

11281
10

Universidad Nacional Autónoma de México



Doctorado en Ciencias Biomédicas

Instituto de Fisiología Celular

COMUNICACIÓN NEUROINMUNE:
EVALUACIÓN DE SU RELEVANCIA EN LA RESPUESTA DE
ANTICUERPOS A LA HEMOCIANINA

Tesis que para obtener el título de
Doctor en Ciencias
presenta
Héctor Enrique Espinosa Arciniega

Ciudad Universitaria 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Aclaraciones

La introducción del presente trabajo está constituida por el artículo de revisión "Relación conducta-inmunidad; el papel de las citocinas". Esta tesis consiste de dos partes, cada una de las cuales se inicia con una sección de objetivos y justificación, donde se encuentran los antecedentes no cubiertos en la introducción general. El artículo original *Enhancement of antibody response by one-trial conditioning: contrasting results using different antigens* se presenta como Anexo 2.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección del Doctor Federico Bermúdez Rattoni, en el Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria del Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Autorizo a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM a difundir en formato electrónico el contenido de mi Tesis de Maestría en el área de Neurociencias.
 NOMBRE: Héctor Enrique Espinosa Arriaga
 FECHA: 24 de Octubre de 2003
 FIRMA: Héctor Espinosa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Reconocimientos y agradecimientos

Las determinaciones de noradrenalina por HPLC, de los estudios de la parte 2, fueron realizadas por la Dra. María Isabel Miranda Saucedo en el laboratorio del Dr. Federico Bermúdez Rattoni, a partir de los extractos descritos en Metodología. El experimento presentado en el apéndice 1 (A) se realizó en colaboración con Gustavo Pacheco López. El experimento correspondiente al apéndice 1 (B) se realizó en el laboratorio del Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

Agradezco muy especialmente al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por su asesoría, su tiempo y su apoyo durante el desarrollo de este trabajo. Agradezco también al Dr. Rogelio Hernández Pando del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", por su asesoría y el uso de las instalaciones del Departamento, y al M.V.Z. Octavio Villanueva del Bioterio del INCMNSZ por su ayuda.

A Tania Calderas, Oscar Flores, Georgina S. Pérez, Moisés King, Carolina Hill, que colaboraron con gran profesionalismo en los experimentos aquí presentados.

A mis queridos amigos Lucía, Ricardo, Pilar, Humberto, Tamara, Martín, Cecilia, Fernando, Criselda, Curt, Mariana, etc. que me acompañaron y animaron estos años.

A mis padres, que me acercaron a la ciencia.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Índice

Resumen.....	6
Abstract.....	7
Introducción: (artículo de revisión "Relación conducta-inmunidad: el papel de las citocinas").....	8
1 Estudios de condicionamiento	
Justificación y Objetivos.....	22
Métodos	
Procedimiento general de condicionamiento.....	25
Muestras.....	28
Determinación de IgG anti-KLH.....	29
Resultados.....	30
Discusión.....	37
2.- Estudio de simpatectomía	
Antecedentes, Justificación y Objetivos	
Noradrenalina e inmunidad: resultados contradictorios.....	45
El Sistema nervioso simpático y la respuesta de anticuerpos.....	46
Métodos	
Prueba piloto de simpatectomía con 6-OHDA.....	50
Simpatectomía química y reto con KLH.....	50
Determinación de noradrenalina.....	51
Determinación de IgG2a e IgG1 anti-KLH.....	51
Resultados	
Efectividad de la simpatectomía.....	52
Efecto en la respuesta de anticuerpos a la hemocianina.....	54
Discusión.....	57

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Consideraciones finales.....	59
Referencias.....	62
Apéndice 1.- Estudios iniciales.....	67
Apéndice 2.- Artículo <i>Enhancement of antibody response by one-trial conditioning: contrasting results using different antigens</i>	68

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resumen

La modificación de la respuesta inmune mediante condicionamiento pavloviano y su regulación por el sistema nervioso simpático son paradigmas de comunicación neuroinmune cuya importancia biológica permanece sin establecerse. En la primera parte de este trabajo se estudió la posibilidad de incrementar la respuesta de anticuerpos a la hemocianina con procedimientos de condicionamiento conductual. En la segunda, se estudiaron los efectos de la simpatectomía en dicha respuesta. En una serie de experimentos se siguió un protocolo de condicionamiento en una sesión de apareamiento, utilizando hemocianina como estímulo incondicionado (EI). No se observó ningún efecto condicionado en ninguna de las diferentes condiciones estudiadas, pero sí un condicionamiento confiable, aunque modesto, utilizando lisozima como EI. Se concluyó sobre las posibles condiciones necesarias para observar esta respuesta condicionada y sobre la baja generalidad del fenómeno. En el segundo estudio se logró una eliminación de los niveles periféricos de noradrenalina administrando sistémicamente 6-hidroxidopamina. Esta intervención no tuvo ningún efecto en la magnitud de la respuesta secundaria de anticuerpos a la hemocianina ni sobre la distribución de subtipos de inmunoglobulinas. Esto sugiere que las respuestas ya establecidas podrían no ser regulables por las vías noradrenérgicas periféricas. Se concluye que para conocer el verdadero valor biológico de la regulación de la inmunidad por el sistema nervioso se requiere estudios que incluyan funciones efectoras de la inmunidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Abstract

The modulation of immune response by Pavlovian conditioning and the regulation of the immune system by the sympathetic nervous system are both paradigms of neuro-immune communication. The importance of these paradigms remains to be established. The possibility of modifying the antibody response to hemocyanine with behavioral conditioning procedures was studied. Additionally, the effects of sympathectomy on this response were assessed. In a series of experiments, one-trial conditioning protocols were followed using hemocyanine as unconditioned stimulus (US). No conditioned effect was observed under any of the different conditions studied. However, a reliable albeit modest conditioned effect was observed when lysozyme was used as US. Conclusions were drawn about the low generality of the phenomenon and about the conditions necessary to reproduce it. In the second study, sympathectomy was accomplished by systemic administration of 6-hydroxydopamine. This intervention did not have any effect on the magnitude of the secondary antibody response against hemocyanine, nor on the immunoglobulin subclass distribution. This latter suggests that already established responses might not be subject of regulation by peripheral noradrenergic pathways. It is concluded that studies measuring effector functions of the immune system are required to ascertain the real biological significance of immune regulation by the nervous system.



ARTICULO DE REVISIÓN

Relación conducta-inmunidad: el papel de las citocinas

Enrique Espinosa*, Federico Bermúdez-Rattoni*

* Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria,
Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México.

Behavior-immunity relationship:
The role of cytokines

ABSTRACT

There are several phenomena in which the immune and the central nervous systems regulate each other. However, their mechanisms are poorly understood. Since cytokines have a central role in the regulation of the immune response, this review describes their participation in two forms of neuro-immune communication, immunomodulation by psychological stress and behavioral conditioning of immune response. The role of cytokines in the endocrine and behavioral effects of acute phase, where cytokines have an effect in functions of the central nervous system, is also reviewed. The effects of psychological stress are described as both immunosuppressing and immunoenhancing. Among them, a relevant immunosuppressing one is the reduction of IL-1, IL-2, and IFN-gamma levels. In contrast, some of the pro-inflammatory effects of stress are mediated by an increase in the levels of IL-6, IL-1, and TNF mediated by the neurotransmitter Substance P. A possible role for IL-1 and IFN- γ as possible messengers in immune regulation by behavioral conditioning is proposed. Pro-inflammatory cytokines in turn can activate the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and induce sickness behavior during the acute phase response, during which the parasympathetic nervous system serves as pathway for their detection by the central nervous system. An account is given about recent findings on the regulation of cytokine expression by neurotransmitters from the sympathetic nervous system (epinephrine and norepinephrine), a key piece in all these mechanisms of brain-immune communication. Possible mechanisms and pathways of communication between the brain and the immune system, as well as the possible participation of other cytokines are discussed.

Key words. Psychoneuroimmunology. Cytokines. Neuroimmunomodulation. Mechanisms.

INTRODUCCIÓN

Psiconeuroinmunología

Actualmente la idea de que la conducta y la inmunidad están relacionadas cuenta con un gran respal-

RESUMEN

Existen numerosos fenómenos de regulación mutua entre sistema inmune y sistema nervioso y sus mecanismos son poco conocidos. Dado que las citocinas tienen un papel central en la regulación de la respuesta inmune, se revisa su participación en dos formas de neuroinmunomodulación: la inmunomodulación por estrés y el condicionamiento conductual de la respuesta inmune. Se describe también su mediación en los efectos endocrinos y conductuales de la fase aguda, donde estas moléculas influyen en el sistema nervioso. Los efectos del estrés psicológico pueden ser inmunosupresores o inmunoactivadores. Entre los inmunosupresores destaca la reducción de los niveles de IL-1, IL-2 e IFN-gamma. En cambio, algunos de los efectos proinflamatorios del estrés son mediados por un aumento en los niveles de IL-6, IL-1 y TNF- α inducidos por el neurotransmisor sustancia P. En la regulación de la inmunidad por condicionamiento se propone al IFN- γ y la IL-1 como posibles mensajeros entre los dos sistemas. A su vez, las citocinas proinflamatorias pueden activar el eje hipotálamo-hipofisis-adrenales e inducir cambios conductuales durante la respuesta de fase aguda, utilizando al nervio vago como vía para su detección por el sistema nervioso central. Se hace un recuento de los hallazgos recientes sobre la regulación de la expresión de citocinas por neurotransmisores del sistema nervioso simpático (adrenalina y la noradrenalina), pieza clave en estos mecanismos de comunicación cerebro-inmunidad. Se discuten mecanismos y vías posibles de comunicación entre el cerebro y la inmunidad, así como la posible participación de otras citocinas.

Palabras clave. Psiconeuroinmunología. Citocinas. Neuroimmunomodulación. Mecanismos.

do. Desde hace varias décadas se contaba ya con evidencias de que distintos factores psicológicos como el estrés o los estados de ánimo están relacionados con la incidencia de enfermedades en las que está involucrado sistema inmune. Se acuñó entonces el término

Cuadro 1. Algunos campos de estudio en psiconeuroinmunología.

Factores psicosociales e inmunidad: Papel del estrés en enfermedades infecciosas Correlación entre depresión e incidencia de cáncer Influencia del apoyo psicosocial en la inmunidad
Moléculas comunes en ambos sistemas: Regulación de la producción de anticuerpos por neurotransmisores Receptores a neurotrofinas en células inmunocompetentes
Inmunoendocrinología: Regulación de la inflamación por glucocorticoides endógenos Efectos de las citocinas en órganos no linfoides Papel de las hormonas sexuales en la inmunidad
Neuroanatomía: Inervación de órganos linfoides Papel del nervio vago en la fase aguda Expresión de citocinas en células nerviosas
Modelos psicológicos experimentales: Condicionamiento pavloviano Estrés experimental (choque eléctrico, baño en agua fría)
Regulación de la conducta por la respuesta inmune: Cambios conductuales por fase aguda Opioides en inflamación y percepción del dolor Respuesta a virus Epstein Barr y síndrome de cansancio crónico

psiconeuroinmunología¹ para integrar diversos estudios que demostraban la influencia, mediada por el sistema nervioso, de la conducta en la inmunidad. Desde entonces se han revisado extensamente, bajo este título, un gran número de trabajos de investigación en disciplinas muy distintas: endocrinología, neuroanatomía, psicología experimental, psiquiatría, etc.²⁻⁷, todos los cuales demuestran la existencia de interacciones bidireccionales entre el sistema nervioso y el sistema inmune (Cuadro 1).

Los fenómenos psiconeuroinmunológicos son adaptaciones a situaciones ambientales complejas que incluyen retos inmunogénicos y estímulos sensoriales.⁸ De estos fenómenos, el más estudiado es la inmunomodulación por estrés, la cual es un conjunto de efectos inmunes ocasionados por la exposición a distintos retos ambientales. Un fenómeno que ha aportado evidencias útiles a esta disciplina es la regulación de la respuesta inmune mediante condicionamiento conductual, descrita desde principios del siglo XX.⁹ Otro modelo importante de comunicación neuroinmune es la inducción de cambios fisiológicos y conductuales durante la fase aguda por la acción de citocinas en el sistema nervioso central (SNC), que demuestra la posibilidad de una comunicación aferente; es decir, del sistema inmune al SNC. El hecho

de que las citocinas, proteínas secretadas por células del sistema inmune, tengan un papel central en la regulación de la respuesta inmune implica que su producción, sus niveles y sus efectos sean variables indispensables en la comprensión de los mecanismos de la comunicación neuroinmune.

El objetivo de esta revisión es, haciendo un repaso de los distintos fenómenos psiconeuroinmunológicos, resaltar los últimos hallazgos sobre el papel que en ellos juegan las citocinas. Se considerarán cuatro modelos de estudio de la comunicación neuroinmune en los que se ha demostrado una participación de estas moléculas como blanco de los efectos de la conducta en la inmunidad o como mediadoras de estos efectos. Estos son: 1) los efectos del estrés en la inmunidad, 2) el condicionamiento conductual de la respuesta inmune, 3) la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales y los efectos conductuales de la activación del sistema inmune y 4) la regulación de la respuesta inmune por el sistema nervioso autónomo. Se describirá su participación en la comunicación aferente (dirigida desde el sistema inmune hacia el SNC) y en la comunicación eferente, mediante la cual el sistema nervioso central puede regular la inmunidad.

ESTRÉS Y CITOCINAS

El estrés ha sido la variable psicológica más estudiada en psiconeuroinmunología (revisado en 2,4). Los estudios del estrés en el sistema inmune utilizan todo tipo de estímulos externos que interfieren con la homeostasis del organismo, como el estrés metabólico, la ansiedad, los eventos disruptivos, los retos académicos, los retos sociales, el ejercicio, la depresión, etc. Esta gran variedad de formas de estrés tiene efectos muy diversos en el sistema inmune, algunos aparentemente contradictorios (Cuadro 2). Es importante descartar la creencia general de que el estrés es solo inmunosupresor, pues, como se discute a continuación, algunas formas de estrés, tanto en animales de laboratorio como en humanos, pueden dar lugar a la sobreexpresión de citocinas y el aumento en algunas funciones de la respuesta inmune. Se ha propuesto que esta diversidad de efectos podría depender de la duración del estrés estudiado, así como del modelo particular de estrés que se utilice.¹⁰ Otras variables que pueden influir en el efecto inmune observado son el tipo de agente estresante (estrés metabólico o estrés psicológico), su intensidad, el grado en que se puede controlar, lo novedoso que resulte al sujeto, su frecuencia y su predecibilidad.¹¹

Cuadro 2. Algunos efectos del estrés

Tipo de estrés	Ejemplo de efecto
Psicosocial crónico (humanos)	Reducción en producción de IL-1 e IL-2 in vitro. Menor activación de células NK por citocinas. ¹²
Psicosocial (animales)	Aumento de cortisol en plasma. ¹⁶
Académico	Aumento de IL-1 en encías. ²¹
Agudo experimental	Alteración en isotipos de anticuerpos. ²⁰
Agudo experimental	Aumento de IL-6 y sustancia P. ²⁸
Agudo experimental	Aumento de citocinas proinflamatorias asociadas a aborto. ³⁴

El estrés como inmunosupresor

Dos formas de estrés en humanos que tienen efectos inmunosupresores son el estrés académico y el estrés marital. Se ha visto una disminución en la actividad de las células asesinas naturales (células NK), una reducción en la respuesta de linfocitos a concaivalina A (mitogénesis y producción de interferón- γ y a una menor respuesta de células T a antígenos del virus Epstein-Barr in vitro en estudiantes durante las temporadas de exámenes, comparados con otros momentos del año escolar.¹² De la misma manera, cuidar a un cónyuge con demencia progresiva está asociado a una supresión a largo plazo en la respuesta a mitógenos, la producción de interleucinas 1 y 2 in vitro, y en la respuesta celular y de anticuerpos al virus de influenza. Estos efectos inmunes coinciden con efectos endocrinos como la elevación de los niveles plasmáticos de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) y disminución en la expresión de la hormona del crecimiento en células mononucleares de sangre periférica.¹² Entre los efectos del estrés asociado a conflictos maritales destaca la disminución en la capacidad de las células NK de ser activadas por la interleucina 2 (IL-2) o por el interferón γ (IFN- γ).¹³ Las alteraciones en la actividad de células NK son importantes, pues se han propuesto como mediadoras del riesgo de cáncer asociado a eventos disruptivos.¹⁰

Muchos de los efectos inmunosupresores del estrés se pueden atribuir a la acción de los glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) y las catecolaminas (noradrenalina y adrenalina), conocidos como "hormonas de estrés."¹⁴ El estrés activa el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales y los glucocorticoides inducidos tienen diversos efectos antiinflamatorios e inmunosupresores.^{11:15} Por ejemplo, los glucocorticoides endógenos, inducidos por estrés psicosocial en primates, reducen la capacidad de la interleucina 1 (IL-1) sistémica de aumentar los niveles de IL-6.¹⁶ El estrés también ocasiona una activación del sistema nervioso simpático, la cual puede

actuar sobre sistema inmune tanto a través de la inervación de los órganos linfoides (ver "Regulación de las citocinas por el sistema nervioso autónomo" más adelante) como mediante la producción de adrenalina en glándulas adrenales. En este sentido, han sido importantes los estudios que utilizan la adrenalectomía,¹⁴ la cual altera la respuesta a la inoculación de lipopolisacárido bacteriano en varios órganos, aumentando la expresión de IL-1a en bazo y la expresión de varias citocinas proinflamatorias en el sistema nervioso central. La adrenalectomía disminuye además la expresión de receptores a IL-1 en distintos tejidos, mientras que el estrés la aumenta.¹⁷ La acción concertada de la activación simpática y la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (eje HHA) por estrés en la inmunidad ha sido demostrada en un modelo de respuesta a la infección viral, en el que el estrés por sujeción disminuye la respuesta celular y de anticuerpos a virus de la influenza y a virus del herpes simplex. Se encontró que la corticosterona está involucrada en la disminución en la respuesta proliferativa y de citocinas al virus, mientras que tanto la corticosterona como los agonistas adrenérgicos son necesarios para que se dé la reducción en la respuesta citofítica al virus.¹⁸

Las células T se dividen en las subpoblaciones funcionales Th1 y Th2, cada una con un patrón típico de expresión de citocinas, involucradas en diferentes funciones efectoras de la respuesta inmune.¹⁹ Es posible que una polarización en la producción de citocinas hacia un patrón Th2 sea el fenómeno subyacente en algunos efectos inmunosupresores del estrés. Esta posibilidad es apoyada por experimentos que muestran que el estrés hemorrágico reduce los niveles de interferón- γ (IFN- γ citocina Th1) y factor de necrosis tumoral (TNF, monocina proinflamatoria) producidos en respuesta al lipopolisacárido bacteriano.¹¹ En un modelo de estrés agudo (el choque eléctrico inescapable en ratas) se ha encontrado una reducción en la respuesta de anticuerpos IgG a la hemocianina, la cual afecta en forma diferencial a cada

subtipo: la IgG2a (isotipo dependiente de citocinas Th1) se reduce, mientras que la IgG1 no es afectada. Este efecto está asociado a una reducción en la producción de IFN- γ por linfocitos mesentericos y en la cantidad total de IFN- γ durante el cambio de isotipos.²⁰ En este efecto participa el eje HHA, como lo demuestra la posibilidad de bloquear este efecto administrando un antagonista de glucocorticoides durante la exposición al agente estresante. Una polarización de este tipo puede tener una gran importancia en la defensa frente a infecciones y en el desarrollo del cancer y las enfermedades autoinmunes.

Estrés inmunoactivador

Los efectos del estrés en la inmunidad son complejos y no son necesariamente inmunosupresores. Varios estudios demuestran un aumento de procesos inflamatorios o de los niveles de citocinas proinflamatorias asociados a estrés. En humanos, se ha demostrado que el estrés académico, al mismo tiempo que disminuye los niveles de IgA en la saliva y la actividad de células NK, está asociado a un aumento significativo en los niveles de IL-1 periodontal.²¹ En ratones, el estrés agudo aumenta notablemente la hipersensibilidad retardada a 2,4-dinitrofluorobenceno: efecto en el que está involucrado el IFN- γ ²² Para poder explicar los efectos del estrés crónico y agudo en la salud se tendrán que tomar en cuenta estos efectos duales en la inmunidad.

También los niveles de IL-6 pueden ser aumentados por el estrés. Se ha encontrado un aumento en los niveles plasmáticos de IL-6 en tres modelos de estrés en animales de laboratorio: el choque eléctrico, la exposición a un sonido previamente asociado al choque eléctrico y la inmovilización. Existe la posibilidad de que esta IL-6 tenga un origen no inmune, pues depende de la integridad de las glándulas suprarrenales y no proviene de la misma fuente que la inducida por el choque séptico.²³ Sin embargo, el origen de la IL-6 inducida por estrés también puede ser inmune, según indica un estudio fisiológico en el que la perfusión de adrenalina en el hígado da lugar a la producción de IL-6 por las células de Kupfer, en forma dependiente de los receptores β adrenérgicos. Esta hormona de estrés aumenta también la producción de IL-6 en respuesta al LPS, mientras que disminuye la respuesta de TNF al LPS.²⁴ Será del mayor interés conocer las repercusiones en la respuesta inmune de este efecto diferencial de la adrenalina en la IL-6 y el TNF.

