generado por el metabolismo de este agente. Los corticoesteroides son secretados por la corteza supra adrenal en respuesta a la hormona adenocortico trópica (ACTH), la cual es liberada por la glándula pituitaria y se secreta en respuesta al factor de liberación de corticotropina (CRF) proveniente del hipotálamo. Así mismo, los glucocorticoides sirven de retroalimentación negativa, actuando a nivel hipotalámico y en la pituitaria, inhibiendo la secreción de CRF y ACTH respectivamente. Los efectos depresores de los corticoesteroides han sido útiles en la clínica para controlar problemas alérgicos, daño autoinmune y el proceso inflamatorio entre otros padecimientos, pero también han servido para explicar en algunos casos los efectos del estrés sobre la respuesta inmune. Uno de los mecanismos de adaptación fisiológica a los estresores

ambientales es la producción de ACTH por la glándula pituitaria, la cual como se mencionó previamente estimula la producción de corticoesteroides (Husband, 1993). Es así como se explica que sujetos expuestos a estrés crónico y/o agudo, presenten depresión de la respuesta inmune atribuida a una sobreproducción de estas hormonas (Irwin, Vale, y River., 1990).

Otra de las hormonas que tiene efectos sobre la respuesta inmune es la vasopresina, la cual actúa como un estimulador de la proliferación y/o diferenciación de timocitos (Whitfiel, MacManus, y Gillan., 1970) y fibroblastos (Rozengurt, Legg, y Curd 1979), actuando sinérgicamente con la insulina y otros factores promotores de crecimiento. Además de su potente actividad mitogénica, la vasopresina es capaz de reemplazar los requerimientos de interleucina 2 por la producción de interferón γ (Johnson y Torres, 1985), por lo cual puede por sí misma modular la respuesta de células linfoides con receptores para interferón γ .

Además de los corticoesteroides y la vasopresina, se sabe que la insulina, la prolactina, la encefalina y las endorfinas, entre otras, tienen efectos sobre la respuesta inmune (Cotman, Brinton, Galaburda, McEwen y Schneider., 1987). Así mismo, se ha reportado la presencia de receptores para la mayoría de estas hormonas en las células linfoides. Un ejemplo es el receptor al péptido vasoactivo intestinal (VIP), que se encuentra en algunas poblaciones de linfocitos y actúa a través de segundos mensajeros mediante la producción de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) (Danek, O'Dorisio, O'Dorisio, y George., 1983). El VIP inhibe la respuesta de las células linfoides ante la estimulación por mitógenos y la migración de los linfocitos en diferentes tejidos linfoides excepto en el bazo.

Ya que las hormonas son factores importantes en la modulación de la respuesta inmune, y teniendo en cuenta que el hipotálamo a través de la pituitaria controla la gran mayoría de los procesos endócrinos, los primeros trabajos referentes al estudio de las regiones neurales implicadas en la neuromodulación se iniciaron por el análisis del hipotálamo. De esta manera, las bases neurofisiológicas de la regulación neuro inmune se generaron a partir de experimentos donde, utilizando lesiones en el hipotálamo, se veían claros efectos sobre la respuesta inmune; por ejemplo, Cross, Markesbery, Brooks y Roszman (1980) demostraron que las lesiones del hipotálamo anterior decrementaban la respuesta de las células de bazo. Sin embargo, desde 1972 Tyrey y Nalbandov habían observado un decremento de la respuesta humoral causada por lesiones destructivas del hipotálamo, por medio de técnicas de absorción, indicado por una disminución de anticuerpos en sangre de animales inmunizados en comparación con animales también inmunizados pero con lesiones control. Isakovic y Jankovic (1973) encontraron que las

lesiones del hipotálamo producían cambios en la arquitectura celular de tejido linfoide, además de que estas lesiones también producían disminución de una respuesta alérgica de tipo retrasada (hipersensibilidad de tipo retrasada). Este resultado también se observó en respuestas alérgicas inmediatas (Lupparello, Stein, y Park., 1964; Schiavi, Marcis, Camerino, y Stein., 1975). Años después, Cross, y colaboradores (1980) utilizaron lesiones electrofólicas del hipotálamo anterior, las cuales eran más precisas que las utilizadas anteriormente, y observaron un decremento significativo en la población de células tanto del bazo como del timo, además de que la reactividad de las células del bazo ante la estimulación por concanavalina A decreció. El efecto que describen estos investigadores se observó claramente a los cuatro días de la lesión y se mantuvo hasta el séptimo día. Estos resultados se replicaron posteriormente por el mismo grupo de investigación (Roszman, Cross, Brooks y Markesberry., 1982) y otros (Stein, Schleifer, y Keller., 1981), donde midieron diferentes aspectos de la función inmunitaria, observando efectos congruentes con los antes descritos.

En una reciente revisión, Baciú (1993) afirma que la parte posterior del hipotálamo, esta involucrada en la regulación e integración de la respuesta inmune considerándose como una función homeostática en conexión con el hipotálamo anterior; donde los núcleos laterales y el área preóptica cumplen una función receptiva ante el reto antigénico y ante diversos factores inmunitarios.

Existe otra hormona que no sólo es controlada por el hipotálamo, sino también por el sistema nervioso autónomo, y que contribuye en la regulación neural de la respuesta inmune. Esta hormona es una catecolamina, la adrenalina, de la cual se tienen caracterizados receptores en linfocitos (Glue, Payvandi, Kay, Elliott, y Nutt., 1991). Se sabe que la adrenalina es liberada por la médula supra adrenal, lo que implica la modulación hipotalámica de su liberación. Sin embargo esta catecolamina también es liberada por el sistema nervioso simpático (se conoce también como neurotransmisor en diferentes regiones del sistema nervioso central) el cual además libera noradrenalina. Ambas catecolaminas son liberadas por células simpáticas en tejido linfoide, donde actúan sobre células linfoides con receptores adrenérgicos, siendo este un mecanismo nervioso de modulación más directa sobre el sistema inmune.

Los opiáceos endógenos así como las endorfinas, tienen efectos en la actividad de las células linfoides, las cuales presentan receptores a estos péptidos. (Wybran, 1985) y son liberados a tejido linfoide también por el sistema nervioso simpático (Reder, Karaszewski, y Arnason., 1989). Las β -endorfinas incrementan la respuesta proliferativa de los linfocitos ante la estimulación por mitógenos y junto con las encefalinas incrementan la actividad de las células NK.

Recientemente se ha comenzado a estudiar el papel del sistema nervioso simpático en la regulación de la respuesta inmune. Se sabe que las lesiones del sistema nervioso simpático afectan una gran variedad de funciones inmunes (Reider y cols., 1989). Con técnicas histoquímicas, se ha demostrado la presencia de inervación simpática en regiones específicas de tejido linfoide primario y secundario (Williams y Felten, 1981; Williams y cols., 1981; Felten, Felten, Carlson, Olschowka y Livnat, 1985; Livnat, Felten, Carlson, Bellinger y Felten, 1985). Estas inervaciones son predominantemente noradrenérgicas (Madden Ackerman, Livnat, Felten, y Felten, 1989); por ejemplo, al bazo arriban fibras noradrenérgicas provenientes del ganglio mesentérico (Felten y cols., 1985) entrando por la arteria del bazo, distribuyéndose en el sistema capsular. Además se asocian abundantemente con la arteria central y se ramifican en la pulpa blanca, en donde se observa la mayoría de las varicosidades noradrenérgicas. En contraste las varicosidades de los plexos tortuosos rodean las arterias centrales y sus ramificaciones, extendiéndose por fuera de la vaina linfática periarteriolar y desplazándose linealmente a lo largo del eje de los senos marginales, generalmente evitando los folículos (Felten, Ackerman, Wiegand y Felten, 1987).

Las lesiones del sistema nervioso simpático efectuadas con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), con la que se lesionan selectivamente terminales catecolaminérgicas (Thoenen y Tranzer, 1973), destruyen inervaciones nerviosas simpáticas, dejando a los cuerpos celulares con vida, por ello se le denomina axotomía. Tanto la simpatectomía como la axotomía afectan la distribución de los linfocitos en el bazo y la función inmune. La axotomía en sistema nervioso simpático, evita el eflujo de leucocitos del bazo, incrementa significativamente el porcentaje de células T (Miles, Chelmicka-Schorr, Atweh, Otten y Arnason, 1985) y decrementa la población de células B.

La noradrenalina es el principal neurotransmisor del sistema nervioso simpático y se libera directamente a tejido linfoide primario y secundario. Su acción es mediada por receptores adrenérgicos, de los cuales existen diferentes tipos y unos son más afines a la noradrenalina y otros a la adrenalina. Los receptores adrenérgicos son proteínas de membrana que median diversos efectos fisiológicos de hormonas y neurotransmisores, y pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas reguladoras que se enlazan al nucleótido de guanina (Proteínas G). Esta familia incluye a la rodopsina, a los receptores muscarínicos de acetilcolina, y a muchos otros receptores como son aquellos que se enlazan a hormonas peptídicas. Comunmente este tipo de receptores se conocen como receptores mediados por mecanismos de segundos mensajeros, o bien receptores metabotrópicos en el caso del sistema nerviosos central. Genéricamente (Schwartz y Kandel, 1991) se puede hablar de que este receptor está asociado a un transductor (la proteína G estimuladora, en el caso del receptor β -adrenérgico) el cual modula a un

efector primario (en este caso es la adenilato ciclasa) y éste a un segundo mensajero (el monofosfato de adenosin cíclico, cAMP), el cual va a activar a un efector secundario (la proteína cinasa dependiente de cAMP). En el caso de los receptores adrenérgicos existen dos grandes subclases, los α y los β , cada cual tiene dos subtipos farmacológicamente distinguibles, ellos son $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y $\beta 1$ y $\beta 2$. Los $\beta 1$ y 2 al unirse al ligando interactúan con una proteína Gs, la cual activa a la adenilato ciclasa, mientras $\alpha 2$ la inhibe a través de una proteína G inhibitoria (G_i) y finalmente el subtipo $\alpha 1$ activa al efector primario que es una fosfolipasa C por medio de otro tipo de proteína G.

Los efectos clásicos de la activación simpática sobre los linfocitos son en gran parte mediados por la norepinefrina, la cual actúa principalmente en los receptores α y con menor afinidad en los receptores β . En contraste, la adrenalina que es liberada a la sangre principalmente por células de la médula supra adrenal, actúa preferencialmente en los receptores β y en un menor grado en los α (Heilig, Irwin, Grewal y Sercarz, 1993).

En estudios recientes en donde utiliza anfetamina para provocar la liberación de catecolaminas, se ha observado que éstas últimas inhiben la respuesta proliferativa de las células de los nodos linfáticos inducida por un antígeno (lisoenzima blanca de huevo de gallina). Cuando se combinan antagonistas α y β adrenérgicos, estos bloquean el efecto inhibitorio de la proliferación causado por la anfetamina *in vivo*, mientras que en estudios *in vitro*, el agonista de α fenileprina, y no el isoproterenol que es agonista de β , inhibe la respuesta proliferativa en una manera dosis dependiente (Heilig y cols., 1993). Así mismo, el efecto inhibitorio de la fenileprina fue bloqueado por el antagonista de α fentolamina. Estos datos sugieren que el efecto inhibitorio de la proliferación se da por medio de los receptores α y debido a que este tipo de receptores se encuentran principalmente en los linfocitos T, se piensa que el efecto es a través de estas células, las cuales por tanto, responden preferencialmente a la norepinefrina (Felten y cols., 1985).

Por otro lado se ha observado en células nerviosas que la sobre estimulación de los receptores β adrenérgicos produce un decremento en el número de estos receptores, mientras el bloqueo lo incrementa. Teniendo en cuenta esto se ha estudiado la regulación en el número de receptores $\alpha 2$ de linfocitos por un antagonista selectivo de este mismo receptor que es el idazoxan, encontrándose un pequeño incremento en el número de receptores $\alpha 2$ después del bloqueo con este antagonista (Johnson y Gordon, 1980), En plaquetas este fenómeno se observa de manera más clara.

Hasta ahora se han visto las dos principales vías de acceso que tiene el sistema nervioso para actuar sobre el sistema inmune, sin embargo no se ha descrito de que manera el sistema nervioso recibe información de los eventos que ocurren en el sistema

inmune. En un principio se mencionó que existen factores como las interleucinas, las cuales son secretadas por células linfoides y cumplen funciones modulatorias sobre células del sistema inmune.

Las interleucinas secretadas por las células linfoides también sirven como mecanismos de retroalimentación entre el sistema inmune y el sistema nervioso. se sabe que la IL-1 tiene efectos modulatorios a nivel hipotalámico, estimulando la secreción de diversas hormonas. Por ejemplo, se ha descrito que la IL-1 incrementa los niveles de hormona adeno cortico trópica y corticoesteroides en plasma (Sapolsky, Rivier, Yamamoto, Plotsky y Vale., 1987) en estudios in vivo y congruentemente con esto, se ha visto que la IL-1 estimula la liberación del factor liberador de corticotropinas (Bernardini, Calogero, Mauceri y Chrousos., 1990) en cultivos de tejido hipotalámico. También se ha observado que la IL-1 estimula la liberación de noradrenalina y dopamina del hipotálamo in vitro (Palazzolo y Quadri, 1990) y dispara diferentes eventos en el hipotálamo relacionados con la generación de fiebre (Hori, Nakashima, Take, Kaizuka, Mori y Katafuchi., 1991), probablemente modulando la temperatura corporal ya que junto con el interferon α modula la actividad de las células termosensibles en las áreas preóptica y anterior del hipotálamo. De esta manera actúa sobre la ingesta de alimentos al modular la respuesta de células que responden a la glucosa en el hipotálamo ventromedial (Hori, y cols., 1991), lo cual podría explicar la aparición de anorexia como un síntoma común durante el curso de algunos tipos de infecciones.

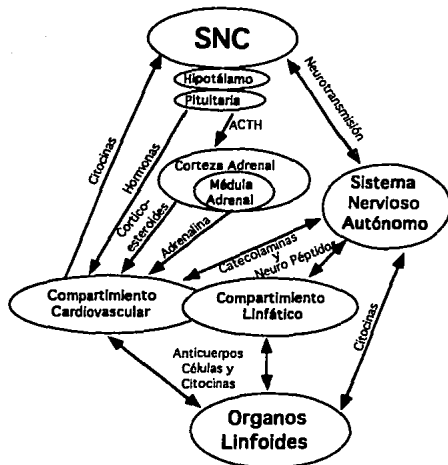
La inyección intraperitoneal de IL-1 produce un incremento de la temperatura rectal y un decremento de los niveles de glucosa en plasma, estos efectos son bloqueados con la destrucción de células ganglionares a través del uso de 6-hidroxidopamina (Saito, Akiyoshi y Shimizu., 1991), con lo que también se observa un incremento en la liberación de norepinefrina por el sistema nervioso simpático. Esta evidencia muestra que la IL-1 también tiene efectos sobre el sistema nervioso simpático.

En una revisión reciente de Cunningham, Jr. y Souza (1993) en la que tratan el tema de los receptores a citocinas en el sistema nervioso central, mencionan que hay evidencia de la existencia de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de receptores a IL-1 en el giro dentado y la región CA3 del hipocampo, en los núcleos antero dorsales del tálamo, en el rafe dorsal, en las neuronas sensoriales de los núcleos mesencefálicos del nervio trigémino, en las células de Purkinje en el cerebelo y en células secretoras de hormonas en la pituitaria anterior. Sorprendentemente no se ha observado mRNA de IL-1 en células hipotalámicas, sin embargo es probable que el tipo de receptor que se encuentra en el hipotálamo y que responde a IL-1 tenga características moleculares

diferentes a los que se observan en las células linfoides (Cunningham, Jr. y Souza, 1993).

Otras citocinas que tienen efectos en el sistema nervioso son la IL-2, IL-6 y el factor de necrosis tumoral (Cunningham, Jr. y Souza, 1993), pero de estos factores se tiene poca información acerca de su función en el sistema nervioso. El hecho de que las interleucinas tengan efectos sobre diferentes regiones del sistema nervioso simpático, es congruente con la observación de que diferentes regiones del sistema nervioso respondan ante la estimulación antigénica. Por ejemplo se han descrito cambios en la actividad eléctrica del hipotálamo después de la inmunización (Basedovsky, Sorkin, Felix, y Haas, 1977), también se ha observado que la estimulación antigénica produce cambios en la actividad metabólica de la amígdala y del hipocampo (Masek, Petroviky y Selfert., 1992), observándose también efectos en los núcleos del rafe y el núcleo parabraquial del puente.