Así como el estrés puede estar asociado a un aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias, puede relacionarse con una reactivación de varias

enfermedades inflamatorias. En animales de laboratorio, el estrés dispara la desgranulación de células cebadas de la piel, las cuales liberan mediadores proinflamatorios y moléculas vasoactivas. Esto podría ayudar a explicar la patofisiología de enfermedades neuroinflamatorias de la piel como la dermatitis atópica y la psoriasis, las cuales son exacerbadas por el estrés.²⁵ En este sentido, se ha evaluado la hipótesis de una mediación simpática en la psoriasis y se ha encontrado que el estrés experimental en pacientes con psoriasis (hablar en público y hacer aritmética en público) es capaz de aumentar los niveles de catecolaminas en plasma, mientras que induce una ligera disminución en los niveles de cortisol. Este efecto diferencial en las dos hormonas de estrés está asociado a un aumento significativo de la actividad de células NK en pacientes tratados con psoralenos y luz ultravioleta.²⁶ En pacientes con esclerosis múltiple, el estrés por hablar en público aumenta los niveles de IL-1, TNF- α e IFN- γ en sangre sin alterar los niveles de IL-4 (citocina Th1). Se propone que este efecto podría agravar cuadros de esclerosis múltiple después de eventos estresantes.²⁷ La exacerbación de distintas enfermedades autoinmunes por el estrés sugiere un efecto desregulador de éste en la inmunidad, más que una mera inmunosupresión.

Estrés, sustancia P y citocinas proinflamatorias

Conociéndose estos efectos del estrés en la IL-1, la IL-6 y el IFN- α resulta necesario saber qué señales provenientes del SNC inician estos efectos. Varias evidencias muestran que la sustancia P, péptido neurotransmisor del sistema nervioso autónomo simpático, puede mediar al menos en parte un aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias. En el caso del aumento en la IL-6, la mediación de la sustancia P ha quedado demostrada con el modelo de estrés por inmersión en agua fría. Este tipo de estrés aumenta la producción de IL-6 por macrófagos peritoneales en respuesta al LPS, en forma paralela a un aumento en los niveles de sustancia P en fluido peritoneal y a una reducción de los niveles del neurotransmisor en los tejidos peritoneales. El origen nervioso de la SP se demostró bloqueando este efecto al destruir con capsaicina las fibras nerviosas liberadoras de este péptido.²⁸

Existen otras evidencias de la posible participación de la sustancia P en los efectos proinflamatorios del estrés. Por ejemplo, se sabe que la innervación peptidérgica es necesaria para la inflamación local en la artritis reumatoide y la SP ocasiona in vitro la producción de citocinas proinflamatorias, prosta-

glandina E2 (mediador de la respuesta de fase aguda) y tromboxano B2 por macrófagos, así como la desgranulación de basófilos. Estas evidencias hay que sumarlas a la participación de la SP en los mecanismos de la inflamación neurogénica (revisado en 29). La desgranulación de células cebadas de la piel inducida por estrés agudo en ratas involucra a la neurotensina y la SP.²⁵ Se ha planteado también que la sustancia P está posiblemente involucrada en el empeoramiento de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa asociado a estados de estrés.³⁰

El modelo de aborto por estrés en ratones, un caso bien demostrado de comunicación neuroinmune, es posiblemente mediado por la sustancia P y las citocinas proinflamatorias. El aborto experimental en ratones es inducido por la aplicación de un sonido intenso durante veinticuatro horas a hembras recién preñadas. Se sabe, con base en varias evidencias, que la reabsorción se debe a un proceso inflamatorio específico contra los embriones. Se ha encontrado que la inmunización previa de las hembras con moléculas de histocompatibilidad proveniente de los machos con los que serían cruzadas las protege del efecto abortivo del estrés. Este efecto protector se logra también bloqueando las células NK de la madre con un anticuerpo contra el gangliósido M1, molécula de reconocimiento importante en la citotoxicidad mediada por células. Por otra parte, una población de linfocitos CD8+ parece estar involucrada en la protección normal contra el aborto, pues su eliminación con anticuerpos anti CD8 aumenta la reabsorción de embriones de la misma manera que lo hace el estrés.³¹ Por esta razón se propone que las CD8 podrían producir un factor protector contra el aborto que es inhibido por el estrés. Además, la eliminación de la subpoblación α -TCR de células T bloquea el aborto por estrés.³² Todo esto apunta también a la mediación inmune del aborto por estrés.

El aborto por estrés requiere de la presencia de SP proveniente de fibras nerviosas en el útero (decidua). Esto se demostró bloqueando este efecto mediante la destrucción de fibras liberadoras de SP con capsaicina y mediante la aplicación de antagonistas específicos. La presencia de SP está correlacionada además con un aumento local de los niveles de TNF- α y una reducción del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β).³³ Este efecto no parece deberse a la alteración en la progesterona, lo que sugiere la participación de un mecanismo no hormonal. Se sabe que la IL-1 también está involucrada en este proceso, pues su bloqueo, al igual que el bloqueo de la TNF- α reduce significativamente el efecto abortivo del estrés.³⁴ Es posible que los macrófagos locales o

las células del endometrio, posiblemente estimuladas por SP, participen en la producción de estas citocinas. Todas estas evidencias experimentales sugieren la existencia de una vía de comunicación neuroinmune, mediada por neurotransmisores y citocinas, en el aborto por estrés (Figura 1). La existencia de esta vía es importante porque otras vías de comunicación neuroinmune de este tipo podrían estar participando en otros casos de neuroinmunomodulación, como el condicionamiento pavloviano y los diversos efectos del estrés en la inmunidad. El papel de otros neurotransmisores, neuropéptidos, hormonas y citocinas deberá ser investigado.

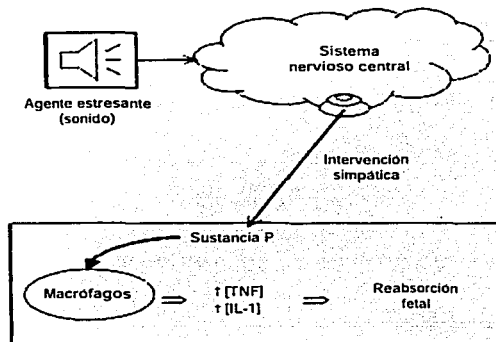


Figura 1. Modelo de la ruta de inmunomodulación posiblemente involucrada en el aborto inducido por estrés.

EL CONDICIONAMIENTO CONDUCTUAL DE LA RESPUESTA INMUNE

Los fenómenos de condicionamiento de la respuesta inmune constituyen un modelo excelente para el estudio de la comunicación neuroinmune, pues permiten separar las vías y las señales aferentes (del sistema inmune al sistema nervioso central) de las eferentes (del sistema nervioso central al sistema inmune). Los primeros estudios sobre la posibilidad de regular la respuesta inmune mediante un condicionamiento conductual datan de principios del siglo XX y tienen como antecedente directo el descubrimiento del reflejo condicionado por Ivan Pavlov

(citado en 9) y la elucidación posterior de sus mecanismos moleculares por investigadores como Eric Kandel.³⁵ Como en todo condicionamiento clásico o pavloviano, en los fenómenos de condicionamiento inmune existe un estímulo incondicionado (EI), es decir, aquel capaz de ocasionar siempre un efecto. Este estímulo puede ser un agente inmunosupresor o inmunoadivador. Existe también un estímulo condicionado (EC), que es un estímulo sensorial (por ejemplo, un olor o un sabor), cuya detección por el animal no altera normalmente la función en cuestión, pero que después de haberse presentado asociado en el tiempo con la exposición al estímulo incondicionado puede despertar el efecto medido: la respuesta condicionada. El condicionamiento clásico es un fenómeno de aprendizaje y memoria que implica la asociación por el cerebro del EC y el EI, durante la adquisición del condicionamiento. Implica también el almacenamiento de esta información a largo plazo, la cual se manifestará posteriormente, en la fase eferente o evocación, en la que el sistema nervioso central, al detectar el EC, incide en el funcionamiento de la respuesta inmune. Las posibilidades planteadas por estos fenómenos son muy interesantes, a pesar de que su investigación es todavía incipiente.

En el condicionamiento inmunosupresor, la exposición a un sabor o un olor novedoso es apareada con la exposición a un agente inmunosupresor como la ciclofosfamida³⁶ o el suero antilinfocitario,³⁷ entre otros. Posteriormente, es posible observar una inmunosupresión como respuesta condicionada a la simple reexposición al estímulo sensorial. El fármaco inmunosupresor es el EI y el sabor u olor constituyen el EC. La respuesta condicionada se mide como una disminución en la respuesta de anticuerpos a un antígeno, la proliferación de linfocitos o en la actividad de las células asesinas naturales o células NK (revisado en 38). La investigación moderna del condicionamiento de la respuesta inmune se inició cuando se condicionó accidentalmente el efecto inmunosupresor de la ciclofosfamida en estudios en los que era utilizada como generadora de malestar gástrico apareada al sabor de la sacarina. En estos estudios se observó una mayor mortandad, asociada a inmunosupresión, en los animales reexpuestos repetidamente al sabor a sacarina durante ensayos de extinción del condicionamiento de aversión al sabor. Estudios posteriores demostraron y caracterizaron debidamente el fenómeno.³⁶

Existe también la inmunoadactivación por condicionamiento o condicionamiento inmunoadivador. Se han descrito aumentos condicionados de la actividad de células, NK^{39,40} la liberación de histamina y pro-

teasa por las células cebadas,^{41,42} la hipersensibilidad retardada,⁴³ la citotoxicidad mediada por células a tumores y transplantes,^{44,45} y la producción de anticuerpos.⁴⁶⁻⁴⁹ En el modelo de aumento condicionado de la producción de anticuerpos (Figura 2), la administración del antígeno es apareada a un estímulo gustativo u olfativo. Después de que la respuesta de anticuerpos inicial regresa a sus niveles basales, la reexposición al sabor u olor da lugar a una reactiva-

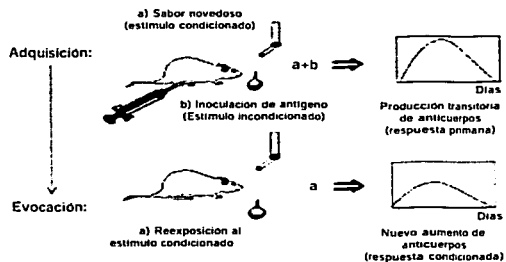


Figura 2. Esquema de las fases que constituyen el aumento condicionado de los niveles de anticuerpos y su orden de ocurrencia.

ción de los niveles de anticuerpos.

Llama la atención la capacidad discriminatoria del sistema nervioso sobre los estímulos provenientes del sistema inmune. Dado que la sacarina se puede utilizar como estímulo condicionado tanto en condicionamientos inmunoadivadores como en inmunosupresores, se justifica pensar que el sistema nervioso puede distinguir una supresión de una activación del sistema inmune. La detección de estos distintos estados necesita entonces estímulos incondicionados diferentes, provenientes presumiblemente del sistema inmune y codificados de manera diferente en el SNC. Es importante, por lo tanto, conocer qué moléculas provenientes del sistema inmune, funcionando como EI, podrían permitir al sistema nervioso central lograr dicha discriminación.

Las citocinas como mensajeros aferentes

El condicionamiento de la respuesta inmune es uno de los fenómenos que aportan evidencias de la capacidad del SNC de detectar estados de la respuesta inmune por medio de señales generadas por las citocinas. Se ha propuesto este tipo de co-

municación en el aumento condicionado de la actividad de las células NK. Estas células son una población involucrada en la destrucción de células infectadas por virus y células tumorales. Se ha reportado la modificación de su actividad mediante un procedimiento de condicionamiento utilizando el olor de alcanfor como EC y la administración del ácido polinosínico-policitídílico (poli-I:C, agente activador de células NK), como EI. El efecto condicionado descrito es una activación de las células NK por la reexposición al estímulo olfativo (revisado en 50).

Varias evidencias han llevado a proponer que el interferón beta (IFN- β) inducido por el poli I:C actúa como EI, es decir, como generador de la señal aferente en este condicionamiento.⁵¹ En primer lugar, la administración del EI aumenta los niveles sistémicos de IFN- β . En segundo lugar, la inyección en el cerebro de esta citocina puede sustituir a la inyección sistémica de poli-I:C en la inducción del condicionamiento. Estos dos hallazgos podrían deberse a que el IFN- β producido sistémicamente en respuesta al poli I:C llega al cerebro o induce la producción de más IFN- β en el cerebro, donde genera una señal asociable con EC. Sin embargo, para que estas dos evidencias tuvieran valor, se tendría que demostrar que el IFN- β sistémico puede entrar o inducir la producción de nuevo IFN- β en el SNC. Concuera con esta posibilidad el hecho de que otra citocina, la interleucina 1 (IL-1) es inducida centralmente después de una estimulación inmune sistémica.⁵² Se sabe además que también la interleucina 1a (IL-1a), aplicada directamente en el SNC por inyección intracerebroventricular puede sustituir al poli I:C sistémico en este modelo de condicionamiento.⁵³

La posibilidad de que citocinas de origen sistémico actúen como estímulos incondicionados es apoyada por el hecho de que el lipopolisacárido intraperitoneal, cuya administración induce la expresión de citocinas como la IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la IL-1, al ser apareada con el EC permite también replicar el condicionamiento de la activación de células NK.⁵³ Independientemente de estos resultados, resulta importante que la inmunoadactivación por la administración sistémica de interferón gamma (IFN- γ) haya sido condicionada en humanos siguiendo un esquema pavloviano.⁵⁴ En suma, deberá investigarse qué citocinas presentes sistémicamente pueden generar señales neurales asociables con estímulos sensoriales y así funcionar como estímulos incondicionados.

Las citocinas como mediadores eferentes

En la fase de evocación de los condicionamientos la exposición al EC da lugar a cambios en la respuesta inmune. Dado que los estímulos condicionados utilizados, como estímulos ambientales, deben ser detectado por el sistema nervioso central, la evocación requiere que eventos iniciados en el SNC puedan regular las funciones del sistema inmune. Se requiere, entonces, de una comunicación eferente, la cual para constituir un mecanismo importante de regulación de la respuesta inmune, tendría que estar también asociado a cambios en la expresión de citocinas. Los hallazgos en el condicionamiento de la inmunosupresión por ciclosporina A apoyan esta posibilidad. En este modelo se demostró que el efecto condicionado, un aumento en la sobrevida de aloinjertos, está asociado a una disminución en los niveles de IL-2 en el bazo.⁵⁵ Esta reducción en los niveles de IL-2 requiere de la integridad de la inervación simpática del bazo, pues la ablación de esta inervación dejando intacto y funcional el bazo reduce significativamente el efecto condicionado (ver "Regulación de las citocinas por el sistema nervioso autónomo", más adelante).

LAS CITOCINAS Y LOS EFECTOS DE LA FASE AGUDA

Activación del eje

hipotalamo-hipófisis-adrenales

La mejor prueba hasta el momento de que existe una comunicación funcional, específica y con importancia biológica entre el sistema nervioso central y el sistema inmune es la regulación mutua entre el eje hipotalamo-hipófisis-adrenales y la respuesta inmune.⁵⁶ La infección por virus de Newcastle es uno de los modelos para estudiar este circuito de comunicación neuroendocrina.⁵⁷ En este modelo de infección viral se observan niveles elevados de glucocorticoides asociados a un aumento en los niveles de corticotropina (ACTH) de origen hipofisario. Se demostró inicialmente que estos efectos estaban mediados por un producto de la respuesta inmune al virus, y se obtuvieron evidencias de que dicho producto era la IL-1, la cual podía ser producida por células mononucleares de la sangre en respuesta al virus.⁵⁷ Dado que la IL-1 es capaz por sí misma de activar al eje HHA,⁵⁸ esta citocina es considerada como el más probable estimulador endocrino de origen inmune. Por otra parte, la activación hipofisaria-adrenal en respuesta a la IL-1 es mediada por la secreción del factor liberador de la hormona adrenocorticotrópica (CRF) en el hipotalamo.⁵⁹ Todos estos estudios demuestran

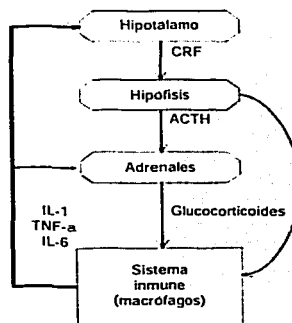
plenamente que los cambios endocrinos mencionados se deben a una activación del eje HHA por la IL-1, la cual puede provenir de la respuesta inmune a una infección.

Se han utilizado otros modelos de activación inmune para estimular el eje HHA, como la administración de lipopolisacárido bacteriano (LPS),⁶⁰ con la que se observa también una mediación de la interleucina 1, en este caso producida por los macrófagos. La IL-1 es la citocina más estudiada como activadora del eje HHA, pero se ha demostrado que el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6) también son capaces de ocasionar un aumento de los niveles plasmáticos de glucocorticoides, asociado a un aumento de CRF en el hipotálamo, de ACTH en la hipófisis y de una estimulación de las glándulas adrenales (revisado en 61). Del mismo modo, se sabe que el sitio de acción de la IL-1 no es solamente el SNC. Se ha demostrado que la IL-1 puede estimular directamente las adrenales.⁶¹

Varias evidencias sugieren que la activación del eje HHA no es un efecto secundario a otras alteraciones inducidas por la activación del sistema inmune, sino que constituye un fenómeno específico de regulación endocrina. Respecto a la especificidad de este efecto, la dosis intraperitoneal más efectiva para activar la actividad hipofisiaria-adrenal es incapaz de alterar las concentraciones plasmáticas de otras hormonas como la prolactina, la hormona luteinizante y la hormona estimulante de los melanocitos. Asimismo la inducción de CRF está delimitada anatómicamente en el hipotálamo a un subtipo particular de neuronas productoras de CRF.⁵⁹ Una evidencia importante en el sentido de la independencia de otros efectos es que esta activación endocrina no requiere de la inducción de la conducta aversiva asociada a la fase aguda. La IL-1 puede generar fiebre y malestar que, al ser asociados a un sabor novedoso, generan una aversión condicionada a dicho sabor.⁶² Del mismo modo, la activación del eje HHA por administración de IL-1 ha sido condicionada conductualmente, pero con dosis de IL-1 inferiores a las mínimas para inducir el condicionamiento de aversión al sabor.⁶³ Adicionalmente, la activación HHA es inducible en ausencia de fiebre.⁶⁰ Estas observaciones concuerdan con una detección específica de la IL-1 por el SNC.

Dado que los glucocorticoides regulan a su vez la expresión de la IL-1,⁵⁸ se puede hablar de la existencia de un circuito de regulación mutua entre el eje HHA y las células productoras de IL-1 (Figura 3). ¿Cuál es el significado biológico de este circuito? Esta red tiene una función reguladora de la respues-

ta inmune en condiciones fisiológicas. Se ha observado que los niveles de corticosterona producidos durante la respuesta inmune a la lisozima, antígeno proteico, dependen de la cantidad de IL-1 producida por los macrófagos del bazo, la cual está a su vez correlacionada positivamente con la dosis de antígeno. La cantidad de corticosterona endógena regula a su vez la cantidad de anticuerpos producidos contra el antígeno.⁶⁴ Este circuito podría ser más complejo e incluir a otros mensajeros, como sugiere el que la activación del eje HHA da lugar a un aumento sustancial de los niveles plasmáticos del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), citocina que contrarresta los efectos inmunosupresores de los glucocorticoides y que puede ser producida por la hipófisis.⁶⁵ La importancia biológica de este circuito de regulación endocrina hace necesario considerar a la acción del sistema nervioso dentro de los mecanismos de regulación de la respuesta inmune.



CRF = Factor liberador de la corticotropina.

ACTH = Corticotropina.

MIF: Factor inhibidor de la migración de macrófagos.

Figura 3. Diagrama que representa el circuito de regulación mutua entre el sistema inmune y el eje hipotálamo-hipofisis-adrenales.

Cambios conductuales

La respuesta de fase aguda consiste en una serie de efectos endocrinos, fisiológicos y conductuales de la inflamación.⁶⁶ Entre sus signos distintivos, además de la activación del eje HHA, están la fiebre y la

llamada conducta de enfermedad. Esta última consiste en una disminución de la exploración social, reducción de la actividad sexual, hipofagia, decremento en el consumo de agua y otros efectos conductuales.⁶⁷ Numerosos estudios han demostrado la participación del TNF- α ⁶⁸ la IL-6,⁶⁹ y la IL-170.⁷¹ en la inducción de la conducta de enfermedad y la fiebre, manifestaciones dependientes del SNC. Estos estudios han usado diferentes modelos de fase aguda, como la inyección sistémica de lipopolisacárido bacteriano (LPS o endotoxina), la inflamación aséptica por inyección local de trementina y la infección con virus influenza, los cuales inducen las citocinas mencionadas. También se ha utilizado la administración directa de las citocinas.

Una pregunta central es cómo detecta el cerebro dichas moléculas. Se han propuesto varios mecanismos.⁶⁷ Unos implican la detección en el cerebro de la IL-1 proveniente de la sangre (vía hematogena), mientras otro propone una transmisión de señales neurales de origen periférico, inducidas por la IL-1 sistémica, hasta el SNC. A pesar de que la comunicación hematogena explicaría la presencia de receptores a citocinas en numerosas zonas del cerebro incluyendo al hipotálamo,^{72;73} numerosas evidencias favorecen la existencia de una vía neural de comunicación.⁵²

Inicialmente se pensaba que la fiebre se induce al difundirse pasivamente la IL-1 a través de las fenestraciones del endotelio vascular de los órganos circunventriculares (por ejemplo, el órgano vasculoso de la lámina terminal -OVLT- o el área postrema), estimulando a los astrocitos a producir prostaglandinas, mediadoras de varias manifestaciones de la fase aguda (revisadas en 74). Esta posibilidad ha sido descartada con base en el hecho de que la fiebre requiere la acción de prostaglandinas en zonas del cerebro no accesibles desde el OVLT, lo mismo que su presencia en la sangre, desde donde pueden difundir a diversas áreas sin necesidad de ser sintetizadas en el OVLT.⁷⁴ Con mejores evidencias, se ha estudiado a fondo la existencia de un sistema de transporte de la IL-1 a través de los capilares cerebrales mediado por un acarreador saturable y de cierta especificidad,⁷⁵⁻⁷⁸ pero la importancia fisiológica de este modo de transporte no se ha demostrado.⁷⁴ Se ha propuesto también la participación del endotelio vascular como interfase activa entre la sangre y el SNC, sin que ocurra un paso de la IL-1 al cerebro. La función del epitelio sería liberar sustancias como las prostaglandinas en el lado cerebral de la BHE, como efecto de la unión de IL-1 a sus receptores en el lado sanguíneo.⁶⁷ Se le objeta a esta idea el hecho de que, si

bien hay receptores a IL-1 en el endotelio de toda la vasculatura cerebral, los efectos de la IL-1 sistémica involucran sólo a ciertas regiones cerebrales.⁷⁴

La hipótesis de que la comunicación entre el sistema inmune y el SNC es mediada por el sistema nervioso periférico ha ganado mucho respaldo gracias a diferentes evidencias, entre las que resaltan las siguientes:

1. El nervio vago participa en la inducción de la fase aguda:

La vagotomía subdiafragmática reduce sustancialmente varios efectos de la IL-1, como la anorexia,⁷⁹ la hipertermia,⁸⁰ el agotamiento de la norpinefrina hipotalámica y la elevación de corticosterona plasmática.⁸¹

2. El nervio vago puede detectar IL-1:

Se ha encontrado una alta densidad de sitios de unión específicos para IL-1 en los paraganglios vagales, estructuras que rodean a las terminales del vago.⁸² Estos sitios de unión podrían ser funcionales, pues la IL-1 activa las neuronas primarias aferentes de esta vía.⁸³

Estas evidencias se han integrado en un modelo según el cual la interleucina 1 es detectada en los paraganglios vagales cuando se une a receptores específicos, generándose una señal neural que activa entonces el eje HHA y ocasiona los demás efectos de la fase aguda.⁵² Un aspecto interesante de este modelo es que es compatible con la existencia de receptores a IL-1 en distintas estructuras del cerebro. El LPS y la IL-1 misma, administrados sistémicamente, inducen la expresión de IL-1b en el SNC,⁸⁴ el cual se cree que actúa como relevo entre la señal vagal y los eventos centrales. Esto explicaría que la IL-1 es capaz de inducir cambios conductuales como la anorexia cuando es administrada directamente en el hipotálamo ventromedial en dosis muy bajas.⁷⁹

Cabe aclarar que las otras vías de comunicación no quedan excluidas, pues la vagotomía no bloquea totalmente (sólo atenúa) la fiebre y la conducta de enfermedad inducidas con LPS y tampoco suprime completamente la capacidad de la IL-1 de generar los efectos propios de la fase aguda.^{79;80} Adicionalmente, la reducción de los efectos de la IL-1 por vagotomía ocurre solamente cuando la citocina es administrada o inducida intraperitonealmente.^{85;86} lo que apoya la posibilidad de que la IL-1 inducida en la sangre siga otra vía al cerebro. La existencia de diferentes vías se podría explicar por una participación en efectos centrales diferentes. Resalta en este sentido que el núcleo paraventricular del hipotálamo es estimulado tanto por señales neurales originadas vagalmente como por IL-1 de origen central y prosta-

glandinas, constituyendo una posible encrucijada entre las vías hematógica y neural.⁶⁷ Queda por aclararse la contribución de la IL-6 y el TNF- α a una comunicación por vía neural, pues se ha encontrado expresión de IL-6 y de su receptor en ganglios sensoriales y simpáticos de la rata, inducibles por la presencia de TNF- α .^{87,88}

Se cree que la capacidad de las citocinas de dar aviso al cerebro para generar cambios neuroquímicos, neuroendocrinos y conductuales podría explicar los efectos neuropsiquiátricos observados en pacientes tratados con interferones o interleucinas. La inducción de la conducta de enfermedad se considera una hipótesis viable en la patogénesis de algunos tipos de depresión.⁸⁹

REGULACIÓN DE LAS CITOCINAS POR EL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO

La activación del sistema endocrino no es la única vía a través de la cual puede el cerebro inducir cambios en el funcionamiento del sistema inmune. La comunicación mediante moléculas liberadas por el sistema nervioso directamente en el sistema inmune es igualmente importante (Figura 4). Un descubrimiento central en este sentido ha sido el de la existencia de terminales autónomas simpáticas en los órganos linfoides secundarios. Así, se han encontrado en el bazo y los ganglios linfáticos de distintos mamíferos terminales simpáticas que hacen contactos parecidos a sinapsis con macrófagos, células T y algu-

nas células B.^{90,91} Se han descrito también inervaciones simpáticas próximas a las células de Langerhans de la piel.⁹² Otros sitios en los que puede haber un contacto directo entre sistemas son el tracto respiratorio⁹³ y los órganos linfoides primarios, como el timo.⁹⁰

Estudios subsiguientes han demostrado la funcionalidad de estas inervaciones. Se sabe que son capaces de responder a mediadores solubles de la inmunidad como la IL-1, y de secretar neurotransmisores con actividad en las células inmunocompetentes en respuesta a diferentes estímulos.⁹⁴ Algunos efectos fisiológicos de la administración sistémica de IL-1, como la hipoglucemia y la leucocitosis, son abolidos por la destrucción de fibras noradrenérgicas y por el bloqueo de ganglios nerviosos,⁹⁵ lo cual muestra una participación del sistema nervioso autónomo en dichos efectos. La administración de IL-1 ocasiona la liberación de noradrenalina en el bazo, en la que interviene el hipotálamo,⁹⁶ lo cual indica una mediación del sistema simpático en un efecto del SNC en un órgano linfóide.

Estudios *in vitro* e *in vivo* muestran una participación de la inervación noradrenérgica de los órganos linfoides secundarios en las funciones de las células T y B. De las subpoblaciones Th1 y Th2 de linfocitos T, sólo las Th1 expresan receptores β adrenérgicos funcionales⁹⁷ y responden a agonistas adrenérgicos con un aumento en los niveles intracelulares de AMP cíclico. La presencia de agonistas adrenérgicos ocasiona en estas células una disminución en la respuesta proliferativa específica a antígenos y en la producción de IFN- γ así como una reducción de la producción *in vitro* de anticuerpos IgG2a por células B (isotipo dependiente de citocinas producidas por células Th1, como el IFN- γ y la IL-2).⁹⁷ La expresión diferencial de receptores se observa también en células T activadas. En las células Th1 activadas la producción de IL-2 se ve alterada por la presencia de agonistas adrenérgicos.⁹⁸ La regulación diferencial de la expresión de citocinas Th1 y Th2 podría tener importancia biológica, ya que la noradrenalina proveniente de las inervaciones noradrenérgicas periféricas es necesaria en la respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos Th2, según muestran estudios *in vivo* usando ratones con inmunodeficiencia severa combinada (ratones SCID) reconstituidos con poblaciones monoclonales de células T y B. Estos estudios han demostrado además que los receptores β 2 adrenérgicos en células B participan en la regulación simpática de la respuesta inmune. Destruyendo selectivamente las inervaciones noradrenérgicas periféricas con 6-hidroxidopamina,

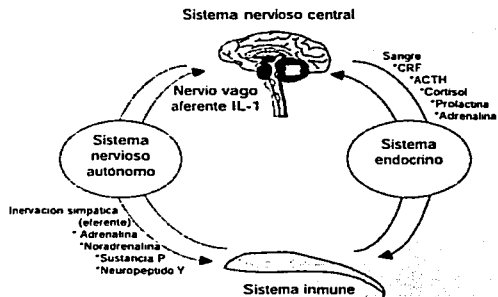


Figura 4. Representación de las vías demostradas de comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el SNC. Se enumeran algunos de los mediadores más estudiados.

se encontró que la estimulación noradrenérgica es necesaria para el mantenimiento de una respuesta de anticuerpos IgG-1 primaria y secundaria.⁹⁹ Todos estos estudios sugieren que el sistema simpático tiene la capacidad de influir en el balance Th1/Th2, lo cual hace posible que estímulos ambientales que activan el sistema simpático, como el estrés, sean inmunomoduladores.

La rama parasimpática del sistema nervioso autónomo, compuesta por vías colinérgicas (liberadoras del neurotransmisor acetilcolina), también puede participar en la neuroinmunomodulación. In vitro, la acetilcolina inhibe la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias por células mononucleares. In vivo, la estimulación eléctrica del nervio vago tiene efectos antiinflamatorios.¹⁰⁰ Estos datos pueden explicarse si se toma en cuenta la existencia de terminales colinérgicas en ganglios linfáticos.⁹⁰ Gracias a estos estudios se cuenta ya con evidencias sólidas de la participación de las dos ramas del sistema nervioso autónomo (simpática y parasimpática), además del sistema endocrino, en la regulación de la respuesta inmune. El papel de esta red reguladora en fenómenos de regulación de la inmunidad por la conducta será el siguiente problema a abordar en esta área de estudio.

CONCLUSIONES

Las evidencias aquí discutidas permiten concluir que los niveles de citocinas, tanto de las producidas por monocitos-macrófagos (IL-1, IL-6 y TNF- α) como las producidas por linfocitos (IL-2, IL-4, IFN- γ entre otras) son modificados in vivo por señales provenientes del cerebro y transmitidas por el sistema nervioso autónomo y el sistema endocrino. Esta conclusión adquiere significado al tomar en cuenta que el sistema nervioso central puede regular las funciones de la respuesta inmune y que las citocinas tienen un papel central en la regulación de la inmunidad. Esta regulación explica la posibilidad de modificar el funcionamiento de la respuesta inmune al incidir conductualmente en los individuos de varias maneras, como el condicionamiento pavloviano y la exposición a diferentes estresantes psicológicos. Del mismo modo, la capacidad de citocinas como la IL-1 de influir en el funcionamiento del sistema nervioso central, al ser detectadas directa o indirectamente por éste, explica la modificación significativa de la conducta durante estados de activación de la respuesta inmune.

Todo lo anterior pone de manifiesto una regulación funcional mutua entre sistemas, la cual puede tener un gran significado biológico, como lo muestra

la capacidad del sistema simpático de polarizar los patrones de citocinas y los isotipos de anticuerpos producidos. El significado biológico y adaptativo de esta comunicación bidireccional se extiende a otras áreas, como la reproducción, donde se ha demostrado la intervención de los neurotransmisores y las citocinas en el aborto por estrés.

Muchos aspectos del papel de las citocinas en la comunicación neuroinmune están todavía por aclararse, como las vías seguidas por las señales entre los dos sistemas y la posible participación de muchas otras moléculas de origen inmune o nervioso. Todavía no se determina claramente la importancia de esta comunicación en enfermedades infecciosas y autoinmunes. Sin embargo, el estado actual del conocimiento en psiconeuroinmunología plantea posibilidades muy interesantes, tanto para la comprensión de diversas enfermedades como para futuras aplicaciones clínicas.

REFERENCIAS

- Solomon GF. Psychoneuroimmunology: Interaction between central nervous system and immune system. *Neuroscience Research*. 1987; 18: 1-10.
- Ader R (ed). *Psychoneuroimmunology*. New York: Academic Press, Inc.; 1981. p. 185-228.
- Husband AJ (ed). *Psychoimmunology*. Boca Raton: CRC Press; 1987. p. 163-174.
- Ader R, Felten DL, Cohen N (eds.). *Psychoneuroimmunology*. San Diego: Academic Press Inc.; 1991. p. 847-1011.
- Biondi M, Kotzianik GD. Psychoneuroimmunology today: Current concepts and relevance to human disease. En: Lewis CE, O'Sullivan C, Barraclough J, (eds). *The psychoneuroimmunology of cancer*. Oxford: Oxford University Press; 1994. p. 3-54.
- Schedlowsky M, Teves U, (eds). *Psychoneuroimmunology*. New York: Kluwer Academic/Plenum Press; 1999.
- Ader R, Cohen N, Felten DL. Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *The Lancet*. 1995; 345: 99-103.
- Booth RJ, Ashbridge KR. Models of psycho-immune interplay and their impact on the directions of psychoneuroimmunological research. En: Husband AJ, (ed). *Psychoimmunology. CNS-Immune interactions*. Boca Raton: CRC Press, Inc.; 1993. p. 163-74.
- Ader R. A Historical Account of Conditioned Immunobiologic Responses. En: Ader R, (ed). *Psychoneuroimmunology*. New York: Academic Press; 1981. p. 321-52.
- Zanker KS. Correlation of psychological, endocrine, and immune parameters in cancer patients: the WITTEN study. En: Lewis CE, O'Sullivan C, Barraclough J, (eds). *The psychoneuroimmunology of cancer*. Oxford: Oxford University Press; 1994. p. 320-35.
- Weizman R, Bessler H. Cytokines: Stress and immunity-an overview. En: Ptomikoff NP, Faith RE, Murgu AJ, Good RA, (eds). *Cytokines stress and immunity*. Boca Raton: CRC Press; 1999. p. 1-15.
- Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-associated immune modulation: Relevance to viral infections and chronic fatigue syndrome. *American Journal of Medicine*. 1998; 105: 355-425.
- Esterling BA, Kiecolt-Glaser JK, Glaser R. Psychosocial modulation of cytokine-induced natural killer cell activity in older adults. *Psychosomatic Medicine*. 1996; 58: 264-72.
- Demetrikopoulos NK, Keller SE, Schleifer SJ. Stress effects on im-

- immune function in rodents. En: Schedlowsky M, Tewes U, eds. *Psychoneuroimmunology. An interdisciplinary approach*. New York: Kluwer Academic/Plenum Press; 1999. p. 259-75.
15. Pacak K, Palkovits M, Kvet, Yadiid G, Kopin IJ, Goldstein DS. Effects of various stressors on *in vivo* norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and on the pituitary-adrenocortical axis. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 771: 115-30.
 16. Reyes TM, Coe CL. Resistance of central nervous system interleukin-6 to glucocorticoid inhibition in monkeys. *Am J Physiol* 1998; 275: R612-R618.
 17. Goujon E, Layé S, Parnet P, Dantzer R. Regulation of cytokine gene expression in the central nervous system by glucocorticoids: mechanisms and functional consequences. *Psychoneuroendocrinology*. 1997; 22: S75-S80.
 18. Sheridan JF, Dobbs C, Jung J, et al. Stress-induced neuroendocrine modulation of viral pathogenesis and immunity. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 840: 803-8.
 19. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997; 18: 263-6.
 20. Flesher M, Brennan FX, Nguyen K, Watkins LR, Maier SF. RU-486 blocks differentially suppressive effect of stress on *in vivo* anti-KLH immunoglobulin response. *Am J Physiol* 1996; 271: R1344-R1352.
 21. Deinzer R, Förster P, Fuck L, Herforth A, Stiller-Winkler R, Idel H. Increase of crevicular interleukin 1b under academic stress at experimental gingivitis sites and at sites of perfect oral hygiene. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 1-8.
 22. Dhabhar FS, Satoskar AR, Bluthmann H, David JR, McEwen BS. Stress-induced enhancement of skin immune function: A role for gamma interferon. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 2346-51.
 23. Zhou D, Kusnecov AW, Shurin MR, DePaoli M, Rabin BS. Exposure to physical and psychosocial stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 1993; 133: 2523-30.
 24. Liao J, Keiser JA, Scales WE, Kunkel SL, Kluger MJ. Role of epinephrine in TNF and IL-6 production from isolated perfused rat liver. *Am J Physiol* 1995; 268: R896-R901.
 25. Singh LK, Pang X, Alexacos N, Letourneau R, Theoharides TC. Acute immobilization stress triggers skin mast cell degranulation via corticotropin releasing hormone, neurotensin, and substance P: A link to neurogenic skin disorders. *Brain Behav Immun* 1999; 13: 225-39.
 26. Schmid-Ott G, Jacobs R, Jager B, et al. Stress-induced endocrine and immunological changes in psoriasis patients and healthy controls. A preliminary study. *Psychotherapy and Psychosomatics*. 1998; 67: 37-42.
 27. Ackerman KD, Martino M, Heyman R, Moynan NM, Rabin BS. Stressor-induced alteration of cytokine production in multiple sclerosis patients and controls. *Psychosomatic Medicine* 1998; 60: 484-91.
 28. Zhu GF, Chancellor-Freeland C, Berman AS, et al. Endogenous substance P mediates cold water stress-induced increase in interleukin-6 secretion from peritoneal macrophages. *J Neurosci* 1996; 16: 3745-52.
 29. Black PH, Berman AS. Stress and inflammation. En: Plotnikoff NP, Faith RE, Margo AJ, Good RA, (eds). *Cytokines stress and immunity*. Boca Raton: CRC Press; 1999. p. 115-28.
 30. Anton PA, Shanahan F. Neuroimmunomodulation in inflammatory bowel disease. *Ann New York Acad Sci* 1998; 840: 723-34.
 31. Arck P, Meralli FS, Chaout G, Clark DA. Inhibition of immunoprotective CD8+ T cells as a basis for stress triggered substance P-mediated abortion in mice. *Cell Immunol* 1996; 171: 226-30.
 32. Arck P, Ferrick DA, Steele-Norwood D, Croitoru K, Clark DA. Regulation of abortion by ?? cells. *Am J Rep Immunol* 1997; 37: 87-93.
 33. Arck P, Meralli FS, Stanisz AM, et al. Stress-induced murine abortion associated with substance P-dependent alteration in cytokines in maternal uterine decidua. *Biol Reprod* 1995; 53: 814-9.
 34. Arck P, Trout AB, Clark DA. Soluble receptors neutralizing TNF- α and IL-1 block stress-triggered murine abortion. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 262-6.
 35. Carew TJ, Hawkins RD, Abrams TW, Kandel ER. A test of Hebb's postulate at identified synapses which mediate classical conditioning in *Aplysia*. *J Neurosci*. 1984; 4: 1217-24.
 36. Ader R, Cohen N. Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosom Med* 1975; 37: 333-40.
 37. King MG. Behaviorally conditioned immunosuppression using anti-lymphocyte serum: duration of effect and role of corticosteroids. *Med Sci Res* 1987; 15: 407-8.
 38. Ader R, Cohen N. The influence of conditioning on immune responses. En: Ader R, Felten DL, Cohen N, (eds). *Psychoneuroimmunology*. San Diego: Academic Press; 1991. p. 611-43.
 39. Hsueh CM, Lorden JF, Hiramoto RN, Ghanta VK. Acquisition of enhanced natural killer cell activity under anesthesia. *Life Sci* 1992; 50: 2067-74.
 40. Buske-Kirschbaum A, Kirschbaum C, Stierle H, Lehnen H, Hellhammer D. Conditioned increase of natural killer cell activity (NKCA) in humans. *Psychosom Med* 1992; 54: 123-32.
 41. Russell M, Dark KA, Cummins RW, Ellman G, Callaway E, Peeke HVS. Learned histamine release. *Science*. 1984; 225: 733-4.
 42. MacQueen G, Marshall J, Perdue M, Siegel S, Bienenstock J. Pavlovian conditioning of rat mucosal mast cells to secrete rat mast cell mediator II. *Science*. 1989; 243: 83-5.
 43. Bovbjerg D, Cohen N, Ader R. Behaviorally conditioned enhancement of delayed-type hypersensitivity in the mouse. *Brain, Behavior, and Immunity*. 1987; 1: 64-71.
 44. Ghanta VK, Hiramoto NS, Soong S-J, Hiramoto RN. Conditioning of the secondary cytotoxic T-lymphocyte response to YC8 tumor. *Pharmacol, Biochem, and Behav*. 1995; 50: 399-403.
 45. Gorczynski RM, Macrae S, Kennedy M. Conditioned immune response associated with allogeneic skin grafts in mice. *J Immunol* 1982; 129: 704-8.
 46. Jenkins PE, Chadwick RA. Classically conditioned enhancement of antibody production. *Bull Psychonom Soc* 1983; 21: 485-7.
 47. Gorczynski RM, Kennedy M. Associative learning and regulation of immune responses. *Prog Neurobiopharmacol Biol Psychiatry* 1984; 8: 593-600.
 48. Ader R, Kelly K, Moynihan JA, Grotz LJ, Cohen N. Conditioned enhancement of antibody production using antigen as the unconditioned stimulus. *Brain Behav Immun* 1993; 7: 334-43.
 49. Álvarez-Borda B, Ramirez-Amaya V, Pérez-Montfort R, Bermúdez-Rattoni F. Enhancement of antibody production by a learning paradigm. *Neurobiol Learn Memory*. 1995; 64: 103-5.
 50. Hiramoto RN, Rogers CF, Demissie S, et al. Psychoneuroendocrine immunology: site of recognition, learning and memory in the immune system and the brain. *Int J Neuroscience*. 1997; 92: 259-85.
 51. Hiramoto RN, Ghanta VK, Solvason B, et al. Identification of specific pathways of communication between the CNS and NK cell system. *Life Sci* 1993; 53: 527-40.
 52. Maier SF, Watkins LR. Cytokines for psychologists: Implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psychol Rev* 1998; 105: 83-107.
 53. Demissie S, Rogers CF, Hiramoto NS, Ghanta VK, Hiramoto RN. Arecotine a muscarinic cholinergic agent conditions central pathways that modulate natural killer cell activity. *J Neuroimmunol* 1995; 59: 57-63.
 54. Longo DL, Duffey PL, Kopp WC, et al. Conditioned immune response to interferon-gamma in humans. *Clin Immunol* 1999; 90: 173-81.
 55. Exton MS, von Hörsten S, Schulz M, et al. Behaviorally conditioned immunosuppression using cyclosporine A: central nervous system reduces IL-2 production via splenic innervation. *J Neuroimmunol* 1998; 88: 182-91.