Hasta aquí, se ha hecho un esbozo de la manera en que interactúan el sistema nervioso central y el sistema inmune, y se puede afirmar que existen dos principales vías de acceso del sistema nervioso al sistema inmune, una que representa al hipotálamo, el cual mediante diversas hormonas modula directamente ciertos aspectos de la respuesta inmune e indirectamente por medio de los productos de la corteza y la médula supra adrenal. La otra vía de acceso es el sistema nervioso autónomo que mediante sistemas catecolaminérgicos y neuropeptidos tiene funciones modulatorias sobre el sistema inmune (ver esquema 2).



Modificado de Husband A.J., (1993) Vaccine, 11, 805-815

Esquema 2. Se muestran las principales vías de comunicación entre el sistema nervioso central y el sistema inmunitario.

Si el sistema nervioso es capaz de modular la respuesta inmune y si además existen estructuras centrales que reciben información del sistema inmune, es posible que los mecanismos plásticos que ocurren en el sistema nervioso afecten al sistema inmune. De hecho se ha demostrado que se puede modular el sistema inmune a través de un mecanismo de plasticidad nerviosa como lo es el aprendizaje, específicamente por medio de procedimientos de condicionamiento clásico.

Cap IV

El Condicionamiento Clásico, la Escuela Rusa: Los Primeros Intentos de Condicionamiento de la Respuesta Inmune

El condicionamiento clásico fué descrito originalmente por Pavlov influido por las ideas de Sechenov, quien afirmaba lo siguiente:

"la causa primera de todo acto humano esta fuera del hombre, por lo cual no se puede definir a un organismo sin tener en cuenta su medio ambiente",

y Prochaska, otro precursor de Pavlov, reconocía que:

"los reflejos animales no transcurren como en la óptica donde el rayo luminoso incidente y la posición del espejo determinan la trayectoria del rayo reflejado, pues en el caso de los reflejos animales todo depende del estado momentaneo del organismo".

El concepto de reflejo proviene originalmente de Descartes, aún cuando este no utilizaba precisamente el término, en sus trabajos se expresa la idea de que la reacción animal está determinada por las influencias del mundo exterior. Pavlov interesado en la fisiología de la glándula salivar, realizó diversos estudios que le condujeron a efectuar las observaciones con las que desarrolló el concepto de condicionamiento clásico.

Utilizando la técnica de la fístula permanente de la glándula salivar, elaborada por un colaborador suyo (Glinski), que le permitía medir de manera precisa la cantidad de saliva secretada por la glandula salival del animal y con la cual se puede mantener al animal en buena salud física durante años, Pavlov comenzó a estudiar el reflejo salivar y describió como los reflejos son la reacción del organismo ante factores específicos del mundo exterior, que de acuerdo a Pavlov, dicha reacción:

"esta mediada por el segmento inferior del sistema nervioso central, al cual llega la excitación de los nervios de la lengua que se activan ante la ingesta del alimento y luego el sistema nervioso central excita a la glándula salivar provocando la secreción" (Pavlov, 1929).

Este reflejo fué caracterizado originalmente como reflejo absoluto, o reflejo

simple y permanente. Sus estudios sobre las secreciones digestivas le valieron el premio Nobel que le fué otorgado en 1904.

Pavlov había observado que la sola presentación visual del alimento podía producir la secreción de saliva. Este fenómeno lo llamó excitación psíquica, el cual dependería del segmento superior del sistema nervioso. Al estudiar detalladamente el fenómeno de la excitación psíquica, pudo encontrar que después de que el animal, en este caso un perro, era alimentado todos los días por una misma persona, la sola presencia de esa persona era suficiente para producir la respuesta salival, a lo cual denominó en un principio como reflejo a distancia o reflejo señal. Más adelante realizó experimentos controlados para observar con más cuidado este fenómeno.

El experimento clásico consistió en exponer al animal ante un "excitador ambiental" (ahora se habla de estímulo) que fuese incapaz de producir la respuesta de salivación por sí sólo (estímulo neutro, EN) como el sonido de una campana. Este último es presentado un determinado período de tiempo antes de la presentación del alimento (estímulo incondicionado, EI), el cual de forma refleja produce la secreción de saliva (respuesta incondicionada, RI). Después de varios ensayos en los que se presentan ambos estímulos (apareamiento), en una relación temporal (contingencia), el animal adquiere la capacidad de responder ante el sonido de la campana, que ahora se ha convertido en estímulo condicionado (EC), a través de la secreción de saliva (respuesta condicionada, RC).

En la actualidad se denomina apareamiento de estímulos a la presentación de los estímulos en una relación temporal, que son contingentes en el momento en que la presentación de uno implica la presencia del otro en un espacio temporal. La contingencia en el condicionamiento clásico implica que el estímulo condicionado preceda al estímulo incondicionado en un espacio temporal delimitado.

El reflejo condicionado es entonces producto del apareamiento contingente, de un estímulo neutral con un estímulo incondicionado, en un organismo determinado, adquiriendo así el estímulo originalmente neutro, la capacidad de producir una respuesta semejante a la respuesta incondicionada. Pavlov afirmaba que el segmento superior del sistema nervioso era el encargado de realizar los mecanismos de unión temporal de los estímulos, y decidió designar a esta unión temporal, es decir a este nuevo reflejo como reflejo condicionado.

Pavlov explicó que:

"Una de las uniones esenciales del organismo con el medio ambiente es por la nutrición, de tal forma que en lo más bajo de la escala animal, el solo contacto entre el alimento y el organismo, conduce a la respuesta alimenticia. En escalas más elevadas estas reacciones se hacen más numerosas y distantes, de tal manera que olores, ruidos e imágenes llevan a los animales hacia el alimento en un radio siempre creciente. En el grado superior, los sonidos, las palabras, los signos de la escritura y de la imprenta, dispersan a las masas humanas por toda la superficie de la tierra en busca del pan cotidiano. Esta diversidad y alejamiento lleva consigo el remplazo de las conexiones permanentes entre los factores exteriores y el organismo por una unión temporal, ya que las uniones distantes solo pueden ser pasajeras y cambiantes, y debido a su multiplicidad no cabrían bajo forma de conexiones permanentes, en los aparatos más voluminosos" (Pavlov, 1929).

Esto implicaba en primer lugar que los tipos de conexiones temporales serían más complicadas entre más complicado fuera el sistema nervioso que lo realizaba, esto en términos filogenéticos tiene una gran implicación, ya que explica la complejidad de los procesos de aprendizaje en animales con un sistema nervioso más evolucionado. En segundo lugar se trata al aprendizaje como un cambio "relativamente permanente", lo cual esta implícito en las definiciones actuales de este tipo de plasticidad.

Pavlov como buen fisiólogo estaba interesado en los aspectos funcionales del fenómeno, por lo que explicó al condicionamiento en términos de lo que consideró debería estar ocurriendo en el sistema nervioso de la siguiente manera:

"El nuevo agente exterior debe coincidir en el tiempo una o varias veces con la acción de un agente ya en conexión y manifestarse con la misma actividad, por lo tanto, el nuevo reflejo condicionado se forma con ayuda del antiguo, de esta manera, en el sistema nervioso, la excitación nueva (indiferente hasta entonces) encuentra a su entrada, en los grandes hemisferios, una excitación intensa en donde se concentra para abrirse camino en ese punto y desde donde tendrá acceso hacia el órgano correspondiente del que se ha convertido en excitante. Si no encuentra ninguna excitación elevada, esta se dispersará por todos los hemisferios sin producir efecto notable" (Pavlov, 1929).

Esto, intentaba explicar los mecanismos neurales que subyacen al reflejo

condicionado, implicando a la corteza cerebral en la formación del condicionamiento. El interés de Pavlov por explicar los sustratos neurales del aprendizaje es compartido en este trabajo, así como muchos trabajos que se realizan en la actualidad con el fin de esclarecer los procesos neurales que permiten el aprendizaje. Además, es importante señalar que con lo anterior, Pavlov pretendía aclarar la manera en que un estímulo antes condicionado, perdiera su propiedad de producir la respuesta condicionada después de haber sido presentado repetidamente, es decir explicaba de cierta manera el mecanismo de la extinción, al cual Pavlov reconoce como un tipo de inhibición.

Otros de los fenómenos que documentó Pavlov fueron los mecanismos de generalización y discriminación, que según Pavlov, eran efectuados por los analizadores:

"El analizador es un complejo mecanismo que comienza con el aparato receptor externo y termina en el cerebro, ya sea en el segmento inferior o superior; en este último es mucho más complicado. La participación de un analizador en un reflejo condicionado es en un principio basta y general y solo posteriormente debido a la diferenciación gradual del excitante condicionado entran en función sus partes más finas y discriminatorias. Por ejemplo, en el caso de lesiones, entre más dañada está la extremidad cerebral del analizador, más finura pierde su actividad" (Pavlov, 1929).

Es necesario aclarar que lo anterior es sólo un ejemplo del tipo de conclusiones que Pavlov hizo con respecto a su trabajo en el terreno de los reflejos condicionados. En el caso de que se trate de lesiones en áreas de proyección primaria, sus conclusiones antes mencionadas son acertadas. Las implicaciones teóricas de su trabajo, para la psicología y para otras disciplinas, aún hoy en día son de gran importancia y sus observaciones teóricas que en muchas ocasiones solo eran especulaciones acerca de los fenómenos que ocurrían en el sistema nervioso han servido de inspiración y han llevado a grandes discusiones en el terreno de las neurociencias, en donde muchos de sus argumentos son aún vigentes y muchas de las especulaciones que hizo, ahora se han demostrado experimentalmente.

La aplicación de los conocimientos Pavlovianos incluyen el adiestramiento de animales, la pedagogía, la terapéutica por medio del sueño, el método psicoprofiláctico del parto sin dolor, la publicidad y la psiquiatría, entre otros. De gran importancia también es la concepción cortico visceral de las enfermedades psicósomáticas.

Pavlov afirmaba que:

"todos los agentes del mundo exterior como olores, imágenes, sonidos, etc. podrán entrar en unión temporal con la glándula salival y convertirse en factores estimulantes de la salivación cuando coincidieran en el tiempo con el reflejo absoluto".

Esto hizo pensar a muchos seguidores de Pavlov, que era posible desarrollar cualquier reflejo condicionado, si se tenía de antemano un reflejo absoluto, es decir un reflejo incondicionado y este se asociaba temporalmente con cualquier estímulo. Es así como muchos investigadores interesados en el condicionamiento clásico se abocaron al estudio del condicionamiento de las respuestas autónomas, como una manera de buscar mecanismos de control de estas y desarrollar así nuevas herramientas en el tratamiento clínico.

Los estudios acerca del condicionamiento interoceptivo comenzaron en la Unión Soviética en 1928 pero no habían generado mucho ímpetu empírico hasta los años 40. El condicionamiento interoceptivo se define como el condicionamiento clásico en el cual, ya sea el estímulo condicionado, o el estímulo incondicionado, o bien ambos, son presentados directamente a la mucosa de alguna víscera específica. Razran (1961) define tres tipos de condicionamiento interoceptivo en términos de los estímulos que se utilizan. De esta manera existe el condicionamiento intero-interceptivo, cuando ambos estímulos son interoceptivos, el intero-exteroceptivo cuando el condicionado es interoceptivo y el incondicionado exteroceptivo, y finalmente el extero-interoceptivo cuando el estímulo condicionado es exteroceptivo y el incondicionado es interoceptivo. El condicionamiento clásico convencional es completamente extero-exteroceptivo. Para una clasificación más detallada debería tomarse en cuenta también el tipo de respuesta condicionada, esto es, si la respuesta es visceral, esquelética, o en el caso de los humanos, sensorio-verbal.

Los métodos de estimulación visceral incluían la formación de fístulas en la víscera experimental *in situ*, y en algunos casos también la exteriorización quirúrgica de la víscera. Los estímulos más típicos eran distensiones de la cavidad de la víscera por medio de globos de goma insertados que se pueden inflar con aire o agua. También se utilizaban estímulos térmicos llenando los balones con agua a diferentes temperaturas. La irrigación a través de tubos era la forma común de administración de estímulos químicos. Otros tipos de estimulación eran el raspado rítmico de la mucosa de alguna víscera, el uso de chorros de aire, o agua y la estimulación eléctrica.

Para Razran (1961) los verdaderos casos de condicionamiento interoceptivo son aquellos en que el estímulo condicionado es interoceptivo, es decir, cuando la señalización o los transmisores de la información condicionada son las visceras o el así llamado medio interno. En un ejemplo de condicionamiento intero-exteroceptivo desarrollado por los investigadores rusos se utilizó el raspado rítmico del interior uterino, como estímulo condicionado (EC), 10 minutos antes de la presentación del alimento, como estímulo incondicionado (EI), registrándose la secreción de saliva. Después de 9 a 12 sesiones de apareamiento de los estímulos, apareció la respuesta condicionada (RC). Una vez establecida la RC se inició un entrenamiento de discriminación donde los perros aprendieron a responder diferencialmente a la frecuencia del raspado.

Un condicionamiento completamente interoceptivo es por ejemplo cuando se utiliza un EC como las distensiones rítmicas del intestino, y como EI los cambios en la composición del aire los cuales producen cambios respiratorios hipercápnicos. Después de 12 a 16 apareamientos apareció la RC, esto es cambios hipercápnicos ante la estimulación con distensiones rítmicas del intestino.

Esta clase de estudios hizo que muchos de los investigadores rusos pensaran que prácticamente cualquier par de estímulos podría ser apareado y generar así un reflejo condicionado. Sin embargo, en muchos experimentos, tratando de aparear diferentes tipos de estímulos, solo se obtenía una respuesta condicionada débil y transitoria después de un gran número de ensayos de apareamiento. Un ejemplo de esto es el caso de los experimentos realizados por investigadores rusos en donde por primera vez se intentó condicionar la respuesta del sistema inmune.

Metal'nikov y Chorine (1926) buscaron condicionar el incremento de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) evocado por la inyección de antígeno, apareandola con un estímulo inmunológicamente neutro. Se usaron conejillos de indias a los cuales se les inyectaron dosis pequeñas de *Bacillus anthracis* (EI) después de la estimulación exteroceptiva por medio del calentamiento o el raspado rítmico de algún área específica de la piel (EC). El apareamiento se realizó diariamente entre 18 y 25 días y se dió un período de descanso de 12 a 15 días, para permitir que la respuesta inmune regresara a su nivel basal. Después de este período de descanso se presentó nuevamente el estímulo condicionado en ausencia del antígeno. Como parte de la respuesta incondicionada se observa un rápido incremento del 90% de PMNs en 5 hrs y que perdura por 1 o 2 días. La respuesta condicionada que se generó, también se daba de manera rápida aún cuando representaba solo un 60% de incremento en la población de PMNs y perduró solo por algunas horas.

A pesar de que los efectos observados por Metal'nikov y Chorine (1926) no eran muy fuertes, el fenómeno descrito era muy novedoso e importante, por lo cual muchos otros investigadores rusos continuaron esta línea de investigación. Uno de los estudios más extensivos fué realizado por Ostravskaya (1930) en donde utilizando conejillos de indias a los que aplicó choques eléctricos como EC durante un período de 3 a 5 minutos, apareados con una inyección de antígeno como EI. Se realizaron 21 sesiones de apareamiento. Se utilizaron animales controles no condicionados a los que se les presentó ya sea el EC sin EI o el EI sin el EC. Después de un período de descanso de 10 a 15 días, los animales fueron reexpuestos al estímulo condicionado, se examinaron exudados de peritoneo para determinar el número de PMNs, y se observó un incremento del 67% en los animales condicionados en contraste con un 23% en los animales controles. Otros trabajos realizados por Friedberger & Gurwitz (1931); y por Kopeloff y colaboradores (1933, 1935) no encontraron efecto condicionado alguno.

Estos primeros trabajos de condicionamiento de la respuesta inmune, generaron mucho interés, particularmente en la Unión Soviética. Aunque las premisas que subyacen a dichas investigaciones eran consistentes con el punto de vista predominante de la época, en el que se afirmaba que todos los procesos fisiológicos eran regulados por el sistema nervioso central, en muchos casos los datos se vieron con mucho escepticismo debido a que no existía evidencia que apoyara una relación funcional entre el sistema nervioso y el sistema inmune.

Otros trabajos en este campo fueron elaborados en los años cincuenta con las críticas e investigaciones de Bereznykh (1955), Vygodchikov (1957) y otros interesados en el papel del sistema nervioso como regulador del sistema inmune. Los estudios rusos habían mostrado ya la posibilidad de condicionar ciertas respuestas inmunitarias. Sin embargo, estas primeras observaciones no pudieron ser confirmadas por otros grupos de investigación, quienes intentaron, sin éxito, replicar algunos experimentos. De esta manera, algunos teóricos propusieron que el fenómeno podía ser producto de un artificio metodológico, ya que faltaban controles para demostrar que el fenómeno era realmente un condicionamiento (Ader y Cohen, 1985).