56. Besedovsky HO, del Rey AE, Sorkin E. Immune-neuroendocrine interactions. *J Immunol* 1985; 135: 750s.
57. Besedovsky HO, del Rey A. Mechanism of virus-induced stimulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *J Steroid Biochem* 1989; 34: 235-9.
58. Besedovsky HO, del Rey A, Sorkin E, Dinarello CA. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 1986; 233: 652-4.
59. Berkenbosch F, de Goetj DE, Rey AD, Besedovsky HO. Neuroendocrine, sympathetic and metabolic responses induced by interleukin-1. *Neuroendocrinol* 1989; 50: 570-6.
60. Derijk R, Van Rooijen N, Tilders FJ, Besedovsky HO, del Rey A, Berkenbosch F. Selective depletion of macrophages prevents pituitary-adrenal activation in response to subpyrogenic, but not to pyrogenic, doses of bacterial endotoxin in rats. *Endocrinol* 1991; 129: 330-8.
61. Eskay RL, Grino M, Chen HT. Interleukins, signal transduction, and the immune system-mediated stressor response. *Adv Exp Med Biol* 1990; 274: 331-43.
62. Tazi A, Dantzer R, Crestani F, Le Moal M. Interleukin-1 induces conditioned taste aversion in rats: A possible explanation for its pituitary-adrenal stimulating activity. *Brain Res* 1988; 473: 369-71.
63. Dyck DG, Janz LJ, Osachuk TAG, Falk J, Labinsky J, Greenberg AH. The pavlovian conditioning of IL-1 induced glucocorticoid secretion. *Brain Behav Immun* 1990; 4: 93-104.
64. Krymskaya LG, Yu N, Gromykhina A, Tinnikov AA, Kozlov VA. The interaction between interleukin-1 and glucocorticoids in the *in vivo* antibody response of mice to three concentrations of antigen. *Brain Behav Immun* 1994; 8: 337-40.
65. Bucala R. Neuroimmunomodulation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Ann New York Acad Sci* 1998; 840: 74-82.
66. Bauman H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunology Today* 1994; 15: 74-80.
67. Elmquist JK, Scammell TE, Saper CB. Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: The febrile response. *Trends in Neurosciences* 1997; 20: 565-70.
68. Bluthé RM, Pawlowski M, Suarez S, et al. Synergy between tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in the induction of sickness behavior in mice. *Psychoneuroendocrinology* 1994; 19: 197-207.
69. Swiergiel AH, Dunn AJ. The roles of IL-1, IL-6, and TNF-alpha in the feeding response to endotoxin and influenza virus infection in mice. *Brain Behav Immun* 1999; 13: 252-65.
70. Bluthé RM, Beaucloux C, Kelley KW, Dantzer R. Differential effects of IL-1ra on sickness behavior and weight loss induced by IL-1 in rats. *Brain Res* 1995; 677: 171-6.
71. Segreti J, Gheusi G, Dantzer R, Kelley KW, Johnson RW. Defect in interleukin-1beta secretion prevents sickness behavior in C3H/HeJ mice. *Physiol Behav* 1997; 61: 873-8.
72. Cunningham ET, Wada E, Carter DB, Tracey DE, Battey JF, De Souza EB. *In situ* localization of type 1 interleukin-1 receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary, and adrenal gland of the mouse. *J Neuroscience* 1992; 12: 1101-14.
73. Parnet P, Amindari S, Wu C, et al. Expression of type I and type II interleukin-1 receptors in mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 27: 63-70.
74. Watkins LR, Maier SF, Goehler L. Cytokine-to-brain communication: A review and analysis of alternative mechanisms. *Life Sci* 1995; 57: 101-26.
75. Banks WA, Kastin AJ. Relative contributions of peripheral and central sources to levels of IL-1 alpha in the cerebral cortex of mice: assessment with species-specific enzyme immunoassays. *J Neuroimmunol* 1997; 79: 22-8.
76. Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* 1995; 2: 241-8.
77. Kastin AJ, Pan W, Maness LM, Banks WA. Peptides crossing the blood-brain barrier: some unusual observations. *Brain Res* 1999; 848: 96-100.
78. Maness LM, Kastin AJ, Banks WA. Relative contributions of a CVO and the microvascular bed to delivery of blood-borne IL-1 alpha to the brain. *Am J Physiol* 1998; 275: E207-E212.
79. Kent S, Bret-Dibat LJ, Kelley KW, Dantzer R. Mechanisms of sickness-induced decreases in food-motivated behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 1996; 20: 171-5.
80. Watkins LR, Goehler L, Relton JK, et al. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: Evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neuroscience Letters* 1995; 183: 27-31.
81. Fleshner M, Goehler L, Herrmann J, Relton JK, Maier SF, Watkins LR. Interleukin-1 beta induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated. *Brain Res Bull* 1995; 37: 605-10.
82. Goehler L, Relton JK, Dripps D, et al. Vagal parasympathetic binds biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: A possible mechanism for immune-to-brain communication. *Brain Res Bull* 1997; 43: 357-64.
83. Goehler L, Gaykema RPA, Hammack SE, Maier SF, Watkins LR. Interleukin-1 induces c-Fos immunoreactivity in primary afferent neurons of the vagus nerve. *Brain Res* 1998; 804: 306-10.
84. Layé S, Parnet P, Goujon E, Dantzer R. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 27: 157-62.
85. Bluthé RM, Michaud B, Kelley KW, Dantzer R. Vagotomy attenuates behavioural effects of interleukin-1 injected peripherally but not centrally. *Neuroreport* 1996; 7: 1485-8.
86. Bluthé RM, Michaud B, Kelley KW, Dantzer R. Vagotomy blocks behavioural effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes. *Neuroreport* 1996; 7: 2823-7.
87. Gadiant RA, Otten U. Postnatal expression of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat sympathetic and sensory ganglia. *Brain Res* 1996; 724: 41-6.
88. März P, Gadiant RA, Otten U. Expression of interleukin-6 receptor (IL-6R) and gp 130 mRNA in PCN cells and sympathetic neurons: modulation by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). *Brain Res* 1996; 706: 71-9.
89. Kronfol Z, Remick DG. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatr* 2000; 157: 683-94.
90. Felten SY, Felten DL. Innervation of lymphoid tissue. En: Ader R, Felten DL, Cohen N, (eds). *Psychoneuroimmunology*. San Diego: Academic Press; 1991. 67-81.
91. Romano TA, Felten SY, Olschowka JA, Felten DL. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid organs in the beluga, *Delphinapterus leucas*: an anatomical link between the nervous and immune systems. *J Morphol* 1994; 221: 243-59.
92. Walsh LJ, Athanasas-Platiss S, Savage NW. Reconstitution of cutaneous neural-immunological networks following bone marrow transplantation. *Transplantation* 1996; 61: 413-7.
93. van der Velden VHJ, Hulsman AR. Autonomic innervation of human airways: Structure, function, and pathophysiology in asthma. *Neuroimmunomodulation* 1999; 6: 145-59.
94. Straub RH, Westerman J, Schölmerich J, Falk W. Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs. *Immunology Today* 1998; 19: 409-13.
95. Saito M, Akiyoshi M, Shimizu Y. Possible role of the sympathetic nervous system in response to interleukin-1. *Brain Res Bull* 1991; 27: 305-8.
96. Shimizu N, Hori T, Nakane H. An interleukin-1 beta-induced noradrenaline release in the spleen is mediated by brain corticotropin-releasing factor: An *in vivo* microdialysis study in conscious rats. *Brain Behav Immun* 1994; 7: 14-23.
97. Sanders VM, Baker RA, Ramer-Quinn DS, Kasprowiec DJ, Fuchs BA, Street NE. Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones. Implications of cytokine production and B cell help. *J Immunol* 1997; 158: 4200-10.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

98. Ramer-Quinn DS, Baker RA, Sanders VM. Activated T helper 1 and T helper 2 cells differentially express the b-2-adrenergic receptor. A mechanisms for selective modulation of T helper 1 cell cytokine production. *J Immunol* 1997; 159: 4857-67.
99. Kohn AP, Sanders VM. Suppression of antigen-specific Th2 cell-dependent IgM and IgG1 production following norepinephrine depletion in vivo. *J Immunol*. 1999; 162: 5299-308.
100. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405: 458-62.

Reimpresos:

Dr. Federico Bermúdez-Rattoni
Departamento de Neurociencias,
Instituto de Fisiología Celular, UNAM,
Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F.
A.P. 70-253-04510- México, D.F.

Recibido el 01 de febrero de 2000.
Aceptado el 29 de noviembre de 2000.

Parte 1.- Estudios de condicionamiento

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Lo primero que llama la atención al revisar los estudios en la literatura moderna sobre condicionamiento inmunoactivador es la existencia de un número importante de estudios que carecen de los controles experimentales mínimos para demostrar la presencia de un verdadero efecto condicionado (es decir un fenómeno de aprendizaje) sobre la inmunidad (Ader y Cohen 2001; Ader 2003). Por otra parte, los diversos estudios bien controlados utilizan procedimientos experimentales variados y miden parámetros diferentes de la respuesta inmune (ver revisión introductoria), lo que dificulta compararlos. Dado que en la mayoría de los casos se cuenta únicamente con informes aislados, no se sabe si estos distintos efectos constituyen cada uno un proceso de aprendizaje o son distintas expresiones de un mismo fenómeno general de condicionamiento. Por lo tanto, es muy útil contar con diferentes estudios que se centren en un solo parámetro de la respuesta inmune, como la respuesta de anticuerpos.

En un estudio sobre el aumento condicionado de la respuesta de anticuerpos a un antígeno proteico (Ader *et al.* 1993) se realizaron cinco experimentos independientes, cada uno con tres a cinco ensayos de condicionamiento consistentes en exponer a los animales a un estímulo gustativo seguido de la inyección de una dosis inmunogénica baja de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

hemocianina (KLH, ver figura 2 en revisión introductoria). Un aumento significativo en la respuesta a un segunda dosis subinmunogénica de antígeno se observó posteriormente, cuando los animales eran reexpuestos al sabor antes de la nueva inyección del antígeno. En otro estudio se observó un aumento condicionado en la respuesta primaria a otro antígeno (lisozima de huevo de gallina o HEL), realizando una sola sesión de apareamiento de estímulos en la que se expuso a los animales al sabor de sacarina antes de la inmunización. La respuesta condicionada se pudo detectar después de reexponer a los animales únicamente al estímulo condicionado (el sabor de la sacarina), sin necesidad de reinocular antígeno (Alvarez-Borda *et al.* 1995). El condicionamiento en un solo apareamiento fue replicado independientemente, con un efecto más modesto (Madden *et al.* 2001).

Dada esta inconsistencia en los resultados publicados hasta el momento (Ader 2003) y dado lo modesto de la mayoría de dichos efectos, es necesario determinar qué variables son críticas para la adquisición del aumento condicionado en la respuesta de anticuerpos. Es necesario también, para definir la pertinencia de estudios posteriores, determinar qué tan general es este efecto como fenómeno de aprendizaje. La pregunta concreta que aborda ambos temas es si el condicionamiento en un apareamiento, tal como es descrito por Alvarez-Borda *et al.* (1995) y Madden *et al.* (2001) puede observarse cuando se usa otro antígeno proteico como UCS. Ya que el condicionamiento en un apareamiento se ha replicado únicamente usando HEL, y dado que la KLH se ha usado exitosamente en un esquema con múltiples apareamientos, es

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

necesario investigar la posibilidad de condicionar la respuesta de anticuerpos anti-KLH con un solo apareamiento de estímulos, en diferentes condiciones importantes para la adquisición de las respuestas condicionadas: tipo y dosis del estímulo incondicionado, tiempo entre condicionamiento y prueba, neutralidad del estímulo condicionado, etc. Estas consideraciones también se pueden enunciar en las siguientes hipótesis:

- Si el aumento condicionado en un apareamiento de la respuesta de anticuerpos como se ha descrito para la lisozima, refleja un proceso general de aprendizaje, será posible observarlo con cualquier otra proteína suficientemente inmunogénica.
- Si el aumento condicionado de la respuesta de anticuerpos a la hemocianina (como lo observaron Ader *et al.*, 1993) es un fenómeno robusto y altamente adaptativo, será posible observarlo después de un solo apareamiento de estímulos, como ocurre con otros condicionamientos (Bures *et al.* 1998).

TESIS CON
FALLA DE CRIGEN

MÉTODOS

Procedimiento general de condicionamiento.-

Se realizaron cinco experimentos con variaciones específicas de un mismo paradigma de condicionamiento. El tratamiento de cada grupo experimental se muestra en la Tabla 1 y las condiciones que variaron en cada experimento se describen en la Tabla 2.

Grupo	Tratamiento previo	Sesión de condicionamiento	Sesión de prueba
CS	Ninguno	Sacarina- antígeno	Sacarina
CS ₀	Ninguno	Sacarina-antígeno	Agua
pCS	Sacarina ¹	Sacarina-antígeno	Sacarina
UCS	Ninguno	Antígeno	Antígeno
NC	Ninguno	Antígeno-(12 hrs.)-Sacarina	Sacarina
N-C	Ninguno	Agua-antígeno	Sacarina

Tabla 1.- Grupos experimentales y tratamiento en los experimentos de condicionamiento. ¹El tratamiento previo consistió en presentar una solución de sacarina en la sesión matutina de consumo de agua, durante cinco días antes del condicionamiento en el experimento 3 (Sacarina 0,15 %), o por tres días en el experimento 4 (sacarina 0.1%).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Experimento	[Sacarina] (%)	Antígeno- Dosis (μg)	Grupos	N	Intervalo condicionamiento- prueba	Refuerzo
1	0.1 %	KLH-50	CS, CS ₀ , UCS	6	94 días	Ninguno
2	0.1 %	KLH-50	CS, CS ₀ , NC, UCS	8	92 días	0.021 μg ¹
3	0.15 % ²	KLH-50	CS, CS ₀ , pCS ³ , N-C	10	45 días	Ninguno
4	0.1 %	KLH-500	CS, CS ₀ , pCS ³	10	45 días	Ninguno
5	0.1 %	HEL-500	CS, CS ₀	7, 9	37 días	Ninguno

Tabla 2.- Condiciones en los experimentos de condicionamiento. ¹La dosis del refuerzo de KLH se calculó dividiendo la cantidad utilizada por Ader *et al.* (1993) en ratones entre el peso promedio del ratón de 140 días y ajustando la dosis requerida para las ratas en el estudio. ² La dosis de sacarina de 0.15 % w/v se usó para aumentar la intensidad del estímulo sin incrementar la neofobia al punto que su consumo no fuera detectable. ³ Al grupo pCS se le presentó la sacarina en las sesiones de la mañana durante cinco días (experimento 3) o tres días (experimento 4). Para una descripción detallada del tratamiento recibido por cada grupo experimental ver la tabla 1.

Se utilizaron ratas Wistar macho (250-350g). Se dejaron adaptar en cajas individuales a un ciclo invertido de luz oscuridad (luces apagadas a las 7:00, encendidas a las 19:00) por al menos diez días y se asignaron al azar a algún grupo experimental (no había diferencias significativas en peso entre los grupos, ver Tabla 1). Se sometió a los animales a un régimen de consumo restringido de agua, dejándolos tomar agua en dos sesiones diarias de 15

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

minutos separadas 12 horas. Cuando el consumo de agua se hubo estabilizado se realizó la sesión de condicionamiento (día 0). Los grupos CS, CS₀ y pCS recibieron sacarina en el agua (Sigma, EUA, ver las concentraciones en la Tabla 2) durante la sesión de la mañana, después de lo cual se les inyectó intraperitonealmente una solución del antígeno, ya fuera hemocianina (KLH: Keyhole Limpet Hemocyanine, Pierce, EUA) o lisozima de huevo de gallina (HEL Sigma, EUA) disuelto en solución salina isotónica libre de pirógenos (Laboratorios Pisa, México), en dosis de acuerdo a la Tabla 2. El grupo UCS recibió el antígeno después de consumir agua sin sacarina. El grupo pCS recibió sacarina en las sesiones matutinas de consumo de agua durante varios días antes de la sesión de condicionamiento. La exposición previa de estos animales al sabor debería impedir la adquisición del efecto condicionado, pues la novedad del estímulo condicionado es crítica para la adquisición de los condicionamientos. La falta de efecto condicionado en este grupo proporcionaría una prueba adicional de que el efecto (en caso de encontrarse) se trata de un fenómeno de condicionamiento clásico. El grupo NC (no apareado o no contingente) recibió la sacarina y fue inyectado con KLH 12 horas después. El grupo N-C (experimento 3), un grupo no condicionado, recibió el antígeno durante la sesión de condicionamiento sin recibir sacarina (sólo agua). Seis horas después de la sesión de condicionamiento, se restauró el consumo *ad libitum* de agua.

Se midió el consumo basal de agua durante las sesiones de consumo restringido por lo menos durante cuatro días antes de la sesión de prueba, la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cual fue realizada un número de días después de la adquisición, de acuerdo al experimento (ver la Tabla 2). Se les dió a todos los grupos excepto el UCS sacarina en el agua durante 15 minutos. Se midió el consumo de agua o sacarina en cada sesión, para determinar la posible adquisición de una aversión o preferencia al sabor. Los animales del grupo UCS fueron inoculados con KLH después de consumir agua. El tratamiento de cada grupo se resume en la tabla 4.

Se utilizó una concentración de sacarina de 0.15 % w/v (en vez de 0.1%) en el experimento 3 para aumentar la intensidad del estímulo (Lamb y Jarbe 1997). Esta concentración no aumenta la neofobia o aversión natural a la sacarina (Domjan 1976) al grado de que no se pueda medir su consumo (Gilley y Franchina 1985).

MUESTRAS

Se obtuvieron muestras de sangre por punción del seno infraorbital bajo anestesia ligera con éter. Las muestras fueron tomadas antes de empezar cada experimento (niveles basales) y en diferentes momentos después de la sesión de condicionamiento (se muestran en las figuras correspondientes), incluyendo una muestra de referencia de niveles inmediatamente anteriores a la prueba. Se tomaron también muestras en intervalos regulares después de la sesión de prueba (evocación). (4, 8, 12, 16 y 20 días en el experimento uno; 5, 8, 12, y 16 días en los experimentos dos y cuatro; 4, 8 12 y 16 en los experiments tres y cinco).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Determinación de IgG anti KLH

Se sensibilizaron micropozos de poliestireno (Nunc, Dinamarca) con 0.005 mg/ml de KLH en amortiguador de carbonatos (pH 9.6) durante la noche a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con agua desionizada entre cada paso. Se incubaron las placas 2 hrs a 37°C en solución de bloqueo (5% de leche descremada en amortiguador salino de fosfatos). Después se añadieron 100 µl/pozo por duplicado de cada suero diluido en solución de bloqueo y se incubaron 2 hrs. a 37° C. Las diluciones analizadas fueron 1/800, 1/1600 y 1/3200 en los experimentos 1 y 2; diluciones sucesivas ½ de 1/20 a 1/10 240 en los experimentos 3, 4 y 5). Se agregaron anticuerpos de cabra anti IgG de rata (H y L chains, Pierce, EUA) diluido 1/5000 en solución de bloqueo y se incubó 2 hrs. a 37°C. La reacción fue revelada con ABTS (Sigma) 0.1% + peróxido de hidrógeno 0.03% en amortiguador de citratos (pH 4.2) durante 10 minutos a temperatura ambiente, leyendo la absorbancia a 405nm. Para eliminar la señal de fondo y para compensar la varianza interensayo se dividió cada resultado de absorbancia entre el valor de absorbancia dado por una alícuota de suero control analizada en la misma placa, como se ha descrito previamente (Fleshner *et al.* 1996). Se definió el título de anticuerpos como la dilución de una muestra que daba una señal igual a 2.5 veces el valor de fondo y se calculó por regresión simple de la porción lineal de la curva de titulación. Dado que la titulación abarca un intervalo mayor de diluciones, y da una sola medida que no requiere escoger entre los resultados de diferentes diluciones

(Butler 1994) los niveles de anticuerpos se presentan como absorbancia sólo cuando no se realizó titulación (experimentos 1 y 2).

Se utilizó el programa Stat View para la regresión lineal de las curvas de titulación y para los análisis de varianza y pruebas t de Student.

RESULTADOS

La figura 1 muestra la respuesta de IgG a KLH en el experimento 1 antes de la sesión de prueba, los cuales son representativos de la respuesta normal a KLH. La dosis utilizada de KLH (50 µg) es inmunogénica. La respuesta máxima se alcanzó alrededor de 55 días después del primer reto (sesión de condicionamiento) y los niveles de anticuerpos no regresan a niveles basales por lo menos en noventa días después de la inoculación.

TESIS CON
FALLA DE EXAMEN

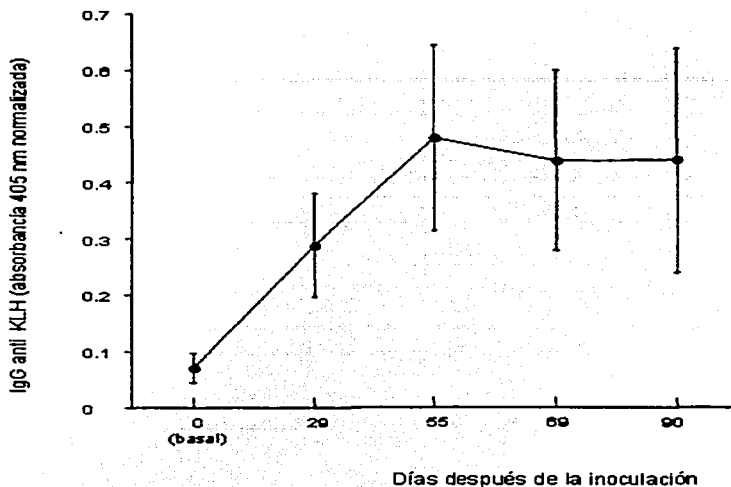


Figura 1.- Respuesta normal de IgG a 50 µg de KLH, según los niveles en el experimento 1 antes de la prueba. Media \pm error estándar de los animales de todos los grupos $N=18$.

La figura 2 muestra los niveles de anticuerpos en el experimento 1 antes y después de la sesión de prueba (evocación del condicionamiento). No hay ningún aumento en los niveles después de la prueba, la cual fue realizada 90 días después de la sesión de condicionamiento (adquisición). No hay diferencias entre el grupo condicionado y reexpuerto y el condicionado pero no reexpuerto a la sacarina en ningún momento. La reinyección de 50 µg de KLH al grupo UCS, sin embargo, escapaz de aumentar los niveles de anticuerpos más rápido y en mayor cantidad que el reto inicial (respuesta secundaria típica).

TESIS CON
FALLA DE OPINION

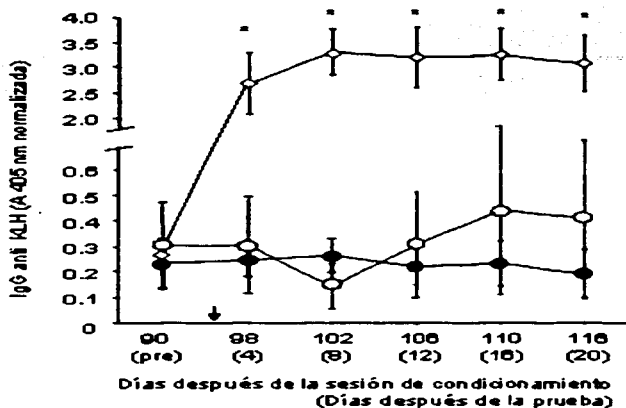


Figura 2.- Niveles de IgG anti KLH en el experimento 1 antes y después de la prueba. La flecha indica el momento de la prueba. ◇ grupo UCS (reinoconulado con el antígeno), ● grupo CS (condicionado y reexpuesto a la sacarina), ○ grupo CSo (condicionado, no reexpuesto a la sacarina), Media \pm 1 error estándar, $N=6$ en todos los grupos. * $p < 0,01$

Se obtuvieron resultados similares en los demás experimentos con KLH (Figura 3). En el experimento 2, la administración de un refuerzo de antígeno a los grupos CS, CSo y NC durante la sesión de prueba (evocación) no da lugar a diferencia alguna entre grupos, pero la administración de la dosis inicial de KLH (50 μ g) al grupo UCS aumentó los niveles de anticuerpos como en el experimento 1. En el experimento 3 no hubo diferencias entre los grupos CS,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CSo y N-C en ningún momento ni ningún efecto de la reexposición a la sacarina.

El grupo control pCS del experimento 3 fue excluido del análisis de los datos después de la sesión de prueba porque ya mostraba niveles de IgG significativamente más altos que los demás grupos antes de dicha sesión (Figura 4). Análisis de varianza de una vía de los títulos de anticuerpos en el día 43 (previo a la prueba) muestra diferencias entre grupos ($F_{2,35}=4.96$, $p<0.05$). La prueba post-hoc de Fisher mostró que los valores en el grupo pCS son significativamente más altos que en los animales condicionados no preexposados (CS y CSo juntos), y que en los animales no condicionados ($p<0.05$ en ambos casos). Esta diferencia se mantuvo hasta el día 54 (no se muestra). No hubo diferencia entre grupos en los niveles basales de anticuerpos. En el experimento 4 no hubo diferencias entre grupos en ningún punto del experimento ni se observó ningún efecto de la sesión de prueba (Figura 3).

En ningún caso se encontró ninguna disminución o aumento significativo en el consumo de sacarina o agua. La ausencia de aversión y preferencia se observa tanto en los valores totales (mililitros consumidos) como en los valores relativos al consumo basal (% de consumo basal; no se muestran los datos).

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACIÓN

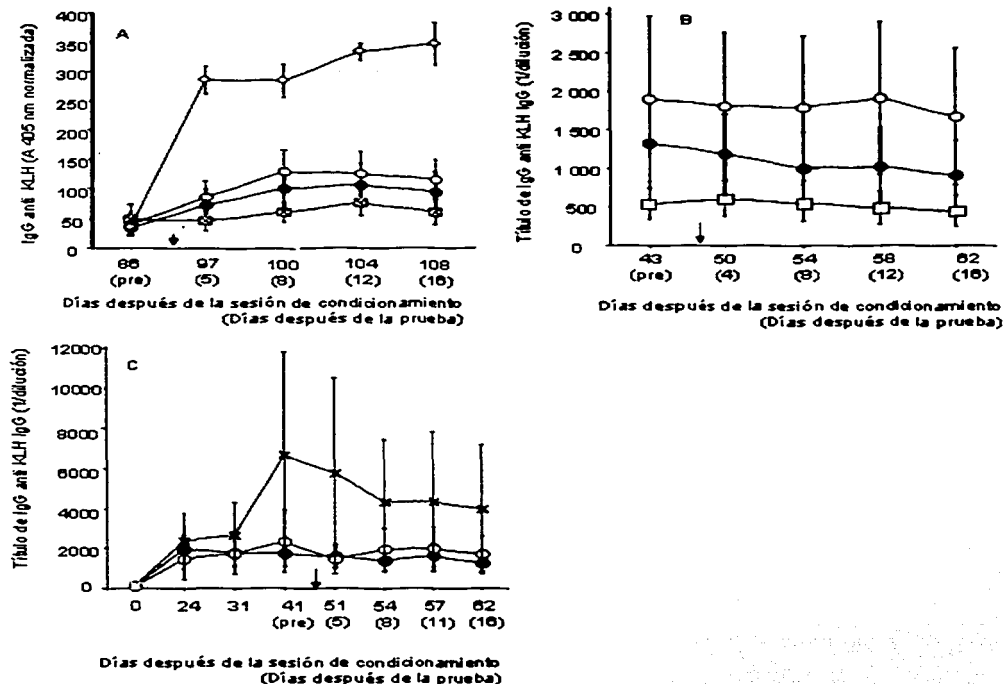


Figura 3. A: Experimento 2, ● CS (animales condicionados y reexpuestas al EC), ○ CSo (condicionadas, no reexpuestas al EC), ⊠ NC (presentación no apareada del EC y el EI), ◇ UCS (refuerzo de 50 mg de antígeno). N=8 en cada grupo. B: Experimento 3. ● CS (animales condicionados reexpuestas al EC), ○ CSo (condicionados no reexpuestos al CS), □ animales no condicionados. N=10 en cada grupo (Los resultados del grupo preexpuesto a la sacarina se muestra en la figura 4). C: Experimento 4. ● CS (animales condicionadas reexpuestas al EC), ○ CSo (condicionadas no reexpuestas al CS), × pCS (preexpuestos repetidamente a la sacarina). N=10 en cada grupo. Media±1 Error estándar

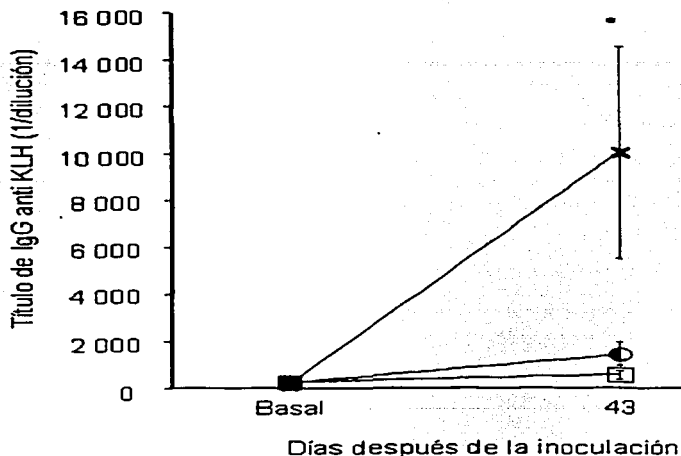


Figura 4.- Efecto de la preexposición diaria con sacarina por cinco días en la respuesta de IgG a 50 ug de KLH (durante la sesión de condicionamiento en el experimento 3). Las barras de error indican un error estándar de la media. Grupos: x pCS (preexpuestas), o animales sometidos a la sesión de condicionamiento (grupos CS y CS0 juntos), □ animales no condicionados. * $p < 0.05$

Se reprodujo el condicionamiento en un apareamiento con HEL en el experimento cinco (figura 5). Una prueba t no pareada de los títulos de anticuerpos muestra una diferencia significativa entre los grupos (CS y Cso) 8 días después de la sesión de prueba ($T_{14} = 2.27$, $p < 0.05$). Usando los valores de absorbancia (normalizados) como medida de los niveles de anticuerpos, se pudo observar diferencias entre grupos sólo en la dilución 1/320 (en una serie de diez diluciones sucesivas). Dichas diferencias se podían ver a los 8 días

($T_{14}=2.3$, $p<0.05$), y a los 11 días ($T_{14}=2.2$, $p<0.05$) después de la prueba (no se muestra). En los experimentos 3 a 5, los resultados usando títulos de anticuerpos eran consistentes con los resultados analizados como absorbancia normalizada.

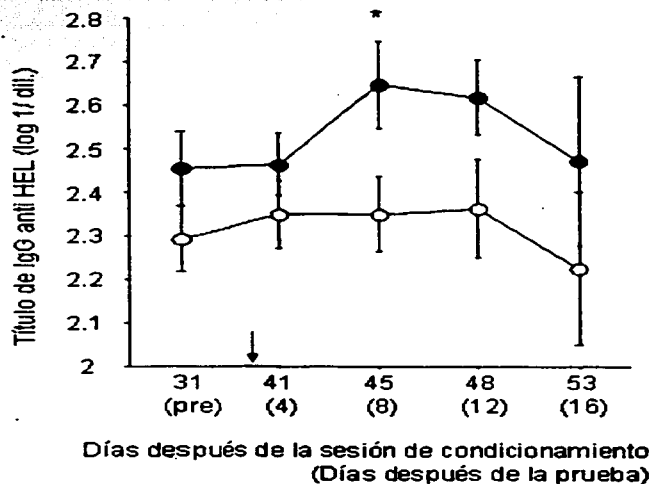


Figura 5.- Aumento condicionado en la respuesta a HEL siguiendo el procedimiento de un solo apareamiento. Grupos: ● CS (condicionado y reexpuesto a la sacarina $N=7$). ○ CS0 (condicionado, no reexpuesto a la sacarina, $N=9$). Media \pm 1 Error estándar * $p<0.05$

Como se puede ver en la figura 6, la respuesta normal de IgG a la lisoizima presentó sus máximos niveles alrededor de veinticinco días después

del reto. Los anticuerpos no regresaron a los niveles basales 45 días después del reto.

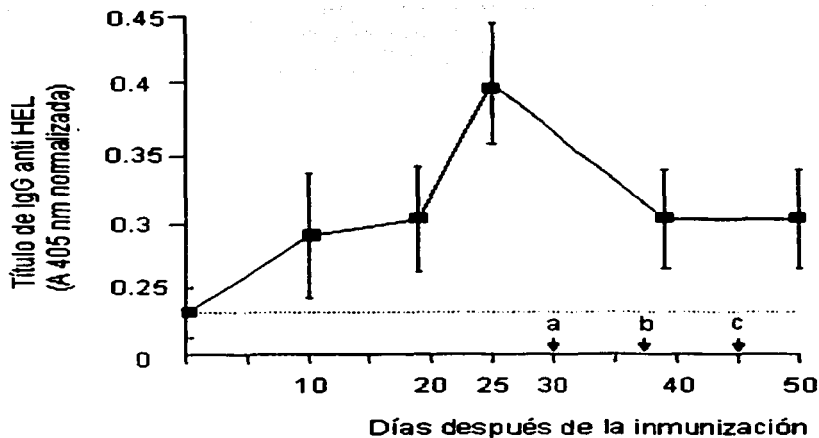


Figura 6.- Respuesta de IgG a 500 mg de HEL. Las flechas indican el momentos de la sesión de prueba en a: Álvarez-Borda *et al.* 1995, b: Espinosa *et al.* 2003 (presente trabajo), c: Madden *et al.* 2001. La línea punteada indica los valores promedio de los sueros preinmunes. Media \pm 1 Error estándar $N=16$

DISCUSIÓN

Los presentes resultados muestran que una dosis inmunogénica de KLH no puede inducir condicionamiento de la respuesta de anticuerpos, en diferentes circunstancias: Se esperó a que la respuesta inicial hubiera cedido, de tal

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

manera que ningún incremento posterior pudiera ser atribuido a la respuesta inicial (experimento 1). Este criterio ha sido mencionado en los estudios previos que usaban HEL (Álvarez-Borda *et al.* 1995; Madden *et al.* 2001). Se utilizó un refuerzo de antígeno durante la sesión de prueba (experimento 2) en una dosis que se pretendió fuera lo más parecida posible a la utilizada en ratones en el estudio de varios apareamientos de Ader *et al.* (1993). Dado que la evocación es una función del tiempo (Bures *et al.* 1998), se redujo el número de días entre la sesión de condicionamiento (apareamiento de estímulos) y la sesión de prueba (experimento 3) y se esperó entre ambas sesiones un número de días dentro del intervalo usado en los estudios precedentes (Álvarez-Borda 1995 y Madden *et al.* 1995, ver figura 5). Ya que quizás la dosis de antígeno no era capaz de generar la señal suficiente para la adquisición del condicionamiento, se probó también una dosis de KLH idéntica a la dosis de HEL usada en los trabajos de un apareamiento (experimento 4). Ninguna de estas variaciones dio como resultado un efecto condicionado. Adicionalmente, a partir del experimento 3, se incluyó la determinación del título de anticuerpos (ver métodos), para lograr un escrutinio más completo de los niveles de anticuerpos. En todos los casos, los resultados comparando absorbancias a una dilución fija eran consistentes con los resultados obtenidos comparando títulos de anticuerpos.

Estudios iniciales usando KLH en vez de HEL dentro del protocolo de Álvarez-Borda *et al.* (1995) presentan diferencias modestas entre grupos en niveles de anticuerpos. Sin embargo estos posibles efectos condicionados se podían observar sólo como cambio porcentual en los niveles de anticuerpos; es

decir, no había cambio neto alguno en dichos niveles (Espinosa *et al.* 1999; Espinosa *et al.* 2000).

Dados los presentes resultados y el hecho de que la KLH ha sido utilizada exitosamente en varios experimentos en los que se utilizan ensayos de múltiples apareamientos en ratones (Ader *et al.* 1993), se puede pensar que la adquisición de esta respuesta condicionada usando KLH requiere más de una sesión de apareamiento de estímulos. Esta posibilidad es importante porque normalmente se requieren varios apareamientos para lograr la adquisición de un efecto condicionado (Kehoe y Macrae 2002). La adquisición de un condicionamiento después de una sola exposición a los dos estímulos es inusual y se considera una indicación de una alta preparación evolutiva; es decir, la capacidad de una especie de asociar un estímulo condicionado particular con un tipo de estímulo incondicionado (Seligman 1970). Como ejemplo de un parendizaje para el que se considera que existe una alta preparación evolutiva se puede mencionar el condicionamiento de aversión al sabor un fenómeno además ampliamente distribuido en la naturaleza (Bures *et al.* 1998).

Algunos estudios históricos de están de acuerdo con la posible importancia de un mayor número de ensayos de condicionamiento (apareamientos de estímulos). En una revisión extensa de los trabajos de la primera mitad del siglo XX sobre condicionamiento inmune, (Ader 1981) se regraficaron dos estudios que cumplieran con los criterios actuales de tamaño de muestra (número de animales) y grupos control. En uno de ellos se encontró un

TESIS CON
FALLA DE FUNCION

aumento condicionado en los niveles de anticuerpos al virus de la influenza después de aparear 10 veces su inoculación con la presentación del estímulo condicionado (estímulo táctil). En otro se logran mantener los niveles de anticuerpos aglutinantes contra *Salmonella paratyphi* por reexposición al estímulo táctil utilizado en veinte apareamientos con la inyección del antígeno.

Si bien se requeriría evaluar estos dos modelos bajo los criterios actuales, estos estudios presentan otras posibilidad importante: el uso de otros estímulos condicionados (tacto, olfato) y otros esquemas. Puede ser útil utilizar retos y estímulos a los que la especie utilizada está naturalmente expuesto, pues se ha visto que cada especie presenta distintos grados de preparación evolutiva para asociar diferentes estímulos, de acuerdo al valor adaptativo de dicha asociación (Seligman 1970).

En este sentido, otra posible causa de la falta de condicionamiento en un sólo ensayo de apareamiento es una baja generalidad del fenómeno de aprendizaje. Al respecto, el número de apareamientos requerido para lograr un aprendizaje se considera un indicador de la cantidad de estímulo (*input*) requerido (Seligman 1970; Bures *et al.* 1998). Mientras menos estimulación se requiere se considera que se trata de un fenómeno más general de aprendizaje (ver como ejemplo James y Wagner 1980). De manera similar, la posibilidad de obtener una misma respuesta condicionada con estímulos incondicionados cualitativamente diferentes arguye en favor de un proceso aprendizaje ampliamente distribuido en la naturaleza (ver Rescorla y Cunningham 1979 como ejemplo). La adquisición del aumento condicionado de la respuesta de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

anticuerpos a la lisozima ha sido lograda con un solo apareamiento, pero este resultado no es generalizable a la hemocianina. Así, los presentes resultados sugieren que el aumento condicionado de la respuesta de anticuerpos a la KLH no es un aprendizaje tan robusto que pueda ser adquirido en un solo ensayo de apareamiento. El evaluar estímulos y antígenos a los que está normalmente expuesta la especie, así como dosis y vías naturales de entrada al organismo, permitirá concluir sobre el grado de generalidad de estos tipos de aprendizaje.

En contraste, al usar HEL como estímulo incondicionado en un condicionamiento con un solo apareamiento se reprodujo el efecto reportado originalmente por Álvarez-Borda *et al.* (1995) y Madden *et al.* (2001). Sin embargo, el efecto aquí observado fue modesto. Si se comparan los niveles de anticuerpos como usando el valor de absorbancia obtenido con una dilución fija de los sueros, se encontraron diferencias significativas entre el grupo experimental y el control en sólo una de 10 diluciones analizadas, resultado equivalente al publicado por Madden *et al.* (2001). También en concordancia con los resultados de Madden *et al.* y Álvarez Borda *et al.*, no se observó ninguna aversión al sabor de la sacarina en los animales condicionado, apesar del efecto condicionado en los niveles de anticuerpos. Esta disociación entre el condicionamiento inmune y el condicionamiento de aversión al sabor ha sido observada condicionando la acción inmunosupresora de la ciclosporina (Klosterhalfen y Klosterhalfen 1990).

Cabe aclarar también que comparando la respuesta de anticuerpos de este modo (en lugar de con los títulos), había una cierta tendencia a valores

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

más altos en el grupo CS antes de la prueba, por lo que el efecto debido a la reexposición a la sacarina puede ser considerado muy pequeño. En un estudio realizado por otro grupo no se observó el condicionamiento de la respuesta a HEL en un apareamiento (Boehm *et al.* 1998). Entonces, dado el pequeño número de trabajos utilizando HEL hasta ahora y dadas las discrepancias entre ellos, es claro que tampoco en el caso de la lisozima se conocen las condiciones para un condicionamiento robusto y consistente de la respuesta de anticuerpos.

Merece consideración el hecho de que el condicionamiento en un solo ensayo se haya logrado más fácilmente utilizando lisozima que usando hemocianina. Si bien ambos son antígenos proteicos, los presentes experimentos mostraron diferencias en el tiempo requerido para alcanzar el máximo nivel de anticuerpos después de la inoculación de ambos antígenos (25 días para la lisozima y 55 para la hemocianina, ver Resultados), lo cual sugiere diferencias en la cinética de los eventos desencadenados por cada uno. Diferencias de este tipo podrían influir en su función como estímulos incondicionados; es decir, en su capacidad de generar una señal aferente asociable con el estímulo gustativo. Este es otro aspecto de las discrepancias aquí presentadas que requiere ser aclarado, especialmente porque ha habido intentos aún menos exitosos de condicionar conductualmente la respuesta a otros antígenos, como la ovoalbúmina.