Cap V

El Condicionamiento Aversivo a los Sabores y el Condicionamiento Inmunosupresor

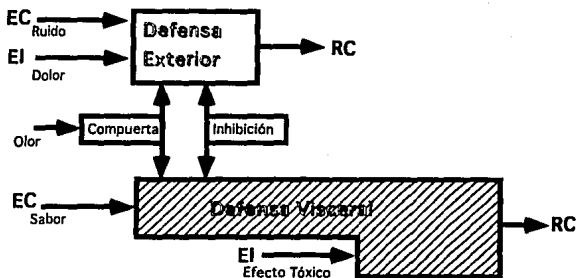
El éxito del condicionamiento inmune surgió con el uso de un paradigma de evitación al sabor denominado condicionamiento aversivo a los sabores, descrito originalmente por García, Kimmeldorf y Koelling (1955).

A finales de la década de los 40's se estaban realizando una gran cantidad de investigaciones acerca de los efectos de las radiaciones sobre animales. En uno de estos experimentos trabajaba García, quien observó un fenómeno muy particular. Todos los que trabajaban en los laboratorios sabían que cuando los animales estaban dentro de las cámaras de radiación, estos no ingerían alimento alguno. García encontró que si se colocaba un bebedero de agua con la punta de plástico en el interior de la cámara de radiación, el animal no volvería a beber en un bebedero con esa clase de punta aún afuera de la cámara de radiación y sí en una punta de vidrio u otro material. Más adelante observó este mismo fenómeno con la presentación de distintos sabores dentro de la cámara, encontrando una conducta de aversión al sabor presentado en el interior de la cámara. Para García este era un claro fenómeno de aprendizaje, en el que el animal relacionaba al sabor con algún efecto de malestar asociado a las radiaciones (García, y cols., 1955), después se observó que la aversión condicionada al sabor podía ser obtenida con el apareamiento del sabor y un estímulo que produjera irritación gástrica como el cloruro de litio (LiCl) (Gustavson, García, Hankins y Risiniak., 1974).

A este paradigma de evitación se le denominó condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), y se hizo de él un paradigma clásico por sus implicaciones teóricas y por su utilidad práctica, ya que es un procedimiento de condicionamiento con el que fácilmente se obtiene la aversión condicionada al sabor, tanto que basta un solo ensayo para que el animal aprenda, además de que puede perdurar por meses y su extinción total toma varios ensayos. Desde el punto de vista evolutivo, el CAS es muy importante, ya que gracias a él, los organismos capaces de adquirirlo, pueden aprender a reconocer que alimentos le son dañinos y esto les permite sobrevivir. El CAS se demostró en diferentes especies animales, obteniéndose efectos sorprendentes cuando a un lobo se le daba carne de oveja con LiCl, después de lo cual el lobo al encontrarse con una oveja, primero la intentaba atacar y al paladear su sabor el lobo se alejaba con miedo de ella.

García demostró que los estímulos que podían ser puestos en una relación temporal para desarrollar un aprendizaje tenían que tener ciertas características que los relacionaran, esto implicaba que no cualquier par de estímulos podían ser relacionados temporalmente. Cuando apareaba simultáneamente la presentación de un estímulo luminoso y un sabor con un choque eléctrico y un estímulo que producía irritación gástrica, el estímulo luminoso se relacionaba temporalmente solo con el choque eléctrico y el sabor con la irritación gástrica (García, Hankins, y Rusiniak., 1974). En ningún momento los animales podían ser condicionados a tener aversión al sabor si este era apareado con un choque eléctrico y de la misma manera si un estímulo luminoso era apareado con irritación gástrica, el animal no presentaba ninguna respuesta ante la luz.

Esta evidencia sugirió que los circuitos involucrados en cada tipo de condicionamiento eran diferentes y por lo tanto los centros nerviosos en donde ocurrían los mecanismos de integración de los estímulos, tenían que tener ciertas peculiaridades. García planteó un esquema para los reflejos defensivos (ver esquema 3) en el cual explicaba como los estímulos exteroceptivos entre sí, podían entrar en una relación temporal y desarrollar un condicionamiento, mientras los estímulos gustativos y viscerales hacían lo mismo en otro sistema. La percepción olfativa representa un enlace entre ambos sistemas, esto debido a que se demostró que cuando un estímulo gustativo es apareado con malestar gástrico, se puede inducir la aversión al olor si este se acompaña de un estímulo gustativo, pero no si solo se aparean olor y malestar, de la misma manera, el estímulo olfativo puede ser relacionado temporalmente con un estímulo exteroceptivo.



Tomado de García y Cols., (1985), Annals. N. Y. Acad. Sci. 443, 8-21

Esquema 3. Mediante un diagrama de bloque se representan los sistemas defensivos externos e internos (visceral), ilustrando los diferentes estímulos que pueden entrar selectivamente en una relación temporal para desarrollar un condicionamiento. Cabe señalar que el olor se presenta como una compuerta entre los dos sistemas ya que puede ser relacionado temporalmente en ambos sistemas.

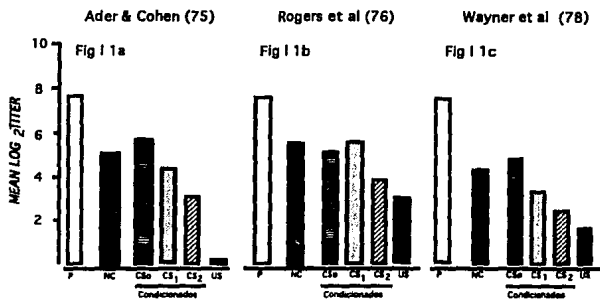
Tal vez reconociendo la idea de García, en 1974 Ader de la Universidad de Rochester, observó mortandad en animales a los cuales produjo CAS, utilizando sacarina (SAC) como estímulo gustativo y ciclofosfamida como el estímulo productor del malestar gástrico. La ciclofosfamida es bien conocida por su capacidad inmunosupresora y colateralmente produce irritación gástrica. El apareamiento de SAC y ciclofosfamida fué seguido de sesiones de extinción en intervalos de 3 días. Durante el curso de las reexposiciones a la sacarina, algunos de los animales murieron y el índice de mortandad variaba de manera directamente proporcional al volumen de sacarina consumida en el entrenamiento. Basándose en estas observaciones, Ader propuso que el apareamiento de un estímulo gustativo con una droga inmunosupresora resultaría en el condicionamiento de una respuesta inmunosupresora. La mortandad entonces, sería el resultado de la exposición repetida al estímulo condicionado, el cual, al producir un efecto negativo sobre el sistema inmune, permitiría que los animales fueran más susceptibles al ataque de agentes patógenos.

Estas especulaciones fueron probadas con experimentos controlados, para discernir el verdadero carácter de éste fenómeno. En 1975, Ader y Cohen utilizaron ratas Wistar separadas individualmente a las que se mantenía con restricción de agua, permitiéndoles beber durante un período de 15 min una vez al día, esto durante 5 días

para obtener un nivel basal de consumo de agua. Después de los 5 días de medición del consumo de agua, a tres grupos de ratas (CS1, CS2 y CSo) se les condicionó, por medio de la presentación de sacarina sódica al 0.1% en su bebedero, durante 15 min, apareada con la inyección por vía intraperitoneal (ip) de una solución de 50 mg/kg de ciclofosfamida. Otro grupo de animales, denominado no condicionado (NC) se le presentó agua apareada con ciclofosfamida (en trabajos posteriores este grupo recibió apareamientos de sacarina y ciclofosfamida de manera no contingente, observándose un efecto similar). Finalmente se utilizó un grupo control denominado placebo (P), al cual se le apareó la presentación de sacarina con solución salina isotónica.

Tres días después del condicionamiento, todos los animales fueron inmunizados con eritrocitos de carnero y 30 min después de la inmunización los grupos de animales condicionados (excepto el CSo), el grupo NC y el grupo P fueron expuestos a la sacarina, uno de los subgrupos CS recibió otra exposición a la sacarina 3 días después de la inmunización (CS2), el otro solo fué expuesto una vez (CS1), mientras al tercero (CSo) se le presentó solamente agua. Los grupos NC y CSo sirvieron como controles del condicionamiento. El grupo P representó a la respuesta inmune normal. Cabe mencionar que también se utilizó un grupo para evaluar el efecto incondicionado (US) de la ciclofosfamida, el cual recibió el mismo tratamiento que los grupos condicionados, pero el día de la reexposición a la sacarina fué reinyectado con ciclofosfamida. Seis días después de la inmunización se tomaron muestras de sangre de todos los animales, para medir, por medio de hemaglutinación, los títulos de anticuerpos de una respuesta inmune primaria.

Las ratas condicionadas reexpuestas a la sacarina presentaron una reducción significativa de su consumo de agua con sacarina el día o los días de la reexposición, en comparación a los animales P y a aquellos a los que se les presentó agua sola en lugar de la solución con sacarina (Fig I 1a). Los animales del grupo P como se esperaba, presentaron una respuesta inmune normal. La respuesta inmune de los animales NC y los del grupo CSo era semejante, pero un poco más baja que la de los controles. Los grupos CS1 y CS2 presentaron una clara inmunosupresión, la cual era mayor entre más reexposiciones recibían. Ambos grupos presentaron diferencias significativas en comparación a los grupos CSo, NC y P. Estos resultados apoyaron la hipótesis de que el apareamiento de sacarina y ciclofosfamida produciría un condicionamiento inmunosupresor (CIS), demostrándose que el efecto del estímulo condicionado era un efecto real, en virtud de que los grupos inyectados con ciclofosfamida pero sin la presentación del estímulo condicionado, no presentaban la misma supresión que aquellos condicionados que fueron reexpuestos a la SAC.



Tomado de Ader & Cohen (1985) *The Behavioral and Brain Sciences* 8:3 pp 378-394

Fig 1 1. Se muestran los resultados obtenidos en el CIS por tres diferentes grupos de investigación. En el eje de las X se muestran los títulos de anticuerpos contra eritrocitos de carnero a los seis días después de la inmunización y en el eje de la Y los diferentes grupos. Los títulos de anticuerpos están presentados en una escala logarítmica y en todos los casos se encontraron diferencias significativas entre los grupos condicionados y los controles ($p < 0.05$).

Estos trabajos fueron replicados más tarde por otros dos grupos de investigadores (Roger, Reich, Strom y Carpenter., 1976; Wayner, Flannery y Singer., 1978) quienes encontraron efectos semejantes (Fig 1 b y 1c) a los observados por Ader y Cohen (1975). El fenómeno de CIS se convirtió entonces en una importante línea de investigación que como Ader y Cohen, muchos otros investigadores siguieron. De esta manera se encontraron evidencias de que éste mismo paradigma sirve para obtener efectos supresores de la actividad de células NK (O'Reilly y Exon, 1986), disminución de la respuesta inflamatoria de hipersensibilidad tardía (Bovbjerg, Cohen y Ader, 1987) y disminución de la proliferación de linfocitos ante la estimulación con un mitógeno (Neveu, Dantzer y Le Moal., 1986).

A pesar de la gran cantidad de trabajos en los que el fenómeno de CIS se replicaba, algunos investigadores dudaban del carácter de condicionamiento de dicho fenómeno. Kelley y Dantzer (1986) afirmaban que "el conflicto que experimentaban los animales entre beber una solución aversiva o no beber en lo absoluto, les produciría un estado estresante, lo que incrementaría los niveles de corticoesteroides y produciría así una depresión inmune mediada por estrés". El argumento del conflicto entre beber y no

beber había sido resuelto por Ader y Cohen, quienes utilizando un modelo de exposición en el que se les daba a escoger entre agua y sacarina (esta última ya había sido apareada con la ciclofosfamida). Después de los 15 min de consumo se les forzaba a beber 5 ml de la solución de sacarina con un tubo conectado a una jeringa (Ader, Cohen y Bovbjerg, 1982), observándose el mismo fenómeno de inmunosupresión condicionada, el cual fué observado también por otros grupos (Rabin, Hunt y Lee, 1983). Además, se tenía ya evidencia de que el apareamiento de sacarina con LiCl no producía ningún efecto condicionado sobre la respuesta inmune, aún cuando se observaba un incremento de los corticoesteroides en plasma como respuesta incondicionada después de la inyección de LiCl, pero este incremento era producido también en animales a los que sólo se les privaba de agua y en animales condicionados a los que se les presentaba un estímulo novedoso no condicionado (Ader, 1976), lo que implicaba que el incremento de corticoesteroides no era suficiente para explicar una inmunosupresión condicionada. Roudebush y Bryant (1991) demostraron que el efecto inmunosupresor del estímulo gustativo estaba disociado del incremento de corticoesteroides. Ader y Cohen (1985) por su lado, habían presentado ya muchos trabajos en los que se demostraba que no existía una correlación entre el grado de aversión al sabor y la atenuación de la respuesta inmune, lo cual soportaba la idea de que se trataba de un condicionamiento por sí mismo y no uno mediado por estrés.

Mucha de la evidencia que surgió de las investigaciones con el paradigma de Ader y Cohen, apoyaba la idea de que este era un condicionamiento *per se*, sin embargo, la asociación entre CAS y CIS parecía ser la regla, lo que permitía seguir pensando en el CIS como un posible artefacto metodológico, o como un condicionamiento de segundo orden asociado al CAS. Inclusive los primeros estudios en donde se observó un condicionamiento inmunoactivador, es decir un procedimiento de aprendizaje en el que se condicionaba un incremento de la respuesta inmune ante la presentación del estímulo condicionado, se hacía uso del CAS (Jenkins, Chadwick y Nevin, 1983), lo cual sin embargo, también era evidencia de la no mediación por estrés, ya que si así fuera, no se hubiera presentado la inmunoactivación. Sin embargo, no fué sino hasta que se utilizó un modelo de CIS en el que el estímulo incondicionado era gástricamente inocuo, como una preparación de suero antilinfocitos (Kusnekov, Sivyver, King, Husband, Cripps, y Clancy., 1983; King, Husband, y Kusnekov., 1987), en donde se observa el CIS sin el CAS. En 1991 Gaucl, Bull, Schedlowski, Husband y King, observaron que no sólo se puede obtener CIS con suero antilinfocitos, sino que el uso del LiCl junto con el suero como estímulo incondicionado, no incrementa el efecto inmunosupresor condicionado, lo cual indicaba que el efecto gástrico no participaba en la inmunosupresión condicionada. Otros investigadores han observado que se puede obtener el CIS sin el CAS inclusive con drogas inmunosupresoras (Klosterhalfen y

Klosterhalfen, 1990), utilizando dosis bajas de dichas drogas para no producir la aversión, y efectuando algunas repeticiones del apareamiento para fortalecer el condicionamiento. Estos resultados dejan a un lado la idea de que el CIS sea un caso de condicionamiento secundario al CAS y hacen más evidente la idea de que el condicionamiento de la respuesta inmune es un caso de aprendizaje por sí mismo.

La atenuación de la respuesta inmune como efecto del CIS se ha observado tanto en ratas como en ratones, con diferentes dosis de ciclofosfamida (Ader y Cohen, 1981) u otros inmunosupresores y con diferentes estímulos gustativos (Ader y Cohen, 1981; Klosterhalfen y Klosterhalfen, 1987). También se ha obtenido el mismo efecto al variar otras condiciones experimentales como el intervalo entre la inmunización y la reexposición a la sacarina, o el intervalo entre el apareamiento de los estímulos y la reexposición al EC. Por ejemplo, se ha observado que la reexposición al estímulo condicionado antes de la inmunización, también puede decrementar la producción de anticuerpos en ratas (Ader, y cols., 1982) y lo mismo se ha observado en ratones (Schulze, Benson, Paule, y Robertss., 1988), lo cual sugiere que no es necesario que el sistema inmune esté activado por un reto antigénico para que ocurra la respuesta condicionada. Se ha demostrado además que el CIS obtenido con ciclofosfamida afecta la producción de anticuerpos de la clase IgM y no la de IgG o IgA (Kusnekov, Husband, y King, 1988)

La utilidad clínica del condicionamiento de la respuesta inmune se ha demostrado en experimentos en los que el CIS decrementa la tasa de mortandad en animales con enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso (Ader y Cohen, 1982) y así mismo, se ha visto que el CIS disminuye la probabilidad de rechazo a trasplantes (Grochowicz, Schedlowski, Husband, King, Hibberd y Bowen., 1991). Como se mencionó anteriormente, la respuesta inmune también puede ser modulada en el sentido opuesto al CIS, es decir, también se puede obtener un condicionamiento en donde el efecto del estímulo condicionado sea el de incrementar la respuesta inmune, a lo cual se le ha denominado condicionamiento inmuno activador. Esto se ha logrado con el apareamiento de un estímulo gustativo con un antígeno o con alguna molécula inmuno activadora. Jenkins, Chadwick y Nevin (1983) utilizaron un paradigma de CAS en el que incluyeron la inyección de un antígeno (eritrocitos de carnero) junto con el LiCl, encontrando un pequeño incremento en los títulos de anticuerpos a eritrocitos de carnero. Husband (1993) utilizó la inyección de un antígeno (ovalbumina) apareada con un estímulo gustativo, encontrando un incremento de la respuesta inmune contra este antígeno después de la reexposición al estímulo condicionado. También se ha obtenido un condicionamiento inmuno activador de las células NK en humanos con el apareamiento de un sabor e inyecciones intravenosas de epinefrina (Buske-Kirschbaum,

Kirschbaum, Stierle, Lehnert, y Hellhammer., 1992), lo cual también se ha visto en ratas, utilizando estímulos olfativos y observando que el incremento de la actividad de las células NK reduce la proliferación de tumores cancerígenos experimentales (Spector, 1993, comunicación personal).