Otro aspecto que requiere ser discutido es el relativo a la neutralidad del estímulo condicionado; es decir, su incapacidad de generar la respuesta en

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cuestión más que después de que el aprendizaje asociativo se ha llevado a cabo. El uso de controles adecuados permitió demostrar la neutralidad de la sacarina en los estudios anteriores (Alvarez-Borda *et al.* 1995; Madden *et al.* 2001), los cuales usaban sacarina al 0.1%. En los estudios aquí presentados, ninguno de los experimentos con KLH mostró diferencias entre los grupos CS y CS₀, los cuales diferían únicamente en la presentación final de sacarina (esto, adicionalmente, basta para probar la ausencia del efecto condicionado). Sin embargo en el experimento 3, un grupo control (pCS), expuesto a la sacarina (0.15%) durante cinco días previos a la sesión de condicionamiento, alcanzó niveles de anticuerpos significativamente más altos que los otros grupos antes de la sesión de prueba. Esta diferencia sólo puede ser atribuida al tratamiento previo con sacarina, lo que implicaría que esta dosis mayor de sacarina, proporcionada en forma repetida, no es neutral como estímulo condicionado; es decir, que puede tener efectos relevantes por sí sola en la respuesta medida (en nuestro caso, la respuesta de anticuerpos). No se puede afirmar más, dada la falta de información al respecto. El único estudio previo encontrado sobre los efectos de la sacarina en la respuesta de anticuerpos muestra un descenso en el número de células productoras de anticuerpos en el bazo después del reto con eritrocitos de carnero en animales que habían recibido concentraciones altas de sacarina en la comida por un periodo largo de tiempo (Luini *et al.* 1981). Dado que las dosis de sacarina es muy diferente a la usadas en los estudios de condicionamiento, lo mismo que el parámetro de respuesta de anticuerpos medido (cuenta de células formadoras de anticuerpos en placa de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Jerne, a diferencia de la determinación de los niveles de anticuerpos en sangre), este estudio no permite concluir sobre la neutralidad de la sacarina en los niveles de anticuerpos en sangre en los estudios de condicionamiento.

En suma, se consiguieron evidencias de que la adquisición en un sólo ensayo del aumento condicionado de la respuesta de anticuerpos no es un fenómeno general a todos los antígenos proteicos. La búsqueda de un paradigma más general de condicionamiento de la respuesta de anticuerpos debe por lo tanto incluir el uso de varios ensayos de apareamiento de estímulos (condicionamiento). La investigación futura deberá tener cuidado de no generalizar resultados previos en los nuevos diseños experimentales.

TESIS CON
FALLA DE CARGEN

2.- Estudio de simpatectomía

ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Noradrenalina e inmunidad: Resultados contradictorios

Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* en humanos y animales han mostrado una capacidad de la noradrenalina de regular diferentes aspectos de la respuesta inmune (Straub *et al.* 1998; Sanders y Straub 2002, ver Espinosa y Bermúdez 2001), artículo introductorio) Sin embargo, los efectos encontrados hasta ahora son muy variados y a veces incluso contradictorios. Por ejemplo, si bien se ha propuesto que el posible papel de la noradrenalina es regular el balance Th1/Th2 (Sanders 1998), algunos resultados sugieren efectos positivos de este neurotransmisor en la diferenciación de las células T a células Th1, mientras que otros muestran una inhibición beta adrenérgica de las funciones efectoras las células Th1 (revisado por Sanders y Straub 2002). Además, los resultados en animales no han podido ser extendidos al ser humano. Contrastes como éstos hacen necesario enfocarse a un sólo modelo de estudio de la regulación simpática de la inmunidad para poder comparar los resultados de diferentes estudios y definir las posibles consecuencias de estos efectos en la salud. El presente trabajo se centra en la respuesta de anticuerpos *in vivo*, utilizando la eliminación excitotóxica de las fibras adrenérgicas periféricas como estrategia de estudio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El sistema nervioso simpático y la respuesta de anticuerpos

La simpatectomía inyectando 6-hidroxidopamina (6-OHDA) sistémicamente permite estudiar la respuesta inmune *in vivo* en ausencia de terminales noradrenérgicas. La 6-OHDA es una neurotoxina selectiva para fibras periféricas de noradrenalina, el neurotransmisor principal y característico del sistema nervioso simpático (Netter *et al.* 1996). Después de la inyección de 6-OHDA, las terminales axónicas del sistema nervioso simpático son destruidas, debido a la captura mediante un acarreador de alta afinidad y a la subsecuente generación de radicales libres. Esto conlleva una eliminación de los niveles de noradrenalina (Kostrzewa y Jacobowitz 1974). Por supuesto, hay también un abatimiento de los neurotransmisores coexpresados en el simpático, así como de sus moléculas precursoras. Los niveles de noradrenalina y ocasionalmente los niveles de dopamina, son utilizados como indicadores de la efectividad de la simpatectomía con 6-OHDA (Hermann *et al.* 1994). Se puede lograr una axotomía periférica generalizada en animales adultos sin afectar los niveles centrales de catecolaminas, ya que el fármaco atraviesa la barrera hematoencefálica (Kostrzewa y Jacobowitz 1974). Este modelo presenta algunas ventajas frente a la eliminación quirúrgica de terminales (Exton *et al.* 1998; Rogausch *et al.* 2003), como la posibilidad de eliminar la inervación de todos el tejido linfoide secundarios (no sólo bazo sino ganglios linfáticos, ampliamente distribuidos en el organismo).

En animales con un sistema inmune íntegro, se han descrito tanto efectos supresores como estimuladores de la axotomía en la respuesta de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

anticuerpos *in vivo* (Kasahara *et al.* 1977a; Kasahara *et al.* 1977b; Hall *et al.* 1982; Madden *et al.* 1994; Yasuda *et al.* 1995; Kruszewska *et al.* 1995; González y Husband 1998; González y Husband 1999; Callahan y Moynihan 2002). A pesar de estas aparentes inconsistencias, es posible definir regularidades en la respuesta de anticuerpos en animales simpatectomizados, gracias a varios datos sobre el mecanismo de acción de la 6-OHDA. Se ha encontrado en los ratones que un aumento transitorio (24-48 horas) de los niveles de corticosterona es la causa de diversos efectos inmunosupresores de la 6-OHDA (Leo y Bonneau 2000). Así, algunos casos de disminución en respuesta de anticuerpos por denervación con 6-OHDA han sido atribuidos a la acción de glucocorticoides (Hall *et al.* 1982). Esto podría explicar que los efectos supresores tanto en respuesta primaria como secundaria de anticuerpos se pueden ver sólo cuando se inyecta 6-OHDA justo antes del reto (Kasahara *et al.* 1977b; González y Husband 1999).

El tiempo transcurrido entre denervación y reto es importante también porque hay una recuperación gradual de las terminales noradrenérgicas después de la axotomía (Lorton *et al.* 1990). Además, el efecto observado parece depender del órgano estudiado. Así, la producción de interferón γ (IFN- γ) por células de ganglios linfáticos estimuladas con el mitógeno concanavalina A (ConA) está aumentada tres días pero no siete después de la simpatectomía con 6-OHDA (Madden *et al.* 1994), mientras que en bazo se encuentra disminuida (Madden *et al.* 1994). Estas diferencias hacen necesario determinar los efectos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

in vivo, que dependen de la participación de distintos órganos y compartimentos.

Tomando en cuenta sólo los efectos atribuibles a la eliminación de las terminales noradrenérgicas periféricas, la falta de inervación simpática en la periferia parece aumentar la respuesta primaria de anticuerpos a eritrocitos de carnero (Kasahara *et al.* 1977a; Kasahara *et al.* 1977b), ovalbúmina (Yasuda *et al.* 1995) y hemocianina (Kruszewska *et al.* 1995). Se ha encontrado un aumento en la respuesta primaria de anticuerpos a la hemocianina en suero, el cual se da en distintas subclases de inmunoglobulinas, dependiendo de la cepa de ratón utilizada: IgM, IgG, IgG1 e IgG2a en ratones C57B1/6J y sólo IgG1 en ratones BALB/cJ (Kruszewska *et al.* 1995). Otros aspectos de la respuesta a KLH, evaluados *in vitro*, se encuentran elevados en animales simpatectomizados. Tal es el caso de la respuesta al KLH de las células T, provenientes de animales inmunes, así como la presentación de KLH a células T por macrófagos (Callahan y Moynihan 2002).

El efecto de la denervación en la respuesta secundaria de anticuerpos se conoce menos. Kasahara *et al.* (1977b) estudiaron la respuesta secundaria a eritrocitos de carnero (antígeno T dependiente) denervando antes del reto primario; es posible que haya habido una regeneración axónica significativa antes del reto secundario, por lo que no se puede atribuir sus resultados sólo a la denervación. Por esta razón, son necesarios estudios en los que el reto secundario se haga en condiciones que garanticen la denervación (antes de que haya regeneración de las terminales) y que excluyan la posibilidad de una

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

acción de los glucocorticoides (después del pico inicial de los niveles de corticosterona). También es necesario que la respuesta primaria se haya dado cuando el SNS estaba íntegro. En tales condiciones se esperaba, de acuerdo a lo observado hasta ahora, que la respuesta secundaria de anticuerpos no se vea afectada. Se puede plantear la siguiente hipótesis:

- La falta de terminales noradrenérgicas periféricas no altera la respuesta secundaria a un antígeno cuando la respuesta primaria se ha dado con el sistema simpático íntegro.

Ya que la respuesta secundaria sigue mecanismos diferentes a la primaria, es necesario definir si la respuesta secundaria está sujeta al mismo tipo de regulación noradrenérgica. Es necesario para ello usar modelos comparables con los de estudios previos. Por esta razón, en el presente estudio se determina el efecto de la simpatectomía con 6-OHDA en la respuesta secundaria de anticuerpos a la hemocianina, utilizando tiempos entre denervación y reto secundario que descartan un aumento en los niveles de corticosterona o una regeneración axónica antes del reto secundario.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MÉTODOS

Prueba piloto de simpatectomía con 6-OHDA

Seis ratas wistar adultas macho de entre 200 y 300 g de peso fueron inyectados intraperitonealmente con 100mg/Kg de peso de 6-hidroxidopamina, disuelta en un vehiculo consistente de NaCl 0.9 mg/100ml con ácido ascórbico al 0.01 mg/100ml como estabilizador; la solución fue esterilizada por filtración. Otras cinco ratas fueron inyectadas con este vehiculo únicamente. Cinco días después los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se removieron los bazo inmediatamente y se obtuvo una rebanada de aproximadamente 100 mg de la región hilar de cada uno. Se procesaron inmediatamente las rebanadas para la determinación de catecolaminas (ver abajo).

Simpatectomía química y reto con KLH

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Once ratas wistar adultas macho de entre 200 y 300 g de peso fueron inmunizadas con 50 µg de KLH disuelto en 0.5 ml de solución salina isotónica (día cero). La solución fue esterilizada pasándola por un filtro de acetato de celulosa poro de 0.2 µm. El día 89 fueron divididas en dos grupos con el mismo nivel de anticuerpos anti KLH. El día 90 del antígeno, seis de los animales fueron inyectados intraperitonealmente con 100mg/Kg de peso de 6-hidroxidopamina, disuelta en un vehiculo consistente de NaCl 0.9 mg/100ml con ácido ascórbico al 0.01 mg/100ml como estabilizador; la solución fue

esterilizada por filtración. Las otras cinco fueron inyectadas con este vehículo únicamente. El día 94 los animales fueron reinoculados con 50 ug de KLH. Se obtuvieron muestras de suero los días -5 (niveles basales), 29, 55, 89 (para demostrar seroconversión y generar grupos con los mismos niveles de anticuerpos) y los días 98, 102, 110 y 116 (para medir la respuesta secundaria al KLH). Las muestras de suero fueron obtenidas igual que en los estudios de condicionamiento. El día 117 los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de bazo para la determinación de noradrenalina.

Determinación de noradrenalina.-

Se obtuvieron rebanadas de aproximadamente 100mg de la región hilar del bazo y se prepararon según Kruszewska et al (1998). Brevemente: las rebanadas se homogeneizaron en 1 ml de HClO_4 0.1 M con dihidroxibencinamida 0.73 μM (DHBA) como estándar interno. Se centrifugó el homogenado a 11 000 g 10 minutos. Se tomaron 200 μl de sobrenadante y se les agregó 1 ml de fosfato de sodio (pH=7). Las catecolaminas se absorbieron en 50 mg de alúmina activada. y se añadió 1 ml de amortiguador Tris/EDTA 1.5 M. Se agitó inmediatamente por 5 minutos, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Se hicieron dos lavados de la alúmina con agua desionizada. Se extrajeron las catecolaminas añadiendo a la alúmina 200 μl de HClO_4 0.1N Se filtró el extracto y se analizó por HPLC.

Determinación de IgG2a e IgG1 anti-KLH

Además de determinarse la respuesta de IgG (totales) anti KLH se determinó la respuesta de los subtipos IgG2a e IgG1. Para la determinación de ambos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

subtipos se utilizó una solución de bloqueo compuesta de solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS, pH 7.4) con albúmina sérica bovina (Sigma) al 0.25% y Tween-20 (Sigma) al 0.05%.

Para el subtipo IgG2a, después del paso de bloqueo, se incubaron diluciones 1/800 y 1/1600 de las muestras. Se añadió en seguida un anticuerpo monoclonal de ratón anti IgG2a de rata biotinilado (Zymed) diluido 1/1000 seguido de un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Zymed) diluido 1/8000. Todas las incubaciones fueron a 37°C por 2 hrs y fueron seguidas de tres pasos de lavado con agua desionizada.

Para el subtipo IgG1 se incubaron diluciones 1/50 y 1/100

Los niveles de anticuerpos se midieron como absorbancia normalizada obtenida con una dilución fija de los sueros y el título, obtenido igual que en la sección 1 (Estudios de Condicionamiento). Los valores promedio de los grupos denervado y vehiculo se compararon con la prueba t de Student.

RESULTADOS

Efectividad de la simpatectomía

La figura 7 muestra los niveles de noradrenalina en bazo en los animales del estudio piloto. Cinco días después del tratamiento con 6-OHDA se observa una reducción en los niveles de noradrenalina en bazo hasta niveles menores al límite de detección (0.2 ng/mg tejido). Si se considera esta concentración como el valor de los animales tratados con 6-OHDA (que en realidad tenían niveles

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

más bajos, no detectables), la diferencia entre grupos es significativa ($T_9=6.5$, $p<0.01$). La figura 8 muestra los niveles de noradrenalina en bazo en los animales utilizados en la determinación de respuesta secundaria de anticuerpos, al final del experimento. Si bien los niveles en el grupo simpatectomizado ya son detectables 25 días después del tratamiento con 6-OHDA, se observa todavía una diferencia significativa entre grupos ($T_9=3$, $p<0.05$). La reducción mínima de los niveles de NA fue de 70.5 % con respecto al grupo control, en este día.

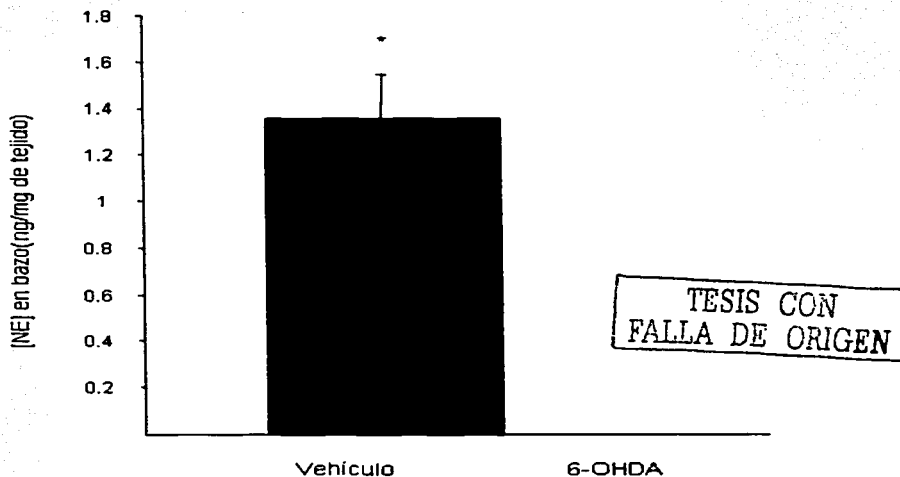


Figura 7.-. Niveles de noradrenalina (NE) en bazo cinco días después del tratamiento (prueba piloto) con vehículo ($N=5$) o con 100 mg/Kg de 6-OHDA ($N=6$). Promedio \pm 1 error estándar. * $p<0.01$ No se detectó

NE en los animales tratados con 6-OHDA. El límite de detección es 0.2 ng/mg tejido.

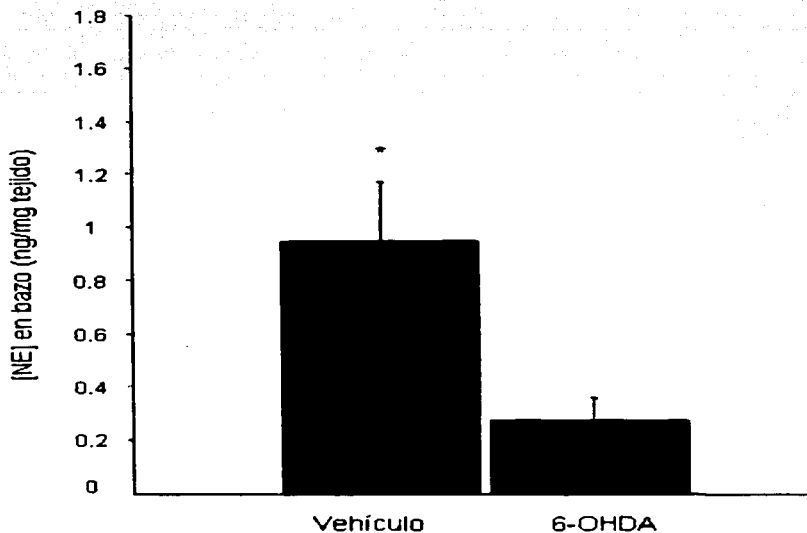


Figura 8 Niveles de noradrenalina (NE) en bazo 25 días después de la inyección intraperitoneal de vehículo ($N=5$) ó 6-OHDA ($N=6$). Promedio \pm 1 error estándar. * $p < 0.05$

Efecto en la respuesta de anticuerpos a la hemocianina

La respuesta de IgG a la primera inoculación con KLH alcanza su máximo nivel a los 55 días. Después de este día los niveles de anticuerpos no disminuyeron significativamente hasta el día 90 (Figura 9). La respuesta de IgG a la segunda inoculación ocurrió después de la simpatectomía. Como se puede

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

observar en la figura 9, ambos grupos mostraron una respuesta a KLH más rápida y más fuerte que la respuesta inicial. El análisis de varianza de medidas repetidas de los valores de absorbancia en los días 90 en adelante (niveles previos y posteriores a la reinoculación), muestra un efecto del tiempo después de la reinoculación del antígeno, sin ningún efecto de grupo ($F_5=33.5$, $p<0.01$). No se observó diferencia significativa entre los grupos en ningún día.

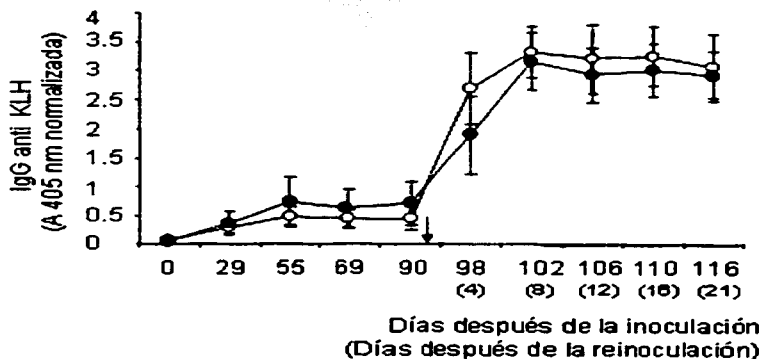


Figura 9.- Niveles de IgG totales anti KLH en los animales a todo lo largo del estudio de simpatectomía (media \pm 1 error estándar). La flecha indica el día del tratamiento con 6-OHDA (●, $N=6$) o vehículo (○, $N=5$).

No se encontraron tampoco diferencias entre grupos analizando anticuerpos IgG1 anti KLH (figura 10), ni detectando anticuerpos IgG2a (figura 11).

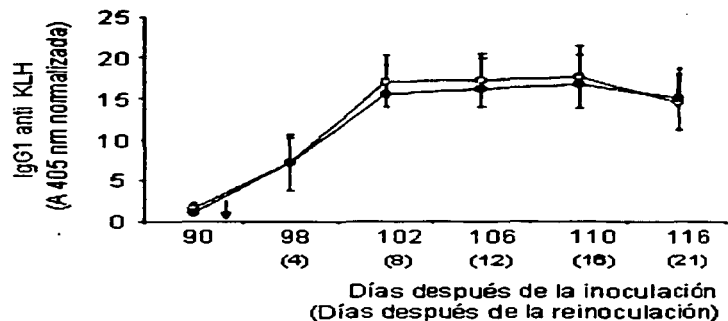


Figura 10.- Respuesta de IgG1 a una segunda inoculación de KLH en animales simpatectomizados: (media \pm 1 error estándar). La flecha indica el día del tratamiento con 6-OHDA (●, N=6) o vehículo (○, N=5).

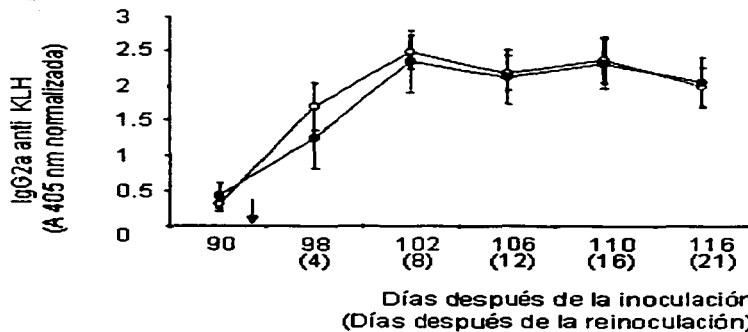


Figura 11.- Respuesta de IgG2a a una segunda inoculación de KLH en animales simpatectomizados (media \pm 1 error estándar). La flecha indica el día del tratamiento con 6-OHDA (●, N=6) o vehículo (○, N=5).

TESIS CON
FALLA EN SU EN

DISCUSIÓN

En el presente estudio se logró una eliminación confiable de la aportación noradrenérgica a los órganos linfoides. El criterio de simpatectomía eficiente, definido como una reducción mayor al 70% en los niveles de NE en órganos periféricos, se cumplió 5 días después del tratamiento con 6-hidroxidopamina en el estudio piloto, por lo que se puede asumir que los animales del experimento estaban simpatectomizados en el momento de ser reinoculados con KLH. Adicionalmente, la falta de una recuperación significativa de los niveles de NA al final del experimento descarta una regeneración significativa de las terminales noradrenérgicas (Lorton *et al.* 1990) durante todo el tiempo en el que se midió la respuesta secundaria de anticuerpos. Se ha demostrado que esta reducción importante de la aportación de noradrenalina ocurre en todos los órganos periféricos (Kostrzewa y Jacobowitz 1974), por lo que se puede asumir que incluía a todo el tejido linfoide secundario.

Si bien efectiva, la simpatectomía no tuvo ningún efecto en la respuesta secundaria de IgG al KLH. En ratones con inmunodeficiencia severa combinada reconstituidos monoclonalmente con células T y B, la denervación con 6-OHDA disminuye significativamente (sin abolir) la producción de IgG1 contra KLH (Kohm y Sanders 1999), sin embargo, en el presente estudio, la respuesta secundaria en animales con un sistema inmune íntegro la respuesta de IgG1 e IgG2a en ausencia de aporte noradrenérgico no es diferente de la respuesta en animales con niveles normales de NA. Cualquiera que sea el papel de la noradrenalina en la producción de anticuerpos, no parece relevante en la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

respuesta secundaria de anticuerpos *in vivo* a KLH. Este dato es importante porque la mayoría de los estudios *in vivo* se ha enfocado a la respuesta primaria de anticuerpos, la cual se ve aumentada (Yasuda *et al.* 1995; Kruszewska *et al.* 1995) o no afectada (Kasahara *et al.* 1977a; Kasahara *et al.* 1977b) en animales denervados. Se ha visto también que la respuesta *in vitro* específica a KLH está aumentada en animales denervados inmunizados *in vivo* con esta proteína (Callahan y Moynihan 2002). Así, la respuesta secundaria *in vivo* parece ser menos influenciable por la presencia de las inervaciones simpáticas. Los resultados aquí presentados coinciden con esta tendencia, pues no muestran ningún efecto de la denervación simpática en la respuesta de anticuerpos a la KLH cuando ya se ha establecido una respuesta inicial.

El modelo aquí utilizado es informativo porque, para conocer el verdadero significado biológico de la regulación noradrenérgica de la inmunidad, es necesario medir funciones efectoras de la inmunidad y en última instancia determinar la protección o sobrevida frente a infecciones. El modelo aquí utilizado se acerca más a situaciones reales, al probar el efecto de la simpatectomía *in vivo* en animales íntegros con un sistema inmune íntegro, a diferencia de modelos como el de (Kohm y Sanders 1999), que utiliza ratones con inmunosupresión severa combinada (ratones SCID). En conclusión, los presentes resultados sugieren que la respuesta secundaria de anticuerpos *in vivo* está menos sujeta a regulación por las inervaciones simpáticas que la respuesta primaria. Esta posibilidad deberá ser determinada estudiando el efecto de la simpatectomía en la respuesta primaria a KLH *in vivo*.

TESIS CON
FALLA DE GEN

CONSIDERACIONES FINALES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El presente trabajo se centró en dos de los numerosos modelos existentes de comunicación neuroinmune: el condicionamiento pavloviano y la influencia del sistema nervioso simpático en la respuesta inmune. En ambos casos, si bien existen evidencias convincentes de una regulación del sistema inmune con repercusiones funcionales, se encuentra una situación parecida a la de las demás áreas de la psiconeuroinmunología (ver cuadro 1 y cuadro 2 en revisión introductoria): coexisten fenómenos bien establecidos con resultados aislados y la dificultad de integrar los datos acumulados hasta la fecha en un marco teórico general sobre la relación conducta-inmunidad o sistema nervioso-sistema inmune. Tal marco requeriría un conocimiento de los verdaderos alcances de los fenómenos reportados hasta ahora.

En los presentes estudios sobre condicionamiento y simpatectomía se utilizó una proteína fuertemente inmunogénica de ampliamente usada en estudios sobre la respuesta de anticuerpos y sobre neuroinmunomodulación, tanto en animales como en humanos (Korver *et al.* 1984; Moraska y Fleshner 2001). Los resultados sugieren entonces que la regulación de la respuesta inmune por condicionamiento y por activación simpática puede tener algunas restricciones. Esto es especialmente importante porque es necesario conocer en qué circunstancias son relevantes estas formas de neuroinmunomodulación.

La pertinencia de estudiar a profundidad los fenómenos hasta ahora reportados dependerá de su importancia adaptativa o su aplicabilidad clínica,

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

por lo que se requiere primero determinar qué fenómenos son consistentes (reproducibles) y de una magnitud tal que puedan incidir en la supervivencia o la reproducción de los individuos. Al respecto, una pregunta importante es de qué magnitud tiene que ser un incremento condicionado en la respuesta de anticuerpos para tener algún valor adaptativo. Si se toman en cuenta estudios sobre seroconversión, se puede observar que los aumentos en niveles de anticuerpos (por infección o vacunación) requeridos para proteger contra infecciones (por ejemplo, Golde *et al.* 1997; Lee *et al.* 2000) son mucho mayores a los observados hasta ahora en estudios de condicionamiento. Se necesita, por lo tanto, determinar las condiciones biológicas en las que la regulación neuroinmune puede incidir en la salud y/o la supervivencia. Esta información debería en última instancia contestar la pregunta de si estos fenómenos ocurren en la naturaleza.

Además de la magnitud de la respuesta, un aspecto que permite concluir sobre la importancia adaptativa de un fenómeno de comunicación neuroinmune es el tipo de reto inmune usado. Las pruebas funcionales y el reto experimental con agentes infecciosos pueden ser útiles al respecto. Por ejemplo la eliminación de la inervación simpática reduce los efectos benéficos del estrés en la sobrevivencia a la infección con virus influenza (Hermann *et al.* 1993; Hermann *et al.* 1994) y la eliminación de la inervación simpática reduce las alteraciones en la inmunidad debidas a la falta de alimento (González y Husband 1999). Estudios como éste proporcionarían información sobre la relevancia de cada uno de los modelos de comunicación neuroinmune.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En suma, los presentes estudios sugieren límites a los alcances de dos modelos de comunicación neuroinmune y aportan información a la discusión sobre su importancia biológica. Los resultados de estudios como estos serán útiles en escoger modelos útiles para el estudio de la relación conducta-sistema nervioso-inmunidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Referencias

- Ader, R. 1981. A Historical Account of Conditioned Immunobiologic Responses. En: *Psychoneuroimmunology* (R. Ader, editor), pp. 321-352. New York, Academic Press.
- Ader, R. 2003. Conditioned immunomodulation: Research needs and directions. *Brain Behav Immun* 17, 51-57.
- Ader, R. y Cohen, N. 2001. Conditioning and immunity. En: *Psychoneuroimmunology* (R. Ader, D.L. Felten y N. Cohen, editores), pp. 3-34. San Diego, Academic Press.
- Ader, R., Kelly, K., Moynihan, J.A., Grotta, L.J. y Cohen, N. 1993. Conditioned enhancement of antibody production using antigen as the unconditioned stimulus. *Brain Behav Immun* 7, 334-343.
- Álvarez-Borda, B., Ramírez-Amaya, V., Pérez-Montfort, R. y Bermúdez-Rattoni, F. 1995. Enhancement of antibody production by a learning paradigm. *Neurobiol Learning Memory* 64, 103-105.
- Boehm, G.W., Karp, J.D., Grotta, L.J., Moynihan, J.A., Cohen, N. y Ader, R. 1998. Failure to replicate conditioned enhancement of antibody production following single-trial learning paradigms using antigen as the unconditioned stimulus. *Neuroimmunomodulation* 5[1-2], 67. (abstract).
- Bures, J., 1998. Ethology, physiological psychology, and neurobiology of conditioned taste aversion. En: *Conditioned Taste Aversion: Memory of a Special Kind*, (Bures, J.; Bermúdez-Rattoni, F.; Yamamoto, T) pp. 1-13. Oxford, Oxford Science Publications.
- Butler, J.E. 1994. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. En: *Immunochemistry* (C.J. van Oss y M.H.V. van Regenmortel, editores), pp. 759-803. New York, Marcel Dekker, Inc.
- Callahan, T.A. y Moynihan, J.A. 2002. Contrasting pattern of cytokines in antigen- versus mitogen-stimulated splenocyte cultures from chemically denervated mice. *Brain Behav Immun* 16, 764-773.
- Domjan, M. 1976. Determinants of the enhancement of flavored-water intake by prior exposure. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 2, 17-27.

TESIS CON
FALLA DE CALIBRE

- Espinosa, E. y Bermúdez, R.F. 2001. Relación Conducta-inmunidad: el papel de las citocinas. *Rev Invest Clin* 53, 240-253.
- Espinosa, E., King, M., Hill, C. y Bermúdez-Rattoni, F. 2000. Systemic propranolol does not disrupt, but alters conditioned enhancement of antibody production. *Brain Behav Immun* 14, 93-94 (abstract)
- Espinosa, E., Pacheco-López, G., Ramírez-Amaya, V., Zentella, A. y Bermúdez-Rattoni, F. 1999 Temporal course of IL-beta expression in spleen correlates with the ability of acquiring conditioned immunoactivation in rats. *Neuroimmunomodulation* 6, 217. (abstract).
- Exton, M.S., von Hörsten, S., Schult, M., Vöge, J., Strubel, T., Donath, S., Steinmüller, C., Seeliger, H., Nagel, E., Westerman, J. y Schedlowsky, M. 1998. Behaviorally conditioned immunosuppression using cyclosporine A: central nervous system reduces IL-2 production via splenic innervation. *J Neuroimmunol* 88, 182-191.
- Fleshner, M., Brennan, F.X., Nguyen, K., Watkins, L.R. y Maier, S.F. 1996. RU-486 blocks differentially suppressive effect of stress on in vivo anti-KLH immunoglobulin response. *Am J Physiol* 271, R1344-R1352.
- Gilley, D.W. y Franchina, J.J. 1985. Effects of pre-exposure flavor concentration on conditioned aversion and neophobia. *Behav Neural Biol* 44, 503-508.
- Golde, W.T., Piesman, J., Dolan, M.C., Kramer, M., Hauser, P., Lobet, Y., Capiiau, C., Desmons, P., Voet, P., Dearwester, D. y Frantz, J.C. 1997. Reactivity with a specific epitope of outer surface protein A predicts protection from infection with the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 65, 882-889.
- González, A. y Husband, A.J. 1998. The role of sympathetic innervation of the gut in regulating mucosal immune responses. *Brain Behav Immun* 12, 53-63.
- González, A. y Husband, A.J. 1999. Sympathectomy abrogates immunodeficiency associated with protein-energy malnutrition. *J Neuroimmunol* 99, 97-104.
- Hall, N.R., McClure, J.E., Hu, S.K., Tare, N.S., Seals, C.M. y Goldstein, A.L. 1982. Effects of 6-hydroxydopamine upon primary and secondary thymus dependent immune responses. *Immunopharmacology* 5, 39-48.
- Hermann, G., Beck, F.M., Tovar, C.A., Malarkey, W.B., Allen, C. y Sheridan, J.F. 1994. Stress-induced changes attributable to the sympathetic nervous system during experimental influenza viral infection in DBA/2 inbred mouse strain. *J Neuroimmunol* 53, 173-180.

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

- Hermann, G., Tovar, C.A., Beck, F.M., Allen, C. y Sheridan, J.F. 1993. Restraint stress differentially affects the pathogenesis of an experimental influenza viral infection in three inbred strains of mice. *J Neuroimmunol* 47, 83-94.
- James, J.H. y Wagner, A.R. 1980. One-trial overshadowing: evidence of distributive processing. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 6, 188-205.
- Kasahara, K., Tanaka, S. y Hamashima, Y. 1977a. Suppressed immune response to T-cell dependent antigen in chemically sympathectomized mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 18, 533-542.
- Kasahara, K., Tanaka, S., Ito, T. y Hamashima, Y. 1977b. Suppression of the primary immune response by chemical sympathectomy. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 16, 687-694.
- Kehoe, E.J. y Macrae, M. 2002. Fundamental behavioral methods and findings in classical conditioning. In: *A Neuroscientist's Guide to Classical Conditioning* (Ed. by J.W.Moore), pp. 171-231. New York, Springer-Verlag.
- Klosterhalfen, S. y Klosterhalfen, W. 1990. Conditioned cyclosporine effects but not conditioned taste aversion in immunized rats. *Behav Neurosc* 104, 716-724.
- Kohm, A.P. y Sanders, V.M. 1999. Suppression of antigen-specific Th2 cell-dependent IgM and IgG1 production following norepinephrine depletion in vivo. *J Immunol* 162, 5299-5308.
- Korver, K., Zeijlemaker, W.P., Schellekens, P.T. y Vossen, J.M. 1984. Measurement of primary in vivo IgM- and IgG-antibody response to KLH in humans: implications of pre-immune IgM binding in antigen-specific ELISA. *J Immunol Methods* 74, 241-251.
- Kostrzewa, R.M. y Jacobowitz, D.M. 1974. Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. *Pharmacol Rev* 26, 199-288.
- Kruszewska, B., Felten, S.Y. y Moynihan, J.A. 1995. Alterations in cytokine and antibody production following chemical sympathectomy in two strains of mice. *J Immunol* 155, 4613-4620.
- Kruszewska, B.; Felten, D.L.; Stevens, S.Y.; Moynihan, J.A. 1998. Sympathectomy-induced immune changes are not abrogated by the glucocorticoid receptor blocker RU-486. *Brain Behav Immun* 12, 181-200.
- Lamb, R.J. y Jarbe, T.U. 1997. Multielemental stimulus control: effects of saccharin concentration on a discriminated morphine-saccharin taste aversion. *Exp Clin Psychopharmacol* 5, 123-129.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

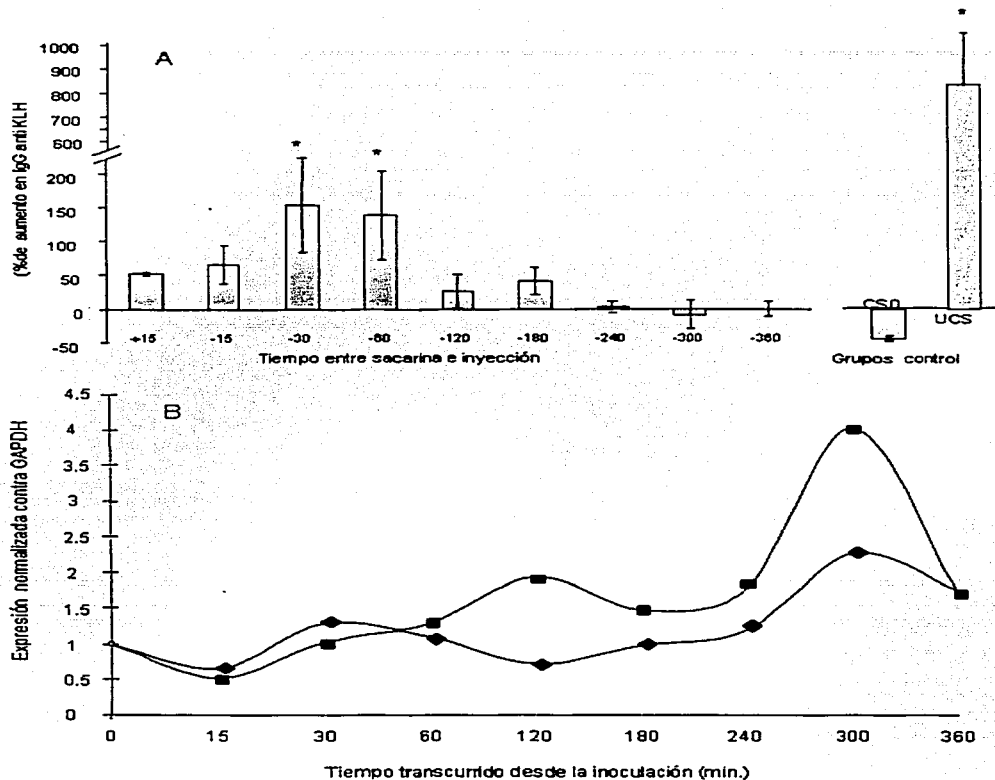
- Lee, M.S., Nokes, D.J., Hsu, H.M. y Lu, C.F. 2000. Protective titres of measles neutralising antibody. *J Med Virol* 62, 511-517.
- Leo, N.A. y Bonneau, R.H. 2000. Mechanisms underlying chemical sympathectomy-induced suppression of herpes simplex virus-specific cytotoxic T lymphocyte activation and function. *J Neuroimmunol* 110, 45-56.
- Lorton, D., Hewitt, D., Bellinger, D.L., Felten, S.Y. y Felten, D.L. 1990. Noradrenergic reinnervation of the rat spleen following chemical sympathectomy with 6-hydroxydopamine: pattern and time course of reinnervation. *Brain Behav Immun* 4, 198-222.
- Luini, W., Mantovani, A. y Garattini, S. 1981. Effects of saccharin on primary humoral antibody production in rats. *Toxicol Lett* 8, 1-6.
- Madden, K.S., Boehm, G.W., Lee, S.C., Grotta, L.J., Cohen, N. y Ader, R. 2001. One-trial conditioning of the antibody response to hen egg lysozyme in rats. *J Neuroimmunol* 113, 236-239.
- Madden, K.S., Moynihan, J.A., Brenner, G.J., Felten, S.Y., Felten, D.L. y Livnat, S. 1994. Sympathetic nervous system modulation of the immune system. III. Alterations in T and B cell proliferation and differentiation in vitro following chemical sympathectomy. *J Neuroimmunol* 49, 77-87.
- Moraska, A. y Fleshner, M. 2001. Voluntary physical activity prevents stress-induced behavioral depression and anti-KLH antibody suppression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R484-R489.
- Netter, F.H., Mtichell, G.A.G., Peterson, B.W. y Mauro, A. 1996. Autonomic Nervous System. En: *Nervous System* (A.Grass, editor), pp. 67-90. New jersey, CIBA.
- Ramírez Amaya, V. y Bermúdez Rattoni, F. 1999. Conditioned enhancement of antibody production is disrupted by insular cortex and amygdala but not hippocampal lesions. *Brain Behav Immun* 13, 46-60.
- Rescorla, R.A. y Cunningham, C.L. 1979. Spatial contiguity facilitates Pavlovian second-order conditioning. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 5, 152-161.
- Rogausch, H., Zwingmann, D., Trudewind, M., del Rey, A., Voigt, K.H. y Besedovsky, H. 2003. Local and systemic autonomic nervous effects on cell migration to the spleen. *J Appl Physiol* 94, 469-475.
- Sanders, V.M. 1998. The role of norepinephrine and beta-2-adrenergic receptor stimulation in the modulation of Th1, Th2, and B lymphocyte function. *Adv Exp Med Biol* 437, 269-278.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Sanders, V.M. y Straub, R.H. 2002. Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor, and immunity. *Brain Behav Immun* 16, 290-332.
- Seligman, M.E.P. 1970. On the generality of the laws of learning. *Psychol Rev* 77, 406-418.
- Straub, R.H., Westerman, J., Schölmerich, J. y Falk, W. 1998. Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs. *Immunol Today* 19, 409-413.
- Yasuda, M., Furusawa, S., Satoh, A., Taura, Y., Nakama, S., Yoshihara, K. e Hirota, Y. 1995. Effects of 6-Hydroxydopamine on the antibody response to the hapten dinitrophenyl in the chicken. *J Vet Med Sci* 57, 1073-1075.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Apéndice 1



Apéndice 1: Estudios iniciales con KLH (Espinosa et al. 1999) en ratas Wistar.