Desde esta perspectiva, se ha propuesto desde hace algún tiempo que los problemas alérgicos pueden tener sus orígenes en procesos de condicionamiento inmune. Se sabe que gran parte de las reacciones alérgicas son evocadas por estímulos inmunológicamente neutros (Khan, 1977), lo cual implica que dichos estímulos debieron haber sido apareados previamente con un antígeno o alguna molécula que produjera un cambio inmunológico, para adquirir la capacidad de causar un tal efecto.

Es importante hacer notar que el fenómeno descrito por Ader y Cohen surgió de un paradigma de CAS, el cual como se menciono anteriormente, su expresión es fuerte y de larga duración, al igual que el CIS, y a diferencia de los experimentos realizados por los investigadores rusos, en los cuales se obtiene una respuesta condicionada débil y transitoria, producto de un gran número de apareamientos, el CIS se obtiene en un sólo ensayo. Esto probablemente se pueda explicar con el esquema de los reflejos defensivos de García, lo cual no implica la imposibilidad de desarrollar condicionamientos con estímulos poco afines, pero si, que existen reflejos condicionados más naturales, o mejor dicho que forman parte de los procesos evolutivos de los organismos, mientras que algunos reflejos condicionados son difíciles de obtener, debido a que el organismo no cuenta con sistemas neurales predeterminados para ellos y se tienen que implementar casi a la fuerza, lo que significa que el sistema neural activado tiene que sufrir cambios plásticos complejos que no son fáciles de elaborar por parte del sistema nervioso y por lo cual se obtienen con mayor dificultad y menor fuerza. Sin embargo, existen sistemas neurales que facilitan la adquisición del aprendizaje, por ejemplo, como el sistema neural que subyace al CAS y que probablemente también este mediando el CIS. En este sentido debemos darle especial atención al sistema de defensa visceral descrito por García, ya que tanto el CAS como el CIS involucran el apareamiento de un estímulo gustativo u olfativo, con información proveniente del medio interno, lo cual los podría clasificar como casos de condicionamientos interoceptivos. Este argumento explicaría porque en los experimentos de la escuela Rusa, aún cuando pudieron demostrar el condicionamiento de la respuesta inmune y una gran cantidad de ejemplos de condicionamiento visceral, éstos se obtenían sólo después de una gran cantidad de apareamientos y eran fáciles de extinguir. Es decir, debido probablemente, a que las rutas neurales que se tenían que formar, por así decirlo, no estaban predeterminadas y los cambios plásticos tenían que ser muy amplios. En el caso del condicionamiento inmune seguramente el sistema nervioso está programado para integrar ese tipo de estímulos, ya

que evolutivamente hablando es de gran importancia que el organismo aprenda en un solo ensayo cuando un alimento contiene a algún antígeno, ya que al paladear por segunda vez el alimento, este se preparará inmunológicamente para recibir al posible agente patógeno.

Cabe hacer notar que en el caso de Pavlov, se observa el primer intento de explicar los mecanismos neurales que subyacen al aprendizaje, por lo cual se han mencionado brevemente algunas de sus especulaciones al respecto, intentando así ejemplificar el interés de parte de la fisiología por describir la manera en que la actividad dinámica de el sistema nervioso y sus cambios plásticos, generan la posibilidad del desarrollo de diversos tipos de aprendizaje.

El fenómeno de condicionamiento de la respuesta inmune que más se ha caracterizado es el del CIS a través del apareamiento de sacarina con ciclofosfamida, midiendo el efecto con la titulación de anticuerpos en animales inmunizados con eritrocitos de carnero. No obstante que el CIS ha sido suficientemente estudiado, se conocen de manera muy vaga los mecanismos celulares implicados, como los datos que indican que los linfocitos T son más afectados por el CIS que los linfocitos B (Ader y Cohen., 1993), y en otros se habla de la participación de receptores adrenérgicos en linfocitos como mediadores del CIS (Luecken y Lysle., 1992). Más aún, los mecanismos nerviosos que subyacen al CIS aún no se han descrito y tampoco se tiene ninguna evidencia que sugiera la participación de alguna de las vías de comunicación entre el sistema nervioso y el sistema inmune antes descritas. Sin embargo el hecho de que el CIS se haya obtenido fácilmente con el apareamiento de un estímulo gustativo con un inmunomodulador, hace pensar que el CIS es un caso de aprendizaje que cae en la categoría de condicionamiento visceral, de acuerdo al esquema de García. Por esto, es posible que algunas de las unidades neurales del sistema de defensa visceral implicadas en los mecanismos de regulación del CAS, estén también implicadas en el CIS. En este sentido, una de las estructuras neurales más estudiadas con respecto a su participación en el CAS, es la corteza insular, la cual presenta relaciones anatómicas y funcionales que apoyan la idea de su participación en el CIS.

VI

La Corteza Insular y su Posible Relación con la Inmunosupresión Condicionada

Más de una década después del descubrimiento del CAS se dió una explosión de investigaciones con este paradigma (Barker, Best y Domjan, 1977; Domjan, 1980); por ejemplo, se estudiaron los mecanismos cerebrales de los procesos de aprendizaje gustativo. Probablemente debido al aparente papel que jugaba el sistema límbico en las conductas de evitación, olfativas y en la reactividad visceral (MacLean, 1972), la búsqueda de los mecanismos cerebrales involucrados en el CAS empezó con estructuras de este sistema. Los primeros trabajos exploraron los efectos de lesiones septales (McGowan, García, Ervin y Schwartz, 1969), lesiones del hipocampo (Miller, Elkins y Peacock, 1971), lesiones hipotalámicas (Gold y Proulx, 1972) y lesiones de la amígdala (Nachman y Ashe, 1974) sobre el CAS, sin encontrar datos contundentes acerca de la participación de estas estructuras en esta clase de aprendizaje. En 1972 se reportó que una región cortical conocida en ese entonces como corteza gustativa estaba involucrada en el CAS (Braun, Slick y Lorden, 1972), en vista de que las lesiones de esta región producían considerables déficits en el aprendizaje de evitación al sabor.

La corteza insular (CI) como se conoce actualmente a lo que se llegó a llamar corteza gustativa es una región que en la rata ocupa aproximadamente 1 x 3 mm de área, se encuentra localizada en la confluencia de la arteria cerebral media y el surco rinal en la rata, lo que representa las áreas 13 y 14 de Krieg. Se consideró a esta corteza como la corteza gustativa primaria, basándose en sus relaciones anatómicas con los núcleos ventrobasales del tálamo (Frommer, 1961), lo cual coincidía con el criterio anatómico de una corteza sensorial. Más adelante se confirmó la idea con evidencias electrofisiológicas, en las que la estimulación de la lengua con estímulos gustativos producía efectos sobre esta corteza (Yamamoto y Kawamura, 1972), por lo cual comenzaron a estudiarse sus relaciones anatómico funcionales con las aferencias gustativas.

Se sabía ya que las fibras gustativas periféricas de los pares craneales VII (intermedio facial), IX (glosofaríngeo) y el X (vago) se proyectan directamente al núcleo del tracto solitario (NTS), y las proyecciones gustativas secundarias forman parte de las vías lemnisco trigémino talámicas (Ruch, Patton, Woodbury y Towe., 1966), las cuales hacen sinapsis dentro del complejo ventrobasal talámico (Braun, Lasiter y Kiefer, 1982). Los núcleos postero ventromediales (VPM) del tálamo reciben aferencias gustativas

(Patton, 1950) y las lesiones de esta región producen un incremento en el consumo de quinina (Patton, Ruch y Walker., 1944), la cual es naturalmente aversiva para la rata. Se ha demostrado también que las fibras gustativas secundarias que salen del NTS hacen sinapsis dentro del núcleo parabraquial del puente (Norgren y Leonard, 1973) y estas células proyectan sus fibras a los núcleos VPM del tálamo. Con estudios de transporte axonal se ha observado también que las neuronas del NTS tienen axones que proyectan además a los núcleos parabraquial del puente, a los núcleos centrales de la amígdala, a los núcleos subtalámicos, a la sustancia innominata, al hipotálamo anterior y a los núcleos basales de la estria terminalis (Norgren, 1978; Ricardo y Koh, 1978). Cabe señalar que en su momento se ha demostrado la participación de los núcleos parabraquial del puente y el NTS en la percepción de los sabores, por medio del uso de técnicas de lesiones. Los estudios de Benjamin y Akert (1959) representaron en su momento una síntesis anatómica, electrofisiológica y conductual de los datos en los cuales se localizaba una corteza gustativa dentro del campo somático facial y otra en la ínsula de la rata. Se demostró posteriormente que existen proyecciones funcionales de los núcleos VPM del tálamo hacia estas regiones corticales (Wolf, 1968), lo cual parecía hacer más evidente la participación de estas cortezas en la percepción gustativa.

Sin embargo, durante mucho tiempo sólo se le otorgó importancia a la corteza somatosensorial en el reconocimiento de los estímulos gustativos, aún cuando la estimulación de la lengua por medio de otras formas de estimulación diferentes, como la estimulación térmica y la mecánica, producían efectos semejantes a la estimulación propiamente gustativa. Se observó también que las neuronas que respondían principalmente a estimulación gustativa estaban localizadas en la parte más ventral y posterior de la corteza gustativa definida por Benjamin y Pfaffman (1955), la cual se refiere a la corteza somatosensorial en su representación facial. A pesar de esto existían datos que implicaban a la CI como una corteza gustativa adicional. En 1959 Benjamin y Akert propusieron a la CI como una región cortical de gran importancia para la sensibilidad gustativa, debido a que la estimulación tanto eléctrica como química de la lengua producía potenciales evocados en la CI y con registros unicelulares se observaban cambios en la actividad eléctrica de sus células.

En 1975 Braun y Kiefer, interesados en determinar si la CI realmente estaba involucrada en la percepción de los sabores, realizaron lesiones de la CI y midieron el consumo de diferentes concentraciones de quinina, salina y sacarosa, encontrando que las ratas con ablaciones de esta corteza, consumían diferentes cantidades de las diversas concentraciones de las soluciones antes mencionadas, al igual que los animales intactos, observándose sólo un pequeño incremento del consumo en la parte media del gradiente de concentración, lo cual indicaba que la CI no estaba involucrada directamente en la

discriminación de los sabores y sugería que las ratas con lesión en CI eran más sensibles a los pequeños cambios en la concentración del sabor. En muchas otras investigaciones, se demostró que las ratas con lesión en CI no cambiaban su preferencia a los sabores dulces, ni su natural aversión a sabores como la quinina (Kiefer, 1985; Braun y col., 1982), lo cual al ser comparado con los animales intactos se observaba de manera similar. Esto junto con datos en donde se observa que la capacidad de responder diferencialmente a concentraciones variables de diversos sabores, se afecta con lesiones de la corteza insular, apoya la idea de que la CI no es importante para la percepción y discriminación de los sabores (Fig 1 2).

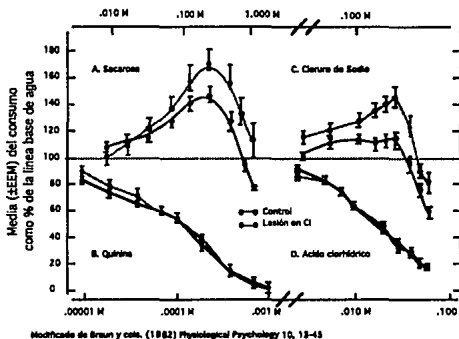


Fig 1 2. Se muestra la media (\pm EEM) del consumo (eje y) de soluciones a diferentes concentraciones (eje x) de sacarosa, cloruro de sodio, quinina y ácido clorhídrico en ratas con lesión en corteza insular y en animales intactos. La línea punteada en el 100% de el eje de las ordenadas representa el consumo basal de agua.

Yamamoto, Matsuo y Kawamura (1980) observaron como las lesiones de CI causaban severos déficits en el aprendizaje y la retención del CAS, mientras que las lesiones en otras regiones corticales que recibían información gustativa no afectaban la retención de dicho paradigma. Años atrás, una gran cantidad de evidencia había demostrado que la CI estaba involucrada en el CAS (Braun y cols., 1972; Divac, Gade y Wikmark, 1975). Estos datos sugirieron que la CI estaba involucrada en los procesos cognoscitivos relacionados a estímulos gustativos más que en los procesos perceptuales de dichos estímulos.

Braun, Lasiter y Kiefer (1982) mencionan que el efecto observado en los animales con lesión en corteza insular en donde se observa un pequeño desajuste de la curva de discriminación, es una pequeña alteración de la discriminación fina de los sabores, probablemente debido a que se ven afectados los aspectos cognoscitivos de la integración de estímulos gustativos.

La CI también se ha caracterizado por su importancia en la integración de estímulos viscerales. Esta región cortical presenta relaciones anatómico funcionales con el NTS (Van der Kooy, McGinty, Koda, Gerfen, y Bloom., 1982), el cual es un núcleo en donde converge gran cantidad de información visceral y por lo cual se estudiado la representación de los estímulos viscerales en la CI, en donde se ha encontrado que efectivamente, la CI está involucrada en la representación cortical de dichos estímulos. Inclusive, algunos autores se han referido a la CI como corteza visceral (Kiefer, 1985; Lasiter, Glanzman y Mensah., 1982), ya que recibe la entrada de información proveniente de las vísceras, por medio del NTS y es importante para la integración de este tipo de estímulos (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991).

En trabajos recientes, Rosenblum, Meiri y Dudai (1993) observaron que tanto los estímulos gustativos, como los estímulos viscerales producen pequeños incrementos en la síntesis de proteínas en células de CI, mientras que el estímulo gustativo una vez apareado con la irritación gástrica produce por sí solo, un aumento significativamente mayor de la síntesis proteica. El hecho de que la CI reciba información tanto de las vísceras como de las vías gustativas, hizo de ésta una región importante para la integración de los estímulos involucrados en el CAS, por lo cual se ha dejado de considerar a la CI como una corteza gustativa o visceral, o como una región involucrada en la percepción de dichas cualidades sensoriales y se ha comenzado a estudiar su papel en el aprendizaje.

Se ha observado que las lesiones de CI tienen efectos sobre otros tipos de aprendizajes como la prevención pasiva y el laberinto de agua de Morris. La prevención pasiva es un paradigma de evitación que consiste en colocar a una rata en una caja de dos compartimientos, en donde uno es claro y el otro oscuro. Las ratas son colocadas en el lado claro de la caja y naturalmente tienden a refugiarse en el lado oscuro. Cuando la rata pasa al compartimiento oscuro, se le da un choque eléctrico en las patas, de tal forma que el aprendizaje consistirá en no pasar al lado oscuro, o bien disminuir considerablemente el tiempo de estancia en dicho compartimiento. Utilizando lesiones químicas de la CI, con las cuales se destruyen preferencialmente somas y se dejan intactas las fibras de paso, se produce un severo déficit en el aprendizaje de la prevención pasiva, evidenciado por un decremento significativo en la latencia de

entrada al compartimiento oscuro y un incremento en la estancia dentro de éste (Dunn y Everitt, 1988; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991). Con lesiones reversibles de la CI, utilizando tetrodotoxina, la cual bloquea los canales de sodio, se ha observado como la ejecución en el laberinto de agua de Morris también se ve afectada (Bermúdez-Rattoni, Introini-Collison y McGaugh, 1991). Este paradigma consiste en colocar al animal en una tina de agua, en donde tiene que encontrar refugio sobre una plataforma, la cual es retirada después de que el animal ha sido entrenado para ver si recuerda el lugar en donde estaba situada y medir el número de veces que cruza sobre la región que ocupaba la plataforma. De esta manera se demostró que la CI estaba involucrada en un aprendizaje de tipo espacial, como lo es el del laberinto de agua, y en un condicionamiento de evitación de lugar, los cuales al igual que el CAS, tienen en común que son aprendizajes motivados aversivamente; es decir implican la elaboración de un valor hedónico negativo de los estímulos condicionados y probablemente ocurren por medio de las relaciones de la CI con estructuras del sistema límbico.

Estos datos apoyan la idea de que la CI está involucrada en cuestiones de aprendizaje, es decir en los aspectos cognoscitivos de la integración de diversos estímulos, en especial de estímulos gustativos y viscerales, los cuales se requieren para la elaboración de un CAS. Además, en virtud de que el CIS requiere de la integración de estímulos gustativos con información proveniente del sistema inmune, es posible pensar que la CI integre también este tipo de estímulos. En este sentido, algunas evidencias indican que el sistema inmune, al ocurrir la liberación de factores (como las interleucinas), puede informar al sistema nervioso acerca de los cambios que este sufre, ya sea por medio de receptores en el sistema nervioso autónomo (Saito y cols., 1991) o a través de receptores en regiones del sistema límbico (Cunningham y De Souza., 1993) como el hipocampo o la amígdala, con los cuales la CI tiene relaciones anatómicas y funcionales (Kieffer, 1985).

De esta manera, las relaciones anatómicas de la CI la hacen un buen candidato para la integración de los estímulos relacionados al CIS, y probablemente sea una estructura neural en donde se lleven a cabo algunos de los mecanismos involucrados en la regulación de la respuesta inmune por medio de procedimientos de aprendizaje, ya que presenta conexiones con el hipocampo, y la amígdala, (Kieffer, 1985) las cuales presentan receptores para citocinas (Cunningham y De Souza., 1993) y bien pueden ser las estructuras neurales responsables de informar a la CI de lo que ocurre en el sistema inmune. Más aún, existen otras estructuras importantes en la modulación neuroinmune, con las cuales la corteza insular se comunica, como el hipotálamo (vía la amígdala) y el sistema nervioso autónomo, a través de conexiones bidireccionales con el NTS (Lasiter, y cols., 1982) y los núcleos parabraquial del puente. De hecho parece ser

que la CI es la única estructura cortical que se conoce tiene relaciones directas con el NTS (Van der Kooy y cols., 1982). En suma, las dos vías que se han involucrado en la interacción entre el sistema nervioso central y el sistema inmune, son la vía hipotalámica y la que representa el sistema nervioso autónomo, y ambas están relacionadas a la CI, lo que hace de esta, una estructura importante como candidato para modular los mecanismos neurales que subyacen al CIS.

Planteamiento del Problema, Definición de Variables e Hipótesis

De la revisión de la literatura se puede concluir lo siguiente: Existe evidencia de la relación entre la corteza insular y el condicionamiento aversivo a los sabores; de las relaciones anatómico-funcionales entre esta región cortical y estructuras involucradas en la neuroinmunomodulación. También hay evidencia de una posible relación entre el CAS y el CIS (ambos pueden ser concebidos como casos de condicionamiento interoceptivo). En este contexto, el propósito general del presente estudio es determinar los sustratos neurales del condicionamiento de la respuesta inmune. Específicamente, el objetivo será evaluar los efectos que lesiones de la CI tienen en la adquisición de una tarea de CIS, como la descrita originalmente por Ader y Cohen (1975), quienes aparean sacarina y ciclofosfamida, debido a que este modelo de condicionamiento de la respuesta inmune es el más estudiado y del que más información se tiene. En el condicionamiento de la respuesta inmune, como se menciona en el capítulo V, el apareamiento contingente de sacarina y ciclofosfamida provoca que el estímulo gustativo por sí solo induzca una inmunosupresión condicionada. La manera de medir esta inmunosupresión, en general, es mediante la titulación de los anticuerpos presentes en el suero de los animales, y una de las técnicas más sencillas y mejor establecidas es la de hemaglutinación.

La variable dependiente es la respuesta inmune de animales entrenados en el CIS, la cual podrá ser determinada mediante los títulos de anticuerpos de una respuesta inmune primaria medidos mediante hemaglutinación directa, utilizando el suero de los animales como fuente de anticuerpos, y los eritrocitos de carnero como antígeno. En donde se espera que los animales que muestren el efecto condicionado sobre la respuesta inmune producto del CIS, tendrán títulos bajos de anticuerpos para eritrocitos de carnero y aquellos que no presenten inmunosupresión condicionada deberán tener títulos de anticuerpos normales, es decir, acordes a una respuesta inmune primaria.

Adicionalmente se evaluará la expresión del CAS por medio del consumo de sacarina, que comparado con el consumo basal de agua dará un indicador de aversión o preferencia.

La variable independiente es la lesión de la CI, la cual se realizará con infusiones bilaterales de N-metil-D-aspartato (NMDA) en la CI, con lo se obtienen lesiones en donde se afectan preferencialmente somas neurales, dejando las fibras de paso intactas. Esta técnica de lesión, permite además obtener lesiones más precisas y delimitadas por la

cantidad de solución infundida, permitiendo resolver preguntas acerca de la participación de las células susceptibles a esta toxina, en el fenómeno a estudiar, dejando a un lado la discusión acerca de la participación de las fibras de paso.

Cabe señalar que se utilizará el diseño de comparación entre grupos, debido a que este tipo de estrategia de evaluación es la misma que se utiliza para evidenciar el efecto del CIS (Ader y Cohen, 1975, 1982) y para resolver preguntas acerca de los efectos de lesiones en la adquisición de tareas de aprendizaje (Bermudez y McGaugh, 1991).

Hipótesis:

Los mecanismos neurales necesarios para la adquisición de el CIS se llevan a cabo en las células de la CI. Por ello, se requiere de la integridad de la CI para que el CIS pueda ser adquirido por el animal, lo que implica que las lesiones químicas de la corteza insular han de impedir la adquisición del CIS, observándose que los animales con lesiones de la CI y los cuales hayan sido entrenados en el CIS por medio del apareamiento de sacarina y ciclofosfamida y en su momento reexpuestos al estímulo condicionado, presentarán títulos de anticuerpos significativamente mayores que los animales condicionados con lesiones control y que en animales condicionados intactos, lo cual reflejará la ausencia del efecto condicionado producto del CIS.

Método

Sujetos:

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de 6 semanas de edad, situadas en un ciclo invertido de luz oscuridad de 12:12 horas dentro de un cuarto aséptico, separadas y marcadas en cajas individuales. Todos los experimentos se efectuaron durante la fase oscura del ciclo. Antes de comenzar el experimento todos los animales fueron desparasitados con una solución de Averdan® al 0.5% (150 ml por animal), para tener un cierto grado de homogeneidad de la respuesta inmune al disminuir las modificaciones en la inmunidad debido a parásitos. A todo lo largo del experimento los animales se mantuvieron con comida y agua *ad libitum* excepto durante los procedimientos para establecer la línea base de consumo de agua. La razón por la cual se mantiene a los animales en un ciclo de luz oscuridad invertido es que de esta forma se puede trabajar con las ratas en su fase de mayor actividad; además se establecen de manera más precisa las fluctuaciones homeostáticas de los diferentes ciclos circádicos, de los cuales, algunos como el ciclo de secreción de corticosteroides, afectan los niveles de la respuesta inmune.

Lesiones:

Las lesiones se realizaron mediante técnicas esterotáxicas en dos estructuras de la corteza cerebral, utilizando las siguientes coordenadas: corteza insular, AP +1.2, L \pm 5.5 y DV -5.5; corteza parietal, AP +1.2, L \pm 4 y DV -1.5. Para producir la lesión se utilizó NMDA, ya que se ha reportado que lesiones excitotóxicas con NMDA en la CI interfieren con la adquisición del CAS (Bermudez-Rattoni y McGaugh, 1991). El NMDA (Sigma Co., St Louis, MO; 10 μ g/ μ l en una solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.4, 0.1M) se coloca en una micro aguja (Becton Dickinson Co., Cuautitlán Izcalli, E de M) conectada a un pequeño tubo de polietileno (PE-10, Becton Dickinson Co., Parsippany, NJ) con una microjeringa Hamilton (Hamilton Co., Reno, NV) colocada en una bomba de infusión (SAGE Co.). Cada animal recibió inyecciones bilaterales de 0.6 μ l de la solución con NMDA, la cual fue inyectada durante un lapso de 2 minutos, con la ayuda de la bomba de flujo constante. Después de la inyección, la aguja se dejó durante 3 minutos más para permitir la difusión del fluido.

Condicionamiento:

Antes del entrenamiento en el CIS, todos los animales fueron privados de agua durante 24hrs, y se les tomó la línea base de su consumo de agua durante 4 días (10 min de consumo 2 veces al día 9am-9pm). El quinto día se les presentó la sacarina a las 9:00am en una probeta graduada para medir su consumo, permitiéndoles beber durante 10 min, inmediatamente después se les inyectó 50mg/Kg de ciclofosfamida (Sigma Co., St Louis, MO) intraperitonealmente, dejándoles nuevamente el agua *ad libitum* 5 hrs después del apareamiento de los estímulos. Se dejó el agua *ad libitum* durante 15 días, durante los cuales se dejó pasar el efecto inmunosupresor de la ciclofosfamida. Después de estos 15 días de espera, se privó nuevamente a los animales para comenzar una segunda línea base de consumo de agua, la cual duró también 4 días. Al final de ésta, es decir al 5º día, se reexpuso a los animales a la sacarina durante 10 min, midiéndoles el consumo de ésta para compararlo en términos de porcentaje con la media del consumo de agua de los últimos dos días. Así se obtuvo un indicador de la aversión o preferencia al sabor, en donde la aversión estará dada por valores cercanos a 0 y siempre menores al 50% con respecto a la media del consumo basal de agua, mientras que la preferencia se representa por valores superiores al 100% de dicha media.

Inmunización y Titulación de Anticuerpos:

Al quinto día de la segunda línea base y 30 minutos antes de la reexposición a la sacarina se inmunizó a todos los animales con eritrocitos de carnero (2ml/Kg de eritrocitos al 1% en solución salina fosfato .15M 7.4 pH). Se tomaron muestras de sangre obtenidas por medio de una incisión en la cola de la rata (Akana, Scribner, Bradbury, Strack, Walker y Dallman, 1992), a los 4 (muestra A), 8 (mB) y 12 (mC) días después de la inmunización, de aproximadamente 1.5 ml de sangre, cada una de estas muestras se dejó durante 4 hrs a 36 C° para permitir la formación de un coágulo que facilitara la separación del suero. Después de esto, las muestras de sangre se centrifugaron a 3500 rpm para separar el suero con una pipeta calibrada en 100µl, obteniendo un volumen final de suero de aproximadamente 600µl por muestra.

Para hacer la determinación de los títulos de anticuerpos en el suero, se utilizó la técnica de hemaglutinación directa, debido a que es una técnica fácil de implementar, regularmente usada en otros experimentos de condicionamiento inmunosupresor, y que está muy bien establecida para determinar anticuerpos en suero (Gatermann, Meyer y Wanner, 1992). Se hicieron las adecuaciones correspondientes para el presente experimento, en donde se utilizaron los eritrocitos de carnero como antígeno y al suero de la rata como la fuente de anticuerpos. Inicialmente los sueros son calentados a 56°

durante 15 min para eliminar el complemento y evitar así la lisis de los eritrocitos. Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos, en estos pozos se colocan 50µl de solución salina fosfato con gelatina al 0.1% (SSFcG), para así colocar 50µl del suero y hacer las diluciones para la determinación, de manera tal que el primer pozo estará a una dilución 1:2 y el último de 1:256. Si el título de la muestra no se determina con estas diluciones, se procede a realizar diluciones empezando con 1:10. Una vez efectuadas las diluciones se colocan 25µl de eritrocitos de carnero al 1% en SSFcG, dejándose agitar durante 30 min, al final de los cuales se refrigera para tomar las lecturas al día siguiente. Cuando se observa la aglutinación de los eritrocitos, se le denomina como positivo, y se cuantifica con respecto a la dilución en donde se encuentre el último título positivo, siendo este el título final de la muestra. Cabe señalar que todas las muestras se hacen por duplicado, y cuando se observan discrepancias entre una misma muestra se procede a repetir la prueba para dicha muestra.

Histología:

Con el fin de observar el lugar en donde se realizó la lesión se efectuaron las técnicas histológicas de Nissl y la de Colinesterasa modificadas de Paxinos y Watson (1982) en cortes coronales de 40µm del cerebro fijado con paraformaldehído al 4% en una solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4). Una vez montados y teñidos se observan al microscopio óptico y se eliminan aquellos animales en los que la lesión no se localizó en la región deseada.

Es importante señalar que se realizaron 3 experimentos; el primero sirvió para ver el efecto de las lesiones de corteza insular en la adquisición del CIS, el segundo se realizó para evaluar el efecto de las lesiones de corteza insular en la respuesta inmune normal y el último se efectuó con el fin de observar si las lesiones de corteza insular afectaban la inmunosupresión causada por la ciclofosfamida.

EXPERIMENTO 1

Procedimiento:

Para evaluar el efecto que las lesiones de CI tienen en el CIS se utilizaron cinco grupos, un grupo control intacto (CS n=8), uno lesionado en CI (CS-LxCI n=10), otro con lesión en corteza parietal (CS-LxCP n=10), el cual se introdujo para observar la especificidad del efecto de la lesión con NMDA en la CI, como un control cortical, además de que esta región cortical esta involucrada en otros tipos de aprendizaje. Se utilizó además un grupo con lesión fantasma en la CI (CS-ShCI), al cual solo se le inyectó la solución amortiguadora de fosfatos (0,1M, pH 7.4) en lugar de la solución con NMDA. Finalmente se presenta también un control del condicionamiento que es utilizado frecuentemente en los experimentos de CIS (Ader y Cohen, 1982; O'Reilly y Exon, 1986), el cual es un control intacto al que se le da el apareamiento de SAC y ciclofosfamida sin reexponerlo a la SAC (CS₀), con el cual se puede aislar el efecto condicionado y hacer evidente que la inmunosupresión condicionada es causada exclusivamente, como efecto de la reexposición a la sacarina y no como efecto a largo plazo de la ciclofosfamida. En el día 0 (Ver Tabla I para aclarar los tiempos del protocolo experimental) se tomaron muestras de sangre de todos los animales, aproximadamente 1.5 ml por animal, las cuales servirían como línea base de los anticuerpos para eritrocitos de carnero, esperando títulos cercanos a 0, debido a que los animales no habían sido expuestos antes al antígeno. Tres días después los grupos CS-LxCI, CS-LxCP y CS-ShCI fueron operados, provocando lesiones químicas a los primeros dos grupos, mientras el tercero fue operado en las mismas condiciones que los otros dos, inyectando el vehículo en lugar de la solución con NMDA, con el fin de observar si el efecto de la lesión era causado exclusivamente por el NMDA. El día 12 a las 9:00 am se le quitó el agua a todos los animales y al día siguiente se comenzó a tomar el consumo de línea base. El día 16 a todos los grupos se les dió la adquisición del CIS, es decir el apareamiento de sacarina y ciclofosfamida. Se esperó 15 días para que pasara el efecto inmunosupresor de la ciclofosfamida, de tal manera que el día 31 se volvió a privar a los animales de agua reexponiéndolos a la SAC el día 35, excepto al grupo CS₀, al cual se le presentó agua destilada en lugar de sacarina. En éste mismo día se inmunizó a todos los animales a las 8:30 am, es decir 30 min antes de la reexposición a la SAC. Así, los días 39 (mA), 43 (mB) y 47 (mC) se tomaron las muestras de sangre.

Tabla I. Protocolo experimental de los tres experimentos. mLB=muestra de línea base; mA= muestra A; mB= muestra B; mC= muestra C; Lx= lesión; Sac=sacarina; Cy= ciclofosfamida; I= inmunización con eritrocitos de carnero, el signo + representa el apareamiento, mientras el - indica que se realizó el procedimiento el mismo día. El punto indica la aplicación del tratamiento.

Experimento1	Días								
	0	3	12	16	20	35	39	43	47
Tratamiento	mLB	Lx		Sac+Cy		I- Sac	mA	mB	mC
CS	●			●		●	●	●	●
CSo	●			●		●	●	●	●
CS-LxCI	●	●		●		●	●	●	●
CS-LxCP	●	●		●		●	●	●	●
CS-ShCI	●	●		●		●	●	●	●

Experimento 2									
Tratamiento	mLB	Lx		Sac+Sal		I- Sac	mA	mB	mC
Ctrl	●			●		●	●	●	●
LxCI	●	●		●		●	●	●	●

Experimento 3						
Tratamiento	mLB	Lx	I- Cy	mA	mB	
Ctrl	●		●	●	●	
LxCI	●	●	●	●	●	

Resultados:

Se observó que en la muestra basal de suero, todos los grupos presentaron títulos bajos de anticuerpos contra eritrocitos de carnero con medias cercanas a 0, lo que implica la ausencia, o la existencia de muy baja cantidad de anticuerpos que cruzan con los antígenos del eritrocito de carnero en los animales no inmunizados. Para el análisis de datos de los títulos, se utilizaron pruebas no paramétricas, en virtud de que los títulos están expresados en una escala ordinal. Para ver las diferencias entre los grupos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y para las comparaciones entre grupos la U-de Mann-Whitney. En la Figura 1a y 1b se muestran los resultados de las hemaglutinaciones de los días 0 (mLB), 39 (mA), 43 (mB) y 47 (mC), en donde se observa que los grupos CS, CS-LxCP y el CS-ShCI presentan títulos de anticuerpos muy bajos en todas las muestras, lo que se debe al efecto del CIS. El grupo CS-LxCI mostró significativamente mayor cantidad de anticuerpos al ser comparado con los grupos CS, CS-LxCP y CS-ShCI en las dos primeras pruebas mA y mB ($p < 0.01$ y $P < 0.05$ respectivamente). Sin embargo, en la última muestra las diferencias no fueron significativas, con una $P = 0.08$. El grupo CSo presentó títulos de anticuerpos significativamente mayores comparado a los grupos CS, CS-LxCP y CS-ShCI durante las tres muestras (mA $P < 0.01$, mB $P < 0.05$ y mC $P < 0.05$), lo cual demuestra que la inmunosupresión observada en los otros tres grupos es exclusivamente causada por el

condicionamiento. Cabe por último mencionar que en ninguna de las tres muestras se obtuvieron diferencias entre los grupos CS, CS-LxCP y CS-ShCI, lo cual implica en que las lesiones de la corteza parietal no tuvieron ningún efecto en la adquisición del CIS y que el efecto es causado exclusivamente por las lesiones inducidas por el NMDA en la CI.

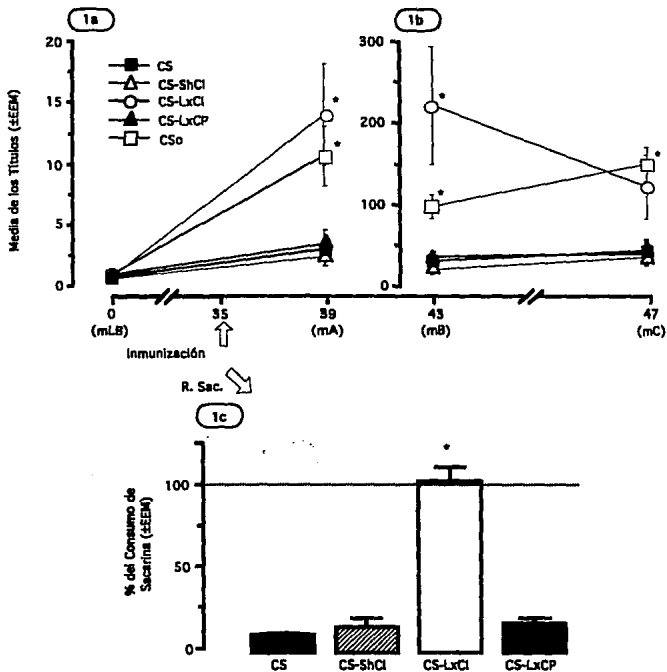


Figura 1. Se muestra el efecto de las lesiones de CI en la adquisición del CIS y CAS. En la Fig 1a se presentan los títulos de anticuerpos para eritrocitos de carnero (eje Y) durante las muestras (eje X) de línea base y la muestra A (4 días después de la inmunización). En la figura 1b se presentan los títulos de anticuerpos de la muestras B (8 días) y C (12 días). En la Fig 1c se representan los resultados del consumo de sacarina con respecto a la línea base en los tres diferentes grupos (el consumo basal de agua de los últimos dos días representa el 100%). En ambas gráficas los asteriscos implican diferencias significativas ($p < .01$) comparando contra los controles (CS). El grupo CSo no se presenta en la figura 1c debido a que no fue reexpuesto a la sacarina.

Para evaluar el CAS se tomó el porcentaje de consumo de sacarina con respecto al promedio de los últimos dos días de línea base (consumo de sacarina/el consumo promedio de 2 días de línea base x 100). De tal manera que los datos cercanos al 100% implican una preferencia, mientras que la aversión estará expresada por valores que sean cercanos al 50%. Análisis de varianza de una vía, mostró que en el porcentaje del consumo de sacarina de el día 35 hubo diferencias significativas entre los grupos controles y el CS-LxCI ($F_{5,48} = 79.4$; $p < 0.001$). En la figura 1c se puede apreciar que los animales de los grupos CS, CS-ShCI y CS-LxCP presentaron una marcada aversión a la sacarina, lo que indicó la presencia de un CAS en estos animales. El análisis *post-hoc* de los datos del consumo mostró que el grupo CS-LxCI presentó una significativa disminución en la aversión a la sacarina al ser comparado con los grupos CS, CS-ShCI y CS-LxCP (p 's < 0.01).

EXPERIMENTO 2

Procedimiento

Con el propósito de evaluar el efecto que las lesiones de CI tienen en la respuesta inmunológica normal, esto es, sin ningún tipo de condicionamiento, se efectuó el siguiente experimento. Se utilizaron dos grupos de animales: un grupo control intacto (Ctrl n=8) y otro grupo lesionado en la CI (LxCI n=8). En el día 0 del protocolo experimental (ver Tabla 1) se tomaron muestras de sangre de línea base, en el día 3 los animales del grupo LxCI recibieron la lesión en la CI y 9 días después a ambos grupos se les privó de agua desde las 9:00 am para que al siguiente día se tomara la línea base del consumo de agua. El día 16 se les presentó sacarina seguida inmediatamente después por una inyección ip de solución salina isotónica (0.15M, pH 7.4). El día 31 se privó de agua nuevamente a los animales para que el día 35 fuesen inmunizados (8:30 am) y 30 min después reexpuestos a la sacarina. Los días 39, 43 y 47 (mA, mB y mC respectivamente) se tomaron las muestras de sangre. Cabe señalar que el protocolo de este experimento (ver tabla I) es exactamente igual que el del anterior, con la salvedad de que estos animales no recibieron la inyección de ciclofosfamida y en lugar de ello solo se les inyectó salina.

Resultados:

En la Figura 2 se puede apreciar que en este experimento se observan títulos cercanos a 0 en las muestras de línea base para ambos grupos (mLB). Se demuestra también que la lesión de CI no afecta la respuesta inmune primaria de la rata, puesto que los títulos de anticuerpos en los dos grupos fueron muy similares, sin observarse diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las tres muestras. Es importante aclarar que la respuesta inmune de las ratas intactas representa la respuesta inmune normal en este procedimiento de inmunización, con lo cual se tiene un dato de la respuesta inmune que puede ser comparado con los grupos que fueron expuestos al condicionamiento, pero que por el momento indica claramente que las ratas con lesiones en CI responden normalmente ante un reto antigénico. Los datos referentes al consumo de sacarina mostraron una clara preferencia por el sabor en la reexposición del día 35 para ambos grupos (Ctrl \bar{x} = 121 \pm 5 ; LxCI \bar{x} = 117 \pm 6), lo cual pone de manifiesto otra vez, que las lesiones de CI no afectan la discriminación de los sabores ya que las ratas con lesión química de esta región presentan preferencia al sabor al igual que los controles intactos.

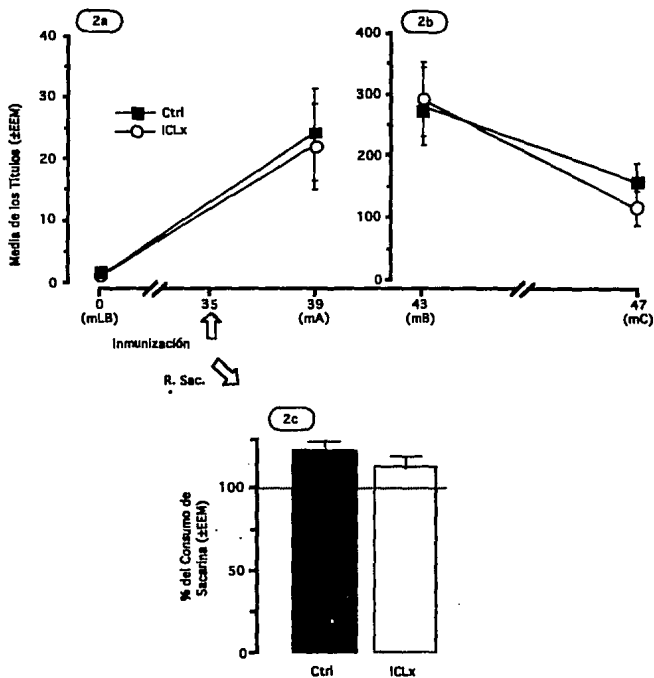


Figura 2 . Resultados del segundo experimento. En la fig 2a y 2b se muestra el efecto de la lesión de CI en la respuesta inmune normal de la rata. Titulos de anticuerpos (eje Y) para eritrocitos de carnero durante las muestras (ej X) de LB, muestra A (Fig 2a), B y C (Fig 2b). En la fig 2c se presenta el consumo de sacarina del día 35, segunda exposición al estímulo gustativo.

EXPERIMENTO 3

Procedimiento:

Este experimento se realizó para determinar los efectos que las lesiones de la CI tienen sobre la inmunosupresión causada por la ciclofosfamida, para ello utilizamos un grupo control (Ctrl n=8) y un lesionado en CI (LxCI n=8). En el día 0 del protocolo experimental se tomaron muestras de sangre de los animales, efectuándose las lesiones en el grupo LxCI el día 3. Ambos grupos se inmunizaron en el día 12 a las 8:30 am y 30 min después se les inyectó 50mg/kg de ciclofosfamida, se tomaron las muestras de sangre a los 4 y 8 días después de la inmunización, es decir los días 16 y 20 del protocolo, durante los cuales el efecto inmunosupresor de la ciclofosfamida aún está presente.

Resultados:

En la Figura 3 se observan los resultados de este experimento en que se muestra que también hubo títulos muy bajos de anticuerpos en la muestra de línea base para ambos grupos (mLB). Las lesiones de CI no causan ningún efecto en la inmunosupresión causada por la ciclofosfamida, ya que los títulos de anticuerpos en las muestras de los días 16 y 20 se mantuvieron muy bajos sin observarse diferencias significativas entre los grupos (ver Figura 3).

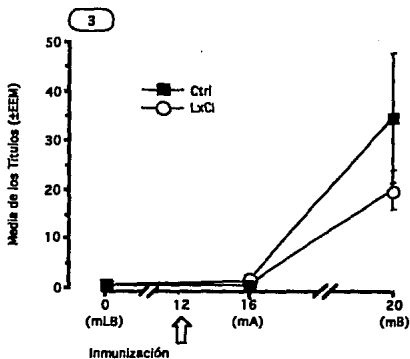


Figura 3. Efecto de la lesión de CI en la inmunosupresión causada por la ciclofosfamida. Se presentan los títulos de anticuerpos (eje Y) durante las 3 diferentes muestras. mLB, mA y mB, 4y 8 días respectivamente, después de la inmunización e inyección de la ciclofosfamida (eje X). Note que la escala de los títulos es diferente a la presentada en las figuras 1 y 2.

Resultados Histológicos:

Al observar los resultados histológicos se encontró que la mayoría de los animales fueron lesionados correctamente, sin embargo algunos presentaron lesiones solamente unilaterales o bien más mediales o ventrales a la región objetivo. De esta manera se eliminaron los animales con lesiones inadecuadas, de los análisis antes presentados, obteniéndose las Ns señaladas en las secciones correspondientes al procedimiento de cada experimento.

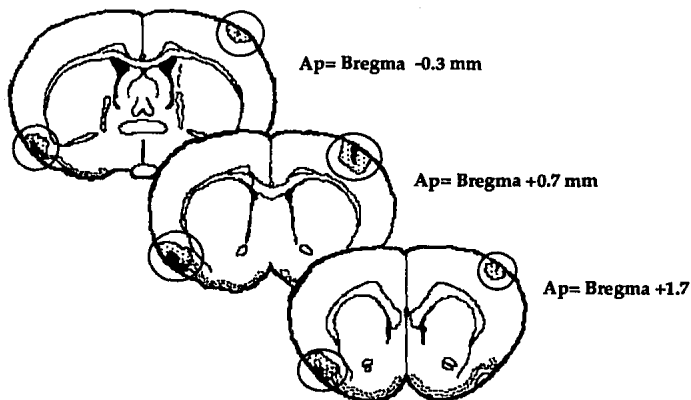


Figura 4. Representación esquemática de los cortes histológicos en donde las regiones punteadas marcan el área de la lesión más grande y las oscuras la lesión más pequeña, se esquematiza del lado izquierdo la lesión de la CI y del lado derecho la de corteza parietal.

DISCUSION

En los resultados del primer experimento se observó claramente una respuesta inmune más alta en los animales condicionados con lesión en CI (CS-LxCI) comparada a la respuesta en animales condicionados sin lesión (CS), con los condicionados con lesión en otra región cortical (CS-LxCP) y con aquellos que fueron sujetos a una lesión fantasma en la CI (CS-ShCI). Esto implica en primer lugar que las lesiones de CI tienen una acción bloqueadora de la respuesta condicionada producto de la reexposición a la sacarina en un paradigma de CIS; en segundo lugar, que este efecto es exclusivo de la lesión en dicha región cortical y por último, que es producido por la acción citotóxica del NMDA sobre las células de la CI. Esto último implica la participación de las células de la CI en la mediación del efecto inmunosupresor condicionado.

En el segundo experimento se observa una respuesta inmune normal en animales controles, como era de esperarse, pero también en los lesionados de la CI, lo que implica que dicha lesión no tiene efectos *per se* en la respuesta inmune y por lo tanto que el efecto sobre la respuesta inmune es específico del aspecto conductual de su modulación, debiendo explicarse por su efecto sobre las variables que intervienen en el CIS. En este sentido se sabe también que las lesiones de la CI no tienen efecto sobre la discriminación de los sabores e incluso se observa en estos datos que las ratas con lesión en la CI muestran una preferencia por la sacarina al igual que las ratas controles, lo cual ya ha sido bien documentado. Lo anterior elimina la posibilidad de que el efecto sobre el CIS sea causado por una imposibilidad de las ratas para percibir el sabor.

Finalmente en el tercer experimento se observa que la lesión de CI no tiene efecto alguno sobre la capacidad inmunosupresora de la ciclofosfamida en virtud de que tanto el grupo control como el lesionado muestran una disminución considerable de la respuesta inmune comparada con la respuesta de los controles sin condicionamiento (al hacer dicha comparación entre las figuras es importante notar que la escala de los títulos es diferente). Cabe señalar que el protocolo de este último experimento difiere temporalmente de los otros dos debido a que se realizó con el propósito de observar el efecto supresor de la ciclofosfamida que dura poco menos de 15 días, sin embargo puede servir como parámetro del efecto incondicionado de la ciclofosfamida, mismo que había sido presentado apropiadamente en otros experimentos (Ader y Cohen, 1975; Rogers y cols, 1976; Wayner y cols, 1978).

Estos resultados comprobaron la hipótesis, respecto de la participación de la CI en el CIS, siendo evidente que es necesario de la integridad de dicha región cortical al menos para la adquisición de una respuesta inmune condicionada.

Se debe notar que el efecto inmunosupresor condicionado es relativamente más fuerte en el presente experimento que en los descritos anteriormente (Ader y Cohen, 1975; Rogers y cols, 1976; Wayner y cols, 1978). Es importante aclarar que en los experimentos antes mencionados se presentan los datos de los títulos en una escala logarítmica lo que hace que el valor represente al pozo en donde se presentó el título y esto reduce las diferencias. Por otro lado, al presentarse la media del título se expresa en una escala más amplia que hace ver las diferencias más grandes. Sin embargo, aún cuando los títulos sean expresados en una escala logarítmica, los títulos en los animales del grupo CS son un poco menores que los del grupo CS₁ presentados en los experimentos de Ader y Cohen (1975), y del de Rogers y cols (1976), pero muy similares a los de Wayner y cols (1978), probablemente debido a que el intervalo entre el apareamiento de los estímulos y la prueba con la inmunización y reexposición al estímulo condicionado es más largo tanto en este experimento (19 días) como en el de Wayner y cols (15 días).

En el primer experimento también se presenta un control del condicionamiento, que es el grupo CS₀, con el cual se demuestra que la inmunosupresión observada es producida exclusivamente como efecto condicionado de la sacarina, ya que solo si se reexpone al estímulo condicionado se puede observar una supresión de la respuesta inmune. Este efecto es muy semejante al observado en otros experimentos, sin embargo aún cuando los títulos de anticuerpos no son estadísticamente diferentes durante las tres muestras en el grupo CS-LxCI y el grupo CS₀, en la muestra B (8 días después de la inmunización) se observa una pequeña diferencia. Esta pequeña diferencia quizá se deba a un efecto de generalización del procedimiento o a la presencia de una variable extraña no controlada dentro del procedimiento como la presencia de olor a sacarina en el cuarto donde se colocó al grupo CS₀.

El efecto de la lesión de CI sobre el CAS replica los resultados obtenidos por otros autores (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991, Dunn y Everit, 1988), en donde se puede notar que el efecto sobre el CAS es tal que los niveles de consumo de sacarina no varían con respecto al consumo basal de agua en aquellas ratas con lesión en CI, mientras que los grupos CS, CS-LxCP y CS-ShCI expresan una marcada aversión al sabor.

El hecho de que una estructura neural importante para la adquisición del CAS esté involucrada también en el CIS y con el antecedente de que ambos paradigmas de

aprendizaje surgen del apareamiento de un estímulo gustativo con un estímulo que tiene un efecto simpático o límbico, se puede suponer que los mecanismos neurofisiológicos de ambos paradigmas sean similares. Este supuesto involucra la necesidad de analizar la participación de estructuras relacionadas a la CI en el CIS. Los substratos neurales que subyacen al CIS se pueden estudiar, rastreando la vía que conecta a la CI con el hipotálamo, lo que incluye la participación de la amígdala, ya que esta se comunica bidireccionalmente con la CI, además de guardar una estrecha relación con el hipotálamo a través de la estria terminalis (Kupfermann, 1991), la cual fué la primera estructura neural propuesta para mediar la comunicación neuroinmune (Croos, y cols., 1980). La CI tiene conexiones con el hipocampo (Kiefer y cols 1985), el cual al igual que la amígdala, es una importante estructura en el sistema de comunicación neuro inmune debido a que puede recibir información proveniente del sistema inmunitario gracias a que expresa receptores para factores como las inmunocitocinas (Cunningham y De Souza, 1993). No hay que olvidar las importantes relaciones que guarda la CI con el sistema nervioso autónomo, a través de sus conexiones bidireccionales con el NTS, mediante el cual puede acceder al sistema inmune a través de las inervaciones simpáticas a los ganglios linfáticos. De hecho se ha demostrado la participación de los receptores adrenérgicos en un modelo de condicionamiento inmune diferente al descrito aquí (Lysle Cunnick y Maslonek, 1991; Luecken y Lysle, 1992), lo que sugiere que puede ser el sistema nervioso simpático el encargado de realizar el efecto depresor de la respuesta inmune en el CIS. A pesar de lo sugerente de las relaciones anatómicas de la CI con estructuras centrales involucradas en la respuesta inmune, la manera en como la corteza insular interactúa con el sistema inmune para permitir la adquisición del CIS, es por el momento un enigma, por lo cual, lo anterior solo queda en el plano de la especulación.

La función que cumple la CI en las interacciones neuro inmunes es exclusivamente, en los aspectos conductuales de la modulación de la respuesta inmunitaria, es decir, en la CI se dan ciertos procesos de plasticidad neuronal necesarios para adquirir un condicionamiento cuya respuesta condicionada es la modulación del sistema inmune. El hecho de que la CI este involucrada en otros paradigmas de aprendizaje como el que ocurre en el laberinto de agua de Morris (Bermúdez-Rattoni, Introini-Collison y McGaugh, 1991) y la prevención pasiva (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991, Dunn y Everit, 1988), hace de esta estructura una región importante en el aprendizaje. Cabe señalar que la única semejanza entre los diferentes modelos de aprendizaje en los que la CI está involucrada es la de que son aprendizajes motivados aversivamente o bien que su respuesta es de alguna manera un reflejo defensivo. Lo anterior puede implicar que en todos los aprendizajes relacionados con la CI, estén involucradas estructuras límbicas que junto con la CI pueden ser responsables de

caracterizar a los estímulos para permitir el aprendizaje.

Probablemente la idea de Pavlov acerca de que el aprendizaje es elaborado por estructuras corticales sería apoyada por los resultados de los experimentos del presente trabajo, pero no cabe duda de que los sistemas de plasticidad neural implicados en el aprendizaje no son sistemas rígidos sino dinámicos, además, el hecho de que la lesión de una estructura impida la adquisición de un aprendizaje, no significa necesariamente que dicha estructura sea el lugar en donde se efectúan todos los cambios fisiológicos necesarios para que el organismo aprenda, pero si demuestra la participación de un componente estructural del sistema nervioso en los mecanismos que subyacen el aprendizaje. Los mecanismos mediante los cuales la CI está involucrada en la mediación de la inmunosupresión condicionada y los factores neurales que llevan a cabo todo el proceso serán tema de futuras investigaciones.

Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A.H. and Pober, J. S. (1991) *Cellular and Molecular Immunology*, W.B. Sanders Company Harcourt Brace Jovanovich, Inc. Philadelphia, PA P. 226-42
- Ada, G.L. and Nossal, G. (1987) The Clonal Selection Theory. *Sci. Am.* **257**, 62-9
- Ader, R. (1974) Letter to the editor. *Psychosom. Med.* **36**, 183-4
- Ader, R. (1976) Conditioned adenocortical steroid elevations in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **90**, 1156-63
- Ader, R. (1980) Psychosomatic and Psychoimmunology Research. *Psychosom. Med.* **42**, 307-21
- Ader, R. and Cohen, N. (1975) Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosom. Med.* **37**, 333-40
- Ader, R. and Cohen, N. (1981) Conditioned immunopharmacological responses. In *Psychoneuroimmunology*. Ed by R. Ader, New York, Academic Press P. 185-228
- Ader, R. and Cohen, N. (1982) Behaviorally conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. *Science.* **215**, 1534-6
- Ader, R. and Cohen, N. (1985) CNS-immune system interactions: Conditioning phenomena. *The Behav. Brain Sci.* **8**, 379-426
- Ader, R. and Cohen, N. (1993) Psychoneuroimmunology: conditioning and stress. *Annu. Rev. Psychol.* **44**, 53-85
- Ader, R., Cohen, N. and Bovbjerg, D. (1982) Conditioned suppression of humoral immunity in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **96**, 517-21
- Akana, S.F., Scribner, K.A., Bradbury, M.J., Strack, A.M., Walker, C.D. and Dallman, M.F. (1992) Feedback sensitivity of the rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis and its capacity to adjust to endogenous corticosterone. *Endocrinol.* **131**, 585-94

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1989) *Molecular Biology of the Cell*. Ed. por Garland Publishing, Inc. N.Y. U.S.A. P. 952-1008
- Asfour, S.S., Khalil, T.M., Waly, S.M., Goldberg, M.L., Rosomoff, R.S. and Rosomoff, H.L. (1990), Biofeedback in back muscle strengthening. *Spine*, 15, 510-3
- Baciu, I., (1993), The role of nervous mechanism on immune response. *Rev. Roum. Physiol.*, 29, 5-11
- Barker, L.M., Best, M. R. and Donjan, M. (1977) *Learning Mechanism in food selection*. Waco Tex. Bayior University Press
- Basedovsky, H.O., Del-Rey, A.E. and Sorkin, E. (1985) Immune-neuroendocrine interactions. *J. Immunol.* 135, 750S-4S
- Basedovsky, H.O., Sorkin, R., Felix, D. and Haas, H. (1977) Hypothalamic changes during the immune response. *Eur. J. Immunol.* 7, 325-8
- Benjamin, R.M. and Akert, K. (1959) Cortical and thalamic areas involved in taste discrimination in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 111, 231-59
- Benjamin, R.M. and Pfaffmann, C. (1955) Cortical localization of taste in the albino rat. *J. Neurophysiol.* 18, 56-64
- Bereznykh, D.V. (1955) On the question of conditioned reflex restoration of immunogenesis. *Byull. Eksperimental.Biol. Medi.* 40, 49-52
- Bermudez-Rattoni, F., Introini-Collison, I.B. and McGaugh, J.L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 5379-82
- Bermudez-Rattoni, F. and McGaugh, J.L. (1991) Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain. Res.* 549, 165-70
- Bernardini, R., Calogero, A.E., Mauceri, G. and Chrousos, G. P. (1990) Rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro is stimulated by interleukin-1 in an eicosanoid-dependent manner. *Lif. Sci.* 47, 1601-7

- Biedermann, H.J. and Inglis, J. (1990), The restoration of control in facial muscles affected by Bell's palsy. *Int. J. Psychosom.*, 37, 73-7
- Blanchard, E.B. (1990) Biofeedback treatments of essential hypertension. *Biofeed. Self. Regul.* 15, 209-28
- Bovbjerg, D., Cohen, N. and Ader, R. (1987) Behaviorally conditioned enhancement of delayed-type hypersensitivity in the mouse. *Brain. Behav. Immun.* 1, 64-71
- Braun, J.J. and Kiefer, S.W. (1975) Preference-aversion functions for the basic taste stimuli in rats lacking gustatory neocortex. *Bull. Psychonom. Soc.* 6, 438-9
- Braun, J.J., Lasiter P.S. and Kiefer, S.W. (1982) The gustatory neocortex of the rat. *Physiol. Psychol.* 10, 13-45
- Braun, J.J., Slick, T.B. and Lorden, J.F. (1972) Involvement of gustatory neocortex in the learning of taste aversions. *Physiol. Behav.* 9, 637-41
- Buske-Kirschbaum, A., Kirschbaum, C. Stierle, H., Lehnert, H. and Hellhammer, D. (1992) Conditioned increase of natural killer cell activity (NKCA) in humans. *Psychosom. Med.* 54, 123-32
- Coe, C.L., Rosenberg, L.T. and Levine, S. (1988) Endocrine and immune responses to separation on the complement system and antibody response in infant primates. *Int. J. Neurosci.* 40, 289-302
- Cooper, M. and Lawton, A. (1974) The Development of Immune System. *Sci. Am.* 231, 59-72
- Cotman, C.W., Brinton, R.E., Galaburda, A., McEwen, B. and Schneider, D.M., (1987) *The Neuro-Immune-Endocrine Connection*. Raven Press, New York. P. 71-92
- Cross, R.J., Markesberry, W.R., Brooks, W.H. and Roszman, T.L. (1980), Hypothalamic-Immune Interactions. I. *Brain Research.*, 196, 79-87
- Cunningham, E.T. Jr. and De Souza, E.B. (1993) Interleukin 1 receptors in the brain and endocrine tissues. *Immun. Today.* 14, 171-6

Danek, A., O'Doriso, M.S., O'Doriso, T.M. and George, J. (1983) Specific binding sites for vasoactive intestinal polypeptide on nonadherent peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* **131**, 1173-7

Dantzer, R. (1989) *L'illusion Psychosomatique*, Ed. por Odile Jacob Paris, P. 11-60

Divac, I., Gade, A. and Wikmark, R.E.G. (1975) Taste aversion in rats with lesions in the frontal lobes. No evidence for interoceptive agnosia. *Physiol. Psychol.* **3**, 43-6

Domjan, M. (1980) Ingestion aversion learning: Unique and general processes. In *Advances in the study of behavior*, Ed. por Rosenblatt, J., Hinde, R., Beer, C. and Busnel, M. Vol 11, New York Acad. Press P. 108-35.

Dunn, L.T. and Everit, B.J. (1988) Double dissociation of the effects of amygdala and insular cortex lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in rat using the excitotoxin ibotenic acid. *Behav. Neurosci.* **102**, 3-23

Fahrion, S.L. (1991) Hypertension and Biofeedback, *Prim. Care.* **18**, 663-82

Fauman, M.A. (1987) The relation of dominant and submissive behavior to the humoral immune response in BALB/c mice. *Biol. Psychiatry.* **22**, 771-6

Felten D.L., Felten S.Y., Carlson S.L., Olschowka J.A. and Livnat S. (1985) Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J. Immunol.* **137**, 7555-655

Felten D.L., Ackerman K.D., Wiegand S.J. and Felten S.Y. (1987) Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: I. Nerve fibers associate with lymphocytes and macrophages in specific compartments of splenic white pulp. *J. Neurosci. Res.* **18**, 28-36

Feng, N., Pagnano, R., Tovar, A., Benneau, R.H., Glaser, R. and Sheridan, J.F. (1991) The effect of restraint stress on the kinetics, magnitude, and isotype of the humoral immune response to influenza virus infection. *Brain. Behav. Immun.* **5**, 370-82

Fleshner, M., Laudenslager, M.L., Simons, L. and Maier, S.F. (1989) Reduced serum antibodies associated with social defeat in rats. *Physiol. Behav.* **45**, 1183-7

Frei, K. and Fontana, A. (1989) Immune regulatory functions of astrocytes and microglial cells within the central nervous system. *Neuroimmune Networks: Physiology and Diseases*, Edited by Nahera Hervert Spector, New York, Alan R. Liss, Inc. P. 127-36

- Freud, S.A. 1988 *Propos de l'histoire d'une névrose infantile. Oeuvres complètes, Psychanalyse*, Vol. 13, (1914), PUF, Paris
- Friedberger, V. E. and Gurwitz, I. (1931) Sind bedingte reflexe im sinne von pawlow befähigt, die bildungsspezifischer antikörper. *Zeitschrift für immunitätsforschung und experimentelle therapie*. **72**, 173-9
- Frommer, G.P. (1961) Gustatory afferent responses in the thalamus. In: *The physiological and behavioral aspects of taste*. Ed. por: Kare, M.R. and Halpern, B. Chicago: University of Chicago Press P. 75-82
- García, J., Hankins, W.G. and Rusiniak, K.W. (1974) Behavioral regulation of the milieu interne, in man and rat. *Science*. **185**, 824-31
- García, J., Kimmeldorf, D. and Koelling, R. (1955) A conditioned aversion towards saccharine resulting to exposure to Gamma radiation. *Science*. **122**, 157-8
- García, J., Lasiter, P.S., Bermúdez-Rattori, F. and Deems, D. A. (1985) A general theory of aversion learning. *Annals. NY. Acad. Sci.* **443**, 8-21
- Gatermann, S., Meyer, H.G. and Wanner, G. (1992) Staphylococcus saprophyticus hemagglutinin is a 160-kilodalton surface polypeptide. *Infect. Immun.* **60**, 4127-32
- Gauci, M., Bull, D.F., Schedlowski, M., Husband, A.J. and King, M.G. (1991) Lithium Chloride and Immunomodulation in taste aversion conditioning. *Physiol. Behav.* **51**, 207-10
- Ghanta, V., Hiramoto, R.N., Solvanson, B. and Spector, N.H. (1985) Neural and enviromental influences on neoplasia and conditioning of NK activity. *J. Immunol.* **135**, 848S-52S
- Glass, D.C. (1989) Psychoogy and Health:Obstacles and Oportunities. *J. Appl. Soc. Psychol.*, **19**, 1114-63
- Glue, P., Payvandi, N., Kay, G., Elliott, J.M and Nutt, D.J. (1991) Effects of chronic α_2 -adrenoceptor blokade on platelet and lymphocyte adrenoceptor binding in normal volunteers. *Life Sci.* **49**, PL21-PL25

- Gold, R.M. and Proulx, D.M. (1972) Bait-shyness acquisition is impaired by VMH lesions that produce obesity. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **79**, 201-9
- Gowans, J.L. and McGregor, D.D. (1965) The immunological activities of lymphocytes. *Prog. Allergy*, **9**, 1-78
- Grayson, J., Dooley, N.J., Koski, I.R. and Blaese, R.M. (1981) Immunoglobulin production induced in vitro by glucocorticoid hormones. *J. Clin. Invest.* **68**, 1539-47.
- Greaves, M.F., Owen, J.J.T. and Raff, M.C. (1973) T and B Lymphocytes: Origins, Properties and Roles in Immune Responses. Amsterdam, *Excerpta Medica*. **21**, 641-52
- Grochowicz P. M., Schedlowski M., Husband A. J., King M. G., Hibberd A. D. and Bowen K. M. (1991) Behavioral conditioning prolongs heart allograft survival in rats. *Brain Behav. Immun.* **5**, 349-56
- Groddeck, G. (1969) *La maladie l'art et le symbole*, Gallimard, Paris P. 105-123
- Gustavson C.R., Garcia, J., Hankins, J. and Risiniak, K.W. (1974) Coyote predation control by aversive conditioning. *Science*. **184**, 824-831
- Guthrie, D.W., Sargent, L., Speelman D. and Parks, L. (1990) Effects of parental relaxation training on glycosylated hemoglobin of children with diabetes, *Patient Educ. Couns.* **16**, 247-53
- Haynes, S.G., Feinleib M., and Kannel, W.B. (1980) The relationship of psychosocial factors to coronary heart disease in the Framingham study. *Amer. J. Epidemiol.*, **111**, 37-58.
- Heilig M., Irwin M., Grewal I. and Sercarz E. (1993), Sympathetic Regulation of T-Helper Cell Function. *Brain. Behav. Immun.* **7**, 154-63
- Herberman, R.B., Reynolds, C.W. and Orlando, J. (1986) Mechanism of cytotoxicity by Natural Killer (NK) Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **4**, 651-80
- Holroyd, K.A. and Penzien, D.B. (1990) Pharmacological versus non-pharmacological prophylaxis of recurrent migraine headache. *Pain*, **42**, 1-13

Hori, T., Nakashima, T., Take, S., Kaizuka, Y., Mori, T and Katafuchi, T. (1991) Immune cytokines and regulation of body temperature, food intake and cellular immunity. *Brain. Res. Bull.* 27, 309-13

Husband, A.J. (1993) Role of central nervous system and behaviour in the immune response. *Vaccine*. 11, 805-15

Irwin, M., Vale, W. and River, C. (1990) Central corticotropin-releasing factor mediates the suppressive effect of stress on natural killer cytotoxicity. *Endocrinol.* 126, 2837-44

Isakovic, K. and Jankovic, B.D. (1973) Neuroendocrin correlates of immune response II. *Int. Arch. Allergy*, 45, 373-84

Jenkins P. E., Chadwick R.A. and Nevin J.A. (1983) Classically conditioned enhancement of antibody production. *Bull. Psychonom. Soc.* 21, 485-7

Johnson D.L. and Gordon M.A. (1980) Characteristics of adrenergic binding sites associated with murine lymphocytes isolated from spleen. *J. Immunopharmacol.* 2, 435-52

Johnson, H.M. and Torres, B.A. (1985) Regulation of lymphokine production by arginine vasopressin and oxytocin. *J. Immunol.* 135, 773-5

Kelley, K.W. and Dantzer, R. (1986) Is conditioned immunosuppression truly conditioned?. *Behav. Brain. Sci.* 9, 758-60

Khan, A.U. (1977) Effectiveness of biofeedback and counterconditioning in the treatment of bronchial asthma. *J. Psychosom. Res.* 21, 97-104

Kiefer S. W. (1985) Neural mediation of conditioned food aversions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 443, 100-109

King, M.C., Husband, A.J. and Kusnekov, A.W. (1987) Behaviourally conditioned immunosuppression using anti-lymphocyte serum: Duration of effect and role of corticosteroids. *Medic. Sci. Res.* 15, 407-8

Klosterhalfen, S. and Klosterhalfen, W. (1990) Conditioned cyclosporine effects but not conditioned taste aversion in immunized rats. *Behav. Neurosci.* 104, 716-24

- Klosterhalfen, S. and Klosterhalfen, W. (1987) Classically conditioned effect of cyclophosphamide on white blood cell counts in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **496**, 569-77
- Kopeloff, L.M., Kopeloff, N. and Posselt, E. (1935) Agglutinins and the conditioned reflex. *J. Immunol.* **29**, 359-66
- Kopeloff, L.M., Kopeloff, N. and Raney, M. (1933) The nervous system and antibody production. *Psychiatric Quarterly* **7**, 84-106
- Kupfemann, I. (1991) Hypothalamus and limbic system: Peptidergic neurons, homeostasis, and emotional behavior. En: *Principles of neural Sciences*. Ed. por Kandel, E.R., Schwartz, J.H. and Jessel, T.M. Tercera edición. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, P. 735-49
- Kusnekov, A.V., Husband, A.J. and King, M.G. (1988) Behaviorally conditioned suppression of mitogen-induced proliferation and immunoglobulin production: Effect of time span between conditioning and reexposure to the conditioned stimulus. *Brain. Behav. Immun.* **2**, 198-211
- Kusnekov, A.V., Sivyer, M., King, M.G., Husband, A.J., Cripps, A.W. and Clancy, R.L. (1983) Behaviorally conditioned suppression of the immune response by antilymphocyte serum. *J. Immunol.* **130**, 2117-20
- Lasiter, P.S., Glazman, D.L. and Mensah, P.A. (1982) Direct connectivity between pontine taste areas and gustatory neocortex in rat. *Brain. Res.* **234**, 111-121
- Livnat S., Felten S.Y., Carlson S.L., Bellinger D.L. and Felten D.L. (1985) Involvement of peripheral and central catecholamine systems in neural-immune interactions. *J. Neuroimmunol.* **10**, 5-30
- Luecken L. J. & Lysle D. T. (1992) Evidence for the involvement of b-adrenergic receptors in conditioned immunomodulation. *J. Neuroimmunol.* **38**, 209-20
- Lupparello, T.J., Stein, M. and Park, C.D. (1964) Effect of hypothalamic lesions on rat anaphylaxis. *Amer. J. Physiol.* **207**, 911,14

Lysle D. T., Cunnick J.E. & Maslonek K. A. (1991) Pharmacological manipulation of immune alterations induced by aversive conditioned stimulus: evidence for b-adrenergic receptor-mediated pavlovian conditioning process. *Behav. Neurosci.* **105**, 443-9

MacLean, P.D. (1972) Cerebral evolution and emotional processes. *Annals. N.Y. Acad. Sci.* **193**, 137-49

Madden, K. S., Ackerman, K.D., Livnat, S., Felten, S.Y. and Felten, D.L. (1989) Patterns of Noradrenergic Innervation of Lymphoid Organs and Immunological Consequences of Denervation. *Neuroimmune Networks: Physiology and Diseases*. Ed by Goetzl, E.J. and Spector, N.H., Alan R. Liss, Inc. New York P. 137-47

Masek, K. Petrovicky, P. and Seifert, J. (1992) An Introduction to the possible role of central nervous system structures in neuroendocrine-immune system interactions. *Int. J. Immunopharmacol.* **14**, 317-22

McGowan, B.K., Garcia, J., Ervin, F.R. and Schwartz, J. (1969) Effects of septal lesions on bait-shyness in the rat. *Physiol. Behav.* **4**, 907-9

Metal'nikov, S. and Chorine, V. (1926) Rôle des réflexes conditionnels dans l'immunité. *Ann. L'Inst. Pasteur.* **40**, 893-900

Miller, C.R., Elkins, R.L. and Peacock, L.J. (1971) Disruption of a radiation-induced preference shift by hippocampal lesions. *Physiol. Behav.* **6**, 283-5

Miller, N.E. (1975) Behavioral Medicine as a new frontier. Edited by Weiss, S.M., Matarazzo, J.D., Becker, M., Dunsan, H., Glass, D.C., Green, L. and Jenkins, C.D. *Proceedings of the National Heart and Lung Institute*, working conference on health behavior. Washington, D.C. P. 76-86

Miles, K., Chelmicka-Schorr, E., Atweh, S., Otten, G. and Arnason, B.G.W. (1985) Sympathetic ablation alters lymphocyte membrane properties. *J. Immunol.* **135**, 797-805

Mordkoff, A. and Parson, O. (1968). The coronary personality. *Int. J. Psych.* **5**, 413-26

Moyniham, J.A., Ader, R., Grotta, L.J., Schachtman, T.R. and Cohen, N. (1990) The effects of stress on the development of immunological memory following low-dose antigen priming in mice. *Brain. Behav. Immun.* **4**, 1-12

Munck, A., Guyre, P.M., and Holbrook, N.J. (1984) Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endoc. Rev.*, 5, 24-44

Nabholz, M. and MacDonald, H.R. (1983), Cytolytic T Lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 1, 273-306

Nachman, M. and Ashe, J.H. (1974) Effects of basolateral amygdala lesions on neophobia, learned taste aversions, and sodium appetite in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 87, 622-43

Neveu, P.J., Dantzer, R. and Le Moal, M. (1986) Behaviorally conditioned suppression of mitogen-induced lymphoproliferation and antibody production in mice. *Neurosc. Lett.* 65, 293-8

Norgren, R. (1978) Projections from the nucleus of the solitary tract in rat. *Neurosci.* 3, 207-18

Norgren, R. and Leonard, C.M. (1973) Ascending central gustatory connections. *J. Comp. Neurol.* 150, 217-38

Okimura, T., and Nigo, Y. (1986) Stress and immune responses IV. *Jpn. J. Pharmacol.* 41, 237-45

Onsrud, M. and Thorsby, E., (1981) Influence of in vivo hydrocortisone on some human blood lymphocyte subpopulations. *Scand. J. Immunol.* 13, 573-9

O'Reilly, C.A. and Exon, J.H. (1986) Cyclophosphamide-conditioned suppression of the natural killer cell response in rats. *Physiol. Behav.* 37, 759-64

Ostravskaya, O. A. (1930) Le reflex conditionnel et les reactions de L'immunité. *Ann. L'Institut. Past.* 44, 340-5

Palazzolo, D.L. and Quadri S.K. (1990) Interleukin-1 stimulates catecholamine release from the hypothalamus. *Lif. Sci.* 47, 2105-9

Patton, H.D. (1950) Physiology of smell and taste. *Ann. Rev. Psychol.* 12, 469-84

Patton, H.D., Ruch, T.C. and Walker, A.E. (1944) Experimental hypogeusia from Horsley-Clarke lesions of the thalamus in Macaca Mulata. *J. Neurophysiol.* 7, 171-84

Pavlov, I. 1979 Reflejos Condicionados e Inhibiciones. Ed. Peninsula, Barcelona. Esp. Original, (1929)

Paxinos, G. and Watson, C. (1982) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, North Ryde, Australia.

Rabin, B.M., Hunt, W.A. and Lee, J. (1983) Acquisition of lithium chloride and radiation-induced taste aversion in hypophysectomized rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18, 463-65

Rajewky, K., Forster, I. and Cumano, A. (1987) Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science.* 238, 1088-94

Razran, G. (1961) The observable unconscious and the inferable conscious in current soviet psychophysiology. *Psychol. Rev.* 68, 81-147

Reder, T. A., Karaszewski, J.W. and Arnason, B.G.W. (1989) Sympathetic Nervous System Involvement in Immune Responses of Mice and in Patients With Multiple Sclerosis. *Neuroimmune Networks: Physiology and Diseases*. Ed by Goetzl, E.J. and Spector, N.H., Alan R. Liss, Inc. New York P. 137-147

Ricardo, J.A. and Koh, E.T. (1978) Anatomical evidence of direct projections of the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain. Res.* 153, 1-26

Rogers, M.P., Reich, P., Strom, T.B. and Carpenter, C.B. (1976) Behaviorally conditioned immunosuppression. Replication of a recent study. *Psychosom. Med.* 38, 447-51

Rosenblum, K., Meiri, M. and Dudai, Y. (1993) Taste memory: The role of protein synthesis in gustatory neocortex. *Behav. Neural. Biol.* 59, 49-56

Rosenman, R.H., Brand, R.J., Jenkins, C.D., Friedman, M., Straus, R., and Wurm, M. (1975) Coronary heart disease in the Western Collaborative Group Study. *J. Amer. Med. Assoc.* 233, 872-7

79 **ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- Roszman, T.L., Cross, R.J., Brooks W.H. and Markesberry, W.R. (1982) Hypothalamic immune interactions II. *Immunology*. 45, 737-42
- Roudebush, R.E. and Bryant, H.U. (1991) Conditioned immunosuppression of a murine delayed type hypersensitivity response: Dissociation from corticosterone elevation. *Brain. Behav. Immun.* 5, 308-17
- Rozengurt, E., Legg, A., and Curd, P.P. (1979), Vasopressin stimulation of mouse 3T3 cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 1284-7
- Ruch, T.C., Patton, H.D., Woodbury, J.W. and Towe, A.L. (1966) *Neurophysiology* (6th ed.) Saunders, Philadelphia.
- Russell, M., Dark, K.A., Cummins, R.W., Ellman, G., Callaway, E. and Peeke, H.V.S. (1984) Learned histamine release. *Science*. 225, 733-4
- Saito, M., Akiyoshi, M. and Shimizu, Y. (1991) Possible Role of the Sympathetic Nervous System in Responses to Interleucin-1. *Brain Res. Bull.* 27, 305-8
- Sapolsky, R., Rivier, C., Yamamoto, G., Plotsky, P. and Vale, W. (1987) Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin releasing factor. *Science*. 238, 522-4
- Schiavi, R.C., Marcis, N.T., Camerino, M.S. and Stein, M. (1975) Effect of hypothalamic lesions on immediate hypersensitivity. *Amer. J. Physiol.* 228, 596-601
- Schulze, G.E., Benson, R.W., Paule, M.G. and Roberts, D.W. (1988) Behaviorally conditioned suppression of murine T-cell dependent but not T-cell independent antibody responses. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 30, 859-65
- Schwartz, J.H. and Kandel, E.R., (1991), Synaptic transmission Mediated by second messengers. *Principles of Neural Sciences*. Third Edition, Elsevier Science Publishers P. 173-193
- Sell, G. (1972) *Immunology and immunity*. Hagerstown, U.S.A. Harper P. 1025-38
- Spector, N.H. (1993) 23rd annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington, D.C. Nov 7-12. (comunicación personal)

Stein, M., Schleifer, S.J. and Keller, S.E. (1981) Hypothalamic influences on immune responses, In *Psychoneuroimmunology*, Ed. by Ader, R. Academic Press. P. 429-47

Thoenen H. and Tranzer J.P. (1973) The pharmacology of 6-hydroxydopamine. *Ann. Rev. Pharmacol.* **13**, 168-80

Tyrey, L. and Nalbandov, A.V. (1972) Influence of anterior hypothalamic lesions on circulating antibody titers in the rat. *Amer. J. Physiol.* **222**, 179-85

Van der Kooy, D., McGinty, J.F., Koda, L., Gerfen, C.R. and Bloom, F.E. (1982) Visceral cortex: A direct connection from prefrontal cortex to the solitary nucleus in the rat. *Neurosci. Lett.* **33**, 123-7

Vygodchikov, G.V. (1957) Results of a discussion on the basic problems of the study of immunity. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii.* **26**, 5-14

Wayner, E.A., Flannery, G.R. and Singer, G. (1978) Effects of taste aversion conditioning on the primary antibody response to sheep red blood cells and brucella abortus in the albino rat. *Physiol. Behav.* **21**, 992-1000

Weiner, H. (1977) *Psychobiology and human disease*. New York, Elsevier, P. 110-23

Whitfiel, J.P., MacManus, J.P., and Gillan, D.J. (1970) The possible mediation by cyclic-AMP of the stimulation of thymocyte proliferation by vasopressin and the inhibition of this mitogenic action by thyrocalcitonin. *J. Cell. Physiol.* **76**, 65-76

Wittrock, D. A. and Blanchard, E.B. (1992) Thermal Biofeedback treatment of mild Hypertension. *Behav. Modif.* **16**, 283-304

Williams J.M. and Felten, D. L. (1981) Sympathetic innervation of lymphoid tissue, thymus and Spleen: A comparative histofluorescence study. *Anatom. Res.* **199**, 531-42

Williams J. M., Peterson R. G., Shea P.A., Schmedtje J. F., Beuer D. G. and Felten D. L. (1981) Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: Evidence for a functional link between the nervous and immune system. *Brain Res. Bull.* **6**,83-94

Wolf, G. (1968) Projections of thalamic and cortical gustatory areas in the rat. *J. Comp. Neurol.* **132**, 519-30

Wybram, J. (1985) Enkephalins and endorphins: Activation molecules for the immune system and natural killer activity. *Neuropep.* 5, 371-74

Yamamoto, T. and Kawamura, Y. (1972) Summated cerebral responses to taste stimuli in rat. *Physiol. Behav.* 9, 789-93

Yamamoto, T., Matsuo, R. and Kawamura, Y. (1980) Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination. *J. Neurophysiol.* 44, 440-54