A: distintos grados de aumento en IgG anti KLH después de la prueba en animales condicionados retrógradamente. Se inyectaron i.p. 50µg de KLH seguidos de exposición a la sacarina después de distintos intervalos de tiempo. El grupo CSO, condicionado anterógradamente no reexpuesto a la sacarina (ver "Procedimiento General de Condicionamiento"). El grupo UCS recibe una nueva inyección de antígeno en la prueba. B: Expresión (mRNA) de citocinas proinflamatorias en bazo en distintos intervalos de tiempo después de inyectar KLH (50 µg), determinado por RT-PCR semicuantitativo, utilizando GAPDH como gen *housekeeping*. Los intervalos corresponden a los intervalos usados para condicionar en A. ■ IL-6. ◆ IL-1β

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Brain, Behavior, and Immunity xxx (2003) xxx-xxx

BRAIN,
BEHAVIOR,
and IMMUNITY

www.elsevier.com/locate/ybrbi

Enhancement of antibody response by one-trial conditioning: Contrasting results using different antigens

Enrique Espinosa, Tania Calderas, Óscar Flores-Muciño, Georgina Pérez-García, Ana C. Vázquez-Camacho, and Federico Bermúdez-Rattoni*

Department of Neuroscience, Cell Physiology Institute, National Autonomous University of Mexico UNAM, Apartado Postal 70-253, Mexico DF 04510, Mexico

Received 3 April 2003; received in revised form 14 May 2003; accepted 7 June 2003

Abstract

New research in conditioned enhancement of antibody response requires a general paradigm effective with different antigens. In this experiment series we applied a one-trial protocol using keyhole limpet hemocyanin immunization as an unconditioned stimulus. Several different conditions were tested. Two different times between conditioning and test trial, two relevant antigen doses and the use of an antigen booster during test trial were investigated. We did not find a conditioned effect in any of the conditions used. In contrast, we found a reliable albeit modest conditioned effect using hen egg lysozyme as unconditioned stimulus. By comparing these and other findings we conclude that the number of conditioning trials is a possible requirement for a more reliable conditioning of antibody response.

© 2003 Published by Elsevier Inc.

Keywords: One-trial conditioning; Antibody response; Rat; Psychoneuroimmunology; Learning and memory

1. Introduction

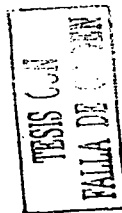
In the last decades a number of studies have been issued reporting conditioned enhancement of immune functions (Ader and Cohen, 2001). In a study of the enhancement of antibody response to protein antigens (Ader et al., 1993) three to five conditioning trials were performed, consisting of exposure of the animals to a taste stimulus followed by the injection of a low immunogenic dose of keyhole limpet hemocyanin (KLH). A robust increase in the response to a non-immunogenic dose of the antigen was later observed when animals were exposed to the flavor before receiving a booster injection. In another study conditioned enhancement of the primary antibody response to hen egg-white lysozyme (HEL) was observed doing only one conditioning trial, consisting of the exposure to saccharin taste prior to immunization. The conditioned response could be detected after re-exposing the animal to the CS only

(Álvarez-Borda et al., 1995). One-trial conditioning was independently replicated yielding a more modest effect (Madden et al., 2001).

It is necessary to define the variables that are critical for conditioned enhancement of antibody response (Ader, 2003), and further studies (Jones, 2003) require a paradigm general enough to be replicated using different protein antigens. Since one-trial conditioning has only been replicated using HEL, and KLH has been successfully used in a multi-trial paradigm, we investigated the possibility of conditioning the antibody response to KLH following a one-trial paradigm in five independent experiments that changed variables that are relevant for the acquisition of a conditioned response. We used different time frames between the conditioning and the test trial. We tested the presence of a second antigen challenge, and finally the antigen dose. In these experiments we used different control groups that are relevant to demonstrate the existence of a conditioned effect. We additionally controlled for the replication of the phenomenon reported by Álvarez-Borda et al. (1995) and Madden et al. (2001), as well as

* Corresponding author. Fax: +525-622-5607.

E-mail address: ibermede@ifisiol.unam.mx (F. Bermúdez-Rattoni).



for the conditions necessary for the neutrality of the conditioned stimulus.

2. Methods

2.1. Conditioning procedure

Five experiments with specific variations on a conditioning paradigm were conducted (Table 1). Individually caged male Wistar rats (250–350 g) from the breeding facilities of our institute were allowed to adapt to an inverted dark-light cycle (lights off 7:00, on 19:00 for at least ten days), and were randomly assigned to an experimental group. Animals were subjected to a restricted water consumption regime, being allowed to drink water in 15-min sessions every 12 h. When water consumption stabilized the conditioning trial was performed (day 0). Groups CS, CS₀, and pCS were allowed to drink saccharin solution (Sigma, USA; see concentrations in Table 1) during their scheduled morning drinking session, after which they were injected with the antigen, which was either KLH (Pierce, USA) or HEL (Sigma, USA), dissolved in pyrogen-free isotonic saline (Laboratorios Pisa, Mexico). The UCS group received the antigen without exposure to the saccharin taste (water only). Group pCS received saccharin in the morning session for several days (see Table 1) before the conditioning trial. The pre-exposure of these groups to saccharin should lead to an absence of conditioned effect, and would provide additional evidence of a classical learning phenomenon. The NC group (non-contingent or unpaired) received saccharin and was injected with KLH 12 h later. The N-C group (Experiment 3), a non-conditioned group, received the antigen during the

conditioning trial paired with tap water consumption. Six hours after conditioning the ad libitum water consumption regime was resumed.

Basal water consumption in the restricted regime was measured for at least four days before the test trial, which was performed a number of days after the acquisition trial (see Table 1). All groups except for UCS were allowed to drink saccharin solution for 15 min. UCS rats were inoculated with KLH after drinking water.

For the third experiment, a 0.15% w/v concentration of saccharin (instead of 0.1%) was used to increase the stimulus saliency (Lamb and Jarbe, 1997). This concentration does not increase the natural aversion to saccharin (Domjan, 1976) to the point where its intake is not measurable (Gilley and Franchina, 1985).

2.2. Antibody measurement

Blood samples were obtained from the infra-orbital sinus under light ether anesthesia before starting the experiment (basal levels), at different points after the conditioning trial (shown in the corresponding figures) including a pre-test reference sample, and at regular intervals after the test trial (4, 8, 12, 16, and 20 days in experiment one; 5, 8, 12, and 16 days in experiments two and four; 4, 8, 12, and 16 in experiments three and five). Anti-KLH IgG in serum was measured by ELISA: Polystyrene micro-wells (Nunc, Denmark) were coated with 0.5 mg/100 ml KLH in pH 9.6 carbonate buffer overnight at room temperature. Three washing steps with de-ionized water were performed after each incubation. Wells were incubated in blocking buffer (of 5% casein, skimmed milk, in buffered saline) 2 h 37 °C. One hundred microliters of each serum (diluted in blocking

TESIS COM
 PLETA
 FALTA DE PAGINA

Table 1
Conditions in the different experiments

Experiment	Saccharin concentration	Antigen dose	Groups	N	Conditioning-test interval	Antigen boost	Observations
1	0.1%	50 µg KLH	CS, CS ₀ , UCS	6	94 days	None	No conditioned effect, normal secondary response
2	0.1%	50 µg KLH	CS, CS ₀ , NC, UCS	8	92 days	0.021 µg/rat ^a	No conditioned effect, normal secondary response
3	0.15% ^b	50 µg KLH	CS, CS ₀ , pCS ^c , N-C	10	45 days	None	No differences between groups after test trial (pCS higher before test trial)
4	0.1%	500 µg KLH	CS, CS ₀ , pCS ^c	10	45 days	None	No differences between groups
5	0.1%	500 µg HEL	CS, CS ₀	7, 9	37 days	None	Significant difference between groups after test trial conditioned effect

^a KLH boost dose was calculated dividing the amount used by Ader et al. (1993) by the weight of 140-day old mice and adjusting to the mean weight of the rats in the study.

^b 0.15% w/v concentration of saccharin was used to increase the stimulus saliency without increasing its natural aversiveness to the point where its intake is not measurable.

^c pCS groups were exposed to saccharin in the morning session for five days (Experiment 3) or three days (Experiment 4) before the conditioning trial.

buffer) were added to duplicate wells, and incubated 2 h at 37°C. (Dilutions assayed: 1/800, 1/1600, and 1/3200 in experiments 1 and 2; serial 1/2 dilutions from 1/20 to 1/10 240 in experiments 3, 4, and 5). Goat anti-rat IgG (H and L chains, Pierce, USA) diluted in blocking buffer (1/5000) was added and incubated 2 h at 37°C. The reaction was developed with 0.1% ABTS (Sigma) + 0.03% H₂O₂ in citrate buffer (pH 4.2) 10 min at room temperature. Absorbance at 405 nm was measured. Results were corrected for background signal and for inter-assay variance dividing each absorbance value by the value obtained with an aliquot of a control positive serum run in each plate at a fixed dilution, as previously described (Fleshner et al., 1996). The antibody titer was defined as the dilution of a sample that gave a signal equal to 2.5 times the background, and was calculated by simple regression of the linear portion of the titration curve. Since titration screened a broader range of serum dilutions, and produced a single measure that did not require choosing a particular dilution (Butler, 1994), antibody levels were analyzed as normalized absorbance only when titration was not performed (Experiments 1 and 2).

Linear regression of the titration curves and analysis of variance of absorbance and titer values were performed using Stat View software.

3. Results

Fig. 1 shows the antibody levels in experiment 1 before and after the test trial. There is no increase in antibody levels following the test trial, which was performed 90 days after the conditioning trial. There are no differences between CS and CSo groups at any time. The re-injection of 50 µg of KLH to the UCS group, however, is able to increase the antibody levels quicker and higher than the initial challenge. The 50 µg KLH dose used was immunogenic in all cases. The maximal response is reached around day 55 (not shown), and there were no differences among groups before the test trial. Antibody levels do not return to basal levels up to 90 days after the immunization.

Similar figures were obtained from experiments 2, 3, and 4 (not shown). In experiment 2, the administration of an antigen booster to CS, CSo, and N-C groups during the test trial did not yield differences between these groups, but the administration of the original KLH dose (50 µg) to the UCS group increased the antibody levels as in experiment 1. In experiment 3 there were neither differences between the CS, CSo, and N-C group at any time nor any effect of the re-exposure to saccharin. The pCS control group was excluded of the analysis of values after the test trial because it already showed significantly higher IgG levels before the test. One-way ANOVA of anti KLH IgG titers at day 43 (pre-test) shows an effect of the conditioning treatment

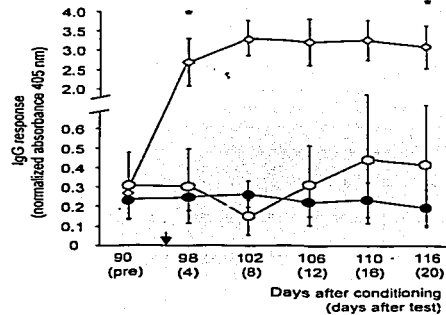


Fig. 1. Specific anti-KLH IgG levels in experiment 1 before and after the test trial. The arrow indicates the time of the test trial. ○, UCS group (re-inoculated with the antigen); ●, CS group (conditioned and re-exposed to the CS); ○, CSo group (conditioned, not re-exposed to the CS); *N* = 6 in all groups. **p* < .01 Error bars = one standard error.

($F_{2,35} = 4.96, p < .05$). Fisher's post hoc test shows that values in the pCS group are significantly higher than in the conditioned (CS and CSo grouped together), and in the non-conditioned animals ($p < .05$ in both cases). This difference persisted until day 54 (not shown). There were no differences in basal levels among groups. No

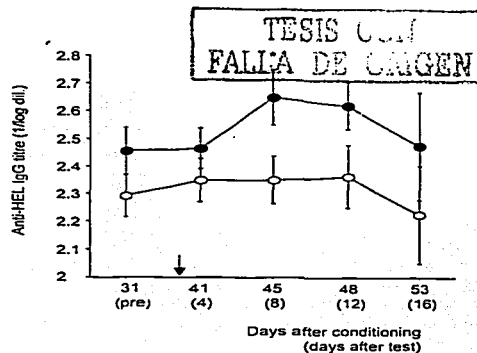


Fig. 2. Conditioned enhancement of antibody response to HEL following the one-trial procedure (Experiment 5). ●, CS group (conditioned and re-exposed to the conditioned stimulus, *N* = 7). ○, CSo group (conditioned, not re-exposed to the conditioned stimulus, *N* = 9). **p* < .05. Error bars = one standard error.

differences in antibody levels between groups were seen at any time in experiment 4.

A replication of the one-trial conditioning with HEL was observed in the fifth experiment (Fig. 2). An unpaired *t* test of the specific IgG titers of the CS and the CS₀ (control) groups shows differences 8 days after the test trial ($T_{14} = 2.27, p < .05$). Using absorbance values as a measure of antibody levels, significant differences between groups could be seen in the 1/320 dilution, out of a series of ten dilutions assayed. These differences were found 8 days ($T_{14} = 2.3, p < .05$), and 11 days ($T_{14} = 2.2, p < .05$) after the test trial (not shown). In experiments 3–5, the results using antibody titers were consistent with results measuring antibody levels as absorbance values in a range of 8 relevant dilutions.

4. Discussion

Our results show that 50 µg of KLH, an immunogenic dose, cannot induce conditioning of antibody response in several conditions. We waited until the antibody response was not increasing anymore to perform the test trial (Experiment 1), following the criterion in the HEL studies, (Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001). We used an antigen booster dose (Experiment 2) intended to be as similar as possible to the one used in mice by Ader et al. (1993). Since memory retrieval is a function of time, we lowered the number of days between the conditioning and the test trial (Experiment 3) to follow Álvarez-Borda et al. (1995) and Madden et al. (2001). Since this antigen dose was perhaps not able to generate enough input for learning acquisition, a KLH dose identical to the HEL dose in the one-trial reports was used (Experiment 4). This procedure did not yield a noticeable conditioned effect. From experiment 3 on, we added the determination of antibody titers (see Section 2) to achieve a more complete assessment of antibody levels. In all experiments, the absorbance results were consistent with the titer ones.

Preliminary studies in our laboratory replacing 500 µg HEL with 50 µg KLH in the protocol of Álvarez-Borda et al. (1995) reported modest differences in antibody levels between the main experimental and the control groups. However, these possible conditioned effects were only noticeable when reported as percent increase from pre-test values (Espinosa et al., 2000; Espinosa et al., 1999).

Given our results, and the fact that KLH was successfully used in a series of experiments that used multiple learning trials in mice (Ader et al., 1993), we believe that the acquisition of this conditioned response may need more conditioning trials. This is important because acquisition of conditioned responses in only one trial is unusual (Bures, 1998; Seligman, 1970), multiple trials being a common requirement (Kehoe and Macrae, 2002). Species differences seem a less likely

cause of the lack of conditioning, since rats have been successfully used in antibody response conditioning (Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001) and in other models of immunocconditioning (Coussons-Read et al., 1994; MacQueen et al., 1989; von Hörsten et al., 1998).

In contrast, using HEL as the UCS in a one-trial conditioning, we replicated the effect originally reported by our group (Álvarez-Borda et al., 1995; Ramírez-Amaya and Bermúdez-Rattoni, 1999), and by Madden et al. (2001). The effect hereby observed was modest, and was similar to the effect reported by Madden et al. (2001). One-trial conditioning using HEL has not been obtained in all situations (Boehm et al., 1998). Given these discrepancies, the conditions for a consistently robust conditioned enhancement of antibody response to HEL also need to be determined.

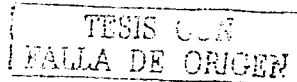
It is noteworthy that one trial conditioning is induced more easily with HEL than KLH. Even though they are both proteic antigens, our experiments showed differences in the time required to reach the maximal IgG response to HEL and KLH (25 and 40 days, respectively), which suggests differences in the kinetics of the events they elicit. Differences of this sort could influence their function as unconditioned stimuli.

Appropriate controls in this and previous studies (Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001) verified the neutrality of saccharin. For instance, none of our present experiments with KLH showed differences between CS and CS₀ groups (this, additionally, is enough to evidence the absence of a conditioned effect). However, a control group (pCS), pre-exposed to saccharin for five days before the conditioning trial, reached significantly higher antibody response before the test trial in experiment 3. Even though it is difficult to attribute this effect to the pretreatment with saccharin (the response showed a high variance, no additional support is provided by previous work by Luini et al. (1981) using doses and parameters not comparable to those in conditioning studies) the neutrality of saccharin must be demonstrated in each particular experimental setting.

In summary, we provide evidence that one-trial acquisition of conditioned enhancement of antibody production is not a phenomenon general to all protein antigens. The search for a more general paradigm for antibody response conditioning should therefore, include the use of several conditioning trials. Future research should exercise caution when generalizing results to new experimental settings.

Acknowledgment

We give thanks to Ulricke Birner for the English revision of the final text.



References

- Ader, R., 2003. Conditioned immunomodulation: Research needs and directions. *Brain Behavior and Immunity* 17, 51-57.
- Ader, R., Cohen, N., 2001. Conditioning and immunity. In: Ader, R., Felten, D.L., Cohen, N. (Eds.), *Psychoneuroimmunology*. Academic Press, San Diego, pp. 3-34.
- Ader, R., Kelly, K., Moynihan, J.A., Grotta, L.J., Cohen, N., 1993. Conditioned enhancement of antibody production using antigen as the unconditioned stimulus. *Brain Behavior and Immunity* 7, 334-343.
- Álvarez-Borda, B., Ramírez-Amaya, V., Pérez-Montfort, R., Bermúdez-Rattoni, F., 1995. Enhancement of antibody production by a learning paradigm. *Neurobiology of Learning and Memory* 64, 103-105.
- Boehm, G.W., Karp, J.D., Grotta, L.J., Moynihan, J.A., Cohen, N., Ader, R., 1998. Failure to replicate conditioned enhancement of antibody production following single-trial learning paradigms using antigen as the unconditioned stimulus. *Neuroimmunomodulation* 5 (1-2), 67. Abstract.
- Bures, J., 1998. Ethology, physiological psychology, and neurobiology of conditioned taste aversion. In: Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F., Yamamoto, T. (Eds.), *Conditioned Taste Aversion: Memory of a special kind*. Oxford Science Publications, Oxford, pp. 1-13.
- Butler, J.E., 1994. Enzyme-linked immunosorbent assay. In: van Oss, C.J., van Regenmortel, M.H.V. (Eds.), *Immunochemistry*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 759-803.
- Coussons-Read, M.E., Dykstra, L.A., Lysle, D.T., 1994. Pavlovian conditioning of morphine-induced alterations of immune status: evidence for opioid receptor involvement. *Journal of Neuroimmunology* 55, 135-142.
- Domjan, M., 1976. Determinants of the enhancement of flavored-water intake by prior exposure. *Journal of Experimental Psychology and Animal Behaviour Process* 2, 17-27.
- Espinosa, E., King, M., Hill, C., Bermúdez-Rattoni, F., 2000. Systemic propranolol does not disrupt, but alters conditioned enhancement of antibody production. *Brain Behavior and Immunity* 14, 93-94. Abstract.
- Espinosa, E., Pacheco-López, G., Ramírez-Amaya, V., Zentella, A., Bermúdez-Rattoni, F., 1999. Temporal course of IL-1 beta expression in spleen correlates with the ability of acquiring a conditioned immunoactivation in rats. *Neuroimmunomodulation* 6, 217. Abstract.
- Fleshner, M., Brennan, F.X., Nguyen, K., Watkins, L.R., Maier, S.F., 1996. RU-486 blocks differentially suppressive effect of stress on in vivo anti-KLH immunoglobulin response. *American Journal of Physiology* 271, R1344-R1352.
- Gilley, D.W., Franchina, J.J., 1985. Effects of preexposure flavor concentration on conditioned aversion and neophobia. *Behavioral and Neural Biology* 44, 503-508.
- Jones, P.H., 2003. Do activated lymphocytes communicate clone-specific information to the CNS? *Brain Behavior and Immunity* 16, 619-621.
- Kehoe, E.J., Macrae, M., 2002. Fundamental behavioral methods and findings in classical conditioning. In: Moore, J.W. (Ed.), *A neuroscientist's guide to classical conditioning*. Springer-Verlag, New York, pp. 171-231.
- Lamb, R.J., Jarbe, T.U., 1997. Multielemental stimulus control: Effects of saccharin concentration on a discriminated morphine-saccharin taste aversion. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 5, 123-129.
- Luni, W., Mantovani, A., Garattini, S., 1981. Effects of saccharin on primary humoral antibody production in rats. *Toxicology Letter* 8, 1-6.
- MacQueen, G., Marshall, J., Perdue, M., Siegel, S., Bienenstock, J., 1989. Pavlovian conditioning of rat mucosal mast cells to secrete rat mast cell protease II. *Science* 243, 83-85.
- Madden, K.S., Boehm, G.W., Lee, S.C., Grotta, L.J., Cohen, N., Ader, R., 2001. One-trial conditioning of the antibody response to hen egg lysozyme in rats. *Journal of Neuroimmunology* 113, 236-239.
- Ramírez-Amaya, V., Bermúdez-Rattoni, F., 1999. Conditioned enhancement of antibody production is disrupted by insular cortex and amygdala but not hippocampal lesions. *Brain Behavior and Immunity* 13, 46-60.
- Seligman, M.E.P., 1970. On the generality of the laws of learning. *Psychological Reviews* 77, 406-418.
- von Hörsten, S., Extort, M.S., Schult, M., Nagel, E., Stalp, M., Schweitzer, G., Voge, J., del Rey, A., Schedlowski, M., Westermann, J., 1998. Behaviorally conditioned effects of Cyclosporine A on the immune system of rats: Specific alterations of blood leukocyte numbers and decrease of granulocyte function. *Journal of Neuroimmunology* 85, 193-201.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN