

03062

14
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL COLEGIO
DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR**

**Substratos Neuroanatómicos de la Modulación Conductual de
la Respuesta Inmune: Efecto de las Lesiones de Amígdala
y Corteza Insular en el Condicionamiento Inmunosupresor**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A

VICTOR RAMIREZ AMAYA



Director de Tesis:

Dr. Federico Bermúdez Rattoni

MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A Emy, por ser mi compañera e inspiración.

Agradecimientos

Agradezco sinceramente al Dr. Federico Bermudez Rattoni por su atinada tutoría, por el apoyo y la confianza que me ha brindado.

A mis sinodales, Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dr. Ranulfo Romo Trujillo, Dra. Herminia Pasantes Morales y Dr. Jose Luis Molinari Soriano, por sus comentarios, correcciones y consejos.

A Benjamin Alvarez Borda quien colaboró entusiastamente en los trabajos de investigación de esta tesis y contribuyó con ideas importantes para el desarrollo de los mismos.

Al Dr Ruy Pérez Montfort a quien agradezco su colaboración en el proyecto y ayuda en la implementación de las técnicas inmunológicas, además de sus valiosos comentarios como tutor.

Al Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia quien con sus comentarios y sugerencias en los tutoriales enriqueció el trabajo de investigación.

A mi Padre por su apoyo incondicional y por su ejemplo.

A mi Madre y Hermana, gracias por enseñarme a que cada día tengo que ser mejor.

A mis compañeros de laboratorio que siempre están dispuestos a contestar mis preguntas.

A Oreste Carbajal por su ayuda siempre valiosa.

A la DGAPA por el apoyo económico brindado a través del proyecto IN201993.

Indice

Introducción	5
La Neuroinmunología	5
El Condicionamiento de la Respuesta Inmune	12
La Corteza Insular	18
Trabajo #1 Efecto de lesiones excitotóxicas de la CI en el	
Condicionamiento Inmunosupresor	22
Introducción	23
Hipótesis	24
Método Gral.	25
1a Serie de experimentos	29
Procedimiento	29
Resultados	30
2a Serie de experimentos	37
Procedimiento	37
Resultados	37
Discusión	40
Trabajo #2 Efecto de la lesión de corteza insular y amígdala	
en la adquisición y evocación del condicionamiento inmunosupresor	42
Introducción	43
Hipótesis	45
Método	46
Procedimiento	46
Resultados	47
Discusión	51
Conclusiones Generales	55
Referencias	60

Introducción

Neuroinmunología

En la última década se han generado una gran cantidad de datos experimentales que demuestran la participación del sistema nervioso en la modulación de la respuesta inmune, lo que ha puesto en duda el concepto de la autonomía funcional del sistema inmune. Ciertamente tanto el sistema nervioso como el sistema inmune pueden funcionar como sistemas independientes (Blalock, 1984). Sin embargo, los procesos que regulan ambos sistemas se encuentran inmersos en un complejo funcional integrado, dando lugar así a un sólo sistema de defensa (Ader, Cohen, & Felten, 1995), que incluye a los procesos inmunitarios y diversos cambios adaptativos en la conducta. El reconocimiento de la integración de ambos sistemas ha dado lugar al desarrollo de la neuroinmunología, disciplina encargada de estudiar las interacciones entre el sistema nervioso y el sistema inmune (incluyendo la participación del sistema neuroendócrino y la conducta).

En la actualidad se reconocen dos vías que vinculan al sistema nervioso con el sistema inmune. La primera está representada por el eje hipotálamo hipofisario y la segunda por el sistema nervioso autónomo. Históricamente la vía hipotalámica ha recibido mucha atención, en virtud de que los factores hormonales se reconocieron tempranamente como importantes agentes moduladores de la respuesta inmune.

Uno de los ejemplos clásicos en cuanto a la regulación que las hormonas ejercen sobre el sistema inmune es el caso de los corticosteroides, que a su vez explica el fenómeno de la depresión inmunitaria durante el stress. La respuesta hormonal asociada al stress está dada por un incremento en la liberación del factor liberador de corticotropinas (CRF) por el hipotálamo, lo cual induce una secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) por la pituitaria anterior y a la vez esto estimula la liberación de glucocorticoides por la corteza adrenal (Basedovsky, Del-Rey, & Sorokin, 1985). Los efectos inmunológicos de los glucocorticoides se conocen desde mediados del siglo XIX (Munck & Guyre, 1991), reconociéndose ahora sus capacidades inmunosupresivas y anti-inflamatorias que son de gran utilidad clínica. Muchas otras hormonas juegan un importante papel en la regulación de la respuesta inmune. Por ejemplo, la hormona de crecimiento incrementa el tamaño de los tejidos linfoides, particularmente del timo, también se

ha sugerido que esta hormona puede afectar la actividad de linfocitos y macrófagos cuando se encuentran en tejido linfático (Kelley, 1991). La prolactina parece estar involucrada en la activación de linfocitos B para la formación de anticuerpos, en la expresión de respuestas de hipersensibilidad de tipo retrasada y parece mediar la activación de linfocitos T cuando esta depende de macrófagos (Nagy, Berczy, Wren, Asa & Kovacs, 1983). En el caso de la vasopresina, esta puede funcionar como un potente mitógeno y reemplazar los requerimientos de interleucina-2 (IL-2) por interferon γ , modulando así la respuesta de células linfoides con receptores a interferon γ . La tirotropina también se ha asociado a la modulación de la respuesta inmune, llevando a cabo una acción potenciadora de la respuesta (Fabris, Mocchegiani & Provinciali, 1995); De esta manera, el hipotiroidismo induce involución en el timo, el bazo y en nodos linfáticos, en contraste, el hipertiroidismo incrementa la actividad de las células del timo y de otras regiones de tejido linfoide (Fabris et al., 1995).

Debido al reconocimiento del papel que tienen las hormonas en la regulación inmunitaria, las primeras investigaciones neuroanatómicas encargadas de distinguir estructuras involucradas en la regulación inmunitaria, **comenzaron** por estudiar el papel del hipotálamo. Se demostró así que las **lesiones** hipotalámicas producen claros cambios en la actividad de diversos grupos de células linfáticas (Cross, Markesberry, Brooks, & Roszman, 1980). Baciú (1993) afirma que la parte posterior del hipotálamo, esta involucrada en la regulación e integración de la respuesta inmune considerándose como una **función homeostática** en conexión con el hipotálamo anterior; donde los núcleos laterales y el área preóptica cumplen una función receptiva ante el **reto antigénico** y ante diversos factores inmunitarios.

La **otra** vía de acceso que tiene el **sistema nervioso** hacia el sistema inmune, es a través del sistema nervioso autónomo. Con técnicas histoquímicas, se ha demostrado la **presencia** de inervación simpática en regiones específicas de tejido linfoide primario y **secundario** (Felten, Felten, Carlson, Olschowka & Livnat 1985). Estas inervaciones son predominantemente noradrenérgicas (Madden, Ackerman, Livnat, Felten, & Felten, 1989). También se encuentran fibras peptidérgicas innervando la médula ósea, el timo, el bazo, **nódulos linfáticos** y el tejido linfoide asociado a las mucosas (Felten & Felten, 1991). Las fibras **nerviosas** forman uniones neuroefectoras cercanas a linfocitos y macrófagos, **regulando** así la función de estas células de forma directa. Los neurotransmisores liberados de estas terminales nerviosas pueden difundirse para actuar en sitios lejanos, lo cual extiende el potencial interactivo entre el sistema nervioso autónomo y el sistema inmune.

Además, la mayoría de las células linfoides tienen receptores para al menos algún tipo de los neurotransmisores utilizados por el sistema nervioso autónomo. Las células linfáticas expresan receptores para catecolaminas y una gran variedad de neuropéptidos (Husband, 1993). Los neuropéptidos que más se han estudiado en cuanto al papel que juegan en la interacción neuro-inmune son la sustancia P y el Péptido Vasoactivo Intestinal (VIP) (Ackerman, Bellinger & Felten, 1991).

Las lesiones químicas y ablaciones del sistema nervioso simpático, causan una serie de efectos en diversas poblaciones de células linfoides (Miles, Chelmic-Schorr, Otten, & Arnason, 1985). Dichos efectos son más diversos que los observados con lesiones del hipotálamo y son más duraderos (Reider, Karaszewsk, & Arnason 1989).

Ambas vías de modulación neuroinmune mantienen importantes vínculos anatómicos y funcionales con estructuras del sistema límbico incluyendo regiones corticales que podrían estar regulando la interacción sistema nervioso - sistema inmune. Con el uso de técnicas de lesión se ha podido observar la participación de algunas estructuras en la regulación de la respuesta inmune. Lesiones efectuadas con excitotoxinas en el área septal incrementan la actividad de células NK, disminuyen el número de células formadoras de plaquetas y suprimen la secreción de TNF α por macrófagos (Wetmore, Green-Johnson, Gartner, Sanders, & Nance, 1994). Otras estructuras del sistema límbico, se ha propuesto, participan en la regulación de la respuesta inmune. Usando lesiones electrolíticas del hipocampo y la amígdala se han encontrado efectos en la actividad mitogénica de células T e incrementos transitorios en la cantidad de timocitos y esplenocitos (Brooks, Cross, Roszman, & Markesbery, 1982), sin embargo en experimentos posteriores se observó que lesiones del hipocampo no tenían efecto alguno sobre diversos parámetros inmunitarios (Nance, Rayson, & Carr, 1987). El grupo de Cross (Brooks et al., 1982), realizó otros experimentos que les permitieron observar que la vía hipotálamo hipofisaria mediaba en forma muy importante los efectos de las lesiones de amígdala e hipocampo sobre la respuesta inmune (Cross, Brooks, Roszman, & Markesbery, 1982). Las lesiones utilizadas por el grupo de Cross destruyen tanto células como fibras de paso, lo que impide hacer una inferencia clara del papel del hipocampo y la amígdala en la respuesta inmune.

Lesiones de estructuras particulares del tallo cerebral también producen cambios en la actividad inmunitaria. Al lesionarse la parte caudal de la formación reticular, se observa una inhibición de respuestas anafilácticas, mientras que si se lesiona la parte rostral de la formación reticular, incluyendo los núcleos del

rate, se presenta un incremento en la sensibilidad de este tipo de respuestas (Isakovic & Jankovic, 1973). Lesiones de la formación reticular, también resultan en la involución del timo. Se ha encontrado también que lesiones de los núcleos parabraquiales del puente, particularmente los ventrales y mediales, producen un decremento en la respuesta proliferativa de timocitos (Kadlecova, Masek, Serfert, & Petrovicky, 1987). Estos núcleos están integrados dentro de las conexiones entre el tallo cerebral y los núcleos autonómicos, tal como el núcleo del tracto solitario, el hipotálamo y la circuitaría de la amígdala, y pueden estar involucrados en el procesamiento de información asociado con las interacciones neuroinmunes (Felten, Cohen, Ader, Felten, Carlson, & Roszman, 1991).

Neveu y colaboradores (Neveu, 1992; Neveu, 1993) han sugerido la participación de la corteza cerebral en la modulación de la respuesta inmune, proponiendo la existencia de un sistema lateralizado. Estos investigadores encontraron que lesiones grandes del hemisferio izquierdo de ratón, producen un decremento en el número de células T y en la actividad mitogénica de estas células y de células NK. Por su parte, lesiones de la corteza cerebral derecha tuvieron efectos opuestos. A pesar de lo sugerente de los datos, las lesiones efectuadas son demasiado grandes y los mecanismos, vías e identidad del sistema involucrado en el efecto se desconocen.

Es claro entonces, que el sistema nervioso tiene la capacidad de ejercer una importante influencia sobre la respuesta inmune, sin embargo, para que un sistema pueda funcionar adecuadamente como un regulador o modulador debe de contar con información apropiada acerca de la variable o variables que está modulando. De ésta manera tenemos que el sistema nervioso central requiere de información proveniente del sistema inmune para que pueda darse una interacción reguladora entre estos.

Las citocinas, las cuales son un grupo de moléculas polipeptídicas que se asocian generalmente con los mecanismos de activación del sistema inmune y la estimulación de respuestas inflamatorias, pueden tener diversos efectos sobre tejido nervioso, y probablemente sirvan como un sistema de retroalimentación entre el sistema inmune y el sistema nervioso central.

Se ha encontrado que en sistema nervioso se expresan receptores para IL-1, IL-2, IL-3, IL-6 y TNF- α , esto se puede ver tanto en células neurales y como células gliales (Hopkins & Rothwell, 1995). Lo anterior no es de interés para la interacción neuro inmune cuando nos referimos a las células microgliales en virtud del papel

de macrófago que se le ha atribuido a estas células, sin embargo resulta importante cuando hablamos de la expresión de este tipo de receptores en células neurales, los cuales pueden tener un papel funcional muy importante. Con técnicas de hibridización, se ha encontrado evidencia de la existencia de receptores a IL-1 tipo I en el giro dentado y la región CA3 del hipocampo, en los núcleos antero dorsales del tálamo, en el rafe dorsal, en las neuronas sensoriales de los núcleos mesencefálicos del nervio trigémino, en las células de Purkinje en el cerebelo y en células secretoras de hormonas en la pituitaria anterior. Es de sorprender el hecho de que no se haya observado mRNA de IL-1 en células hipotalámicas, debido al papel que se le atribuye a esta citocina en la regulación de la temperatura, sin embargo es probable que el tipo de receptor que se encuentra en el hipotálamo y que responde a IL-1 tenga características moleculares diferentes a los que se observan en las células linfoides (Cunningham & Souza, 1993). Recientemente se ha reportado la presencia de otro tipo de receptor en sistema nervioso con una selectividad inusual a IL-1 β (Hopkins & Rothwell, 1995). Este último dato implica que el estudio futuro de receptores a citocinas en sistema nervioso deberá tomar en cuenta la posibilidad de que estos receptores no sean completamente homólogos a los que se encuentran generalmente en células linfoides u otros tejidos.

La existencia de receptores a interleucinas en sistema nervioso es importante porque pueden implicar un papel funcional de estas moléculas en la comunicación neuro inmune. Se ha descrito que después de una inmunización se observa un incremento en la actividad eléctrica de neuronas hipotalámicas (Basedovsky, Sorkin, Felix y Hass, 1977), así mismo, se ha observado que la estimulación antigénica produce un incremento en el metabolismo de las catecolaminas en la amígdala y el hipocampo (Masek, Petrovicky y Seifert, 1992). Con el uso de inmunosupresores se han obtenido efectos diversos en otras estructuras del sistema nervioso. Estos efectos pueden estar mediados por la acción de interleucinas en sistema nervioso, aún cuando esto no ha sido comprobado, la existencia de receptores a interleucinas en dichas regiones lo sugiere, y no se ha planteado hasta el momento otra alternativa que explique satisfactoriamente la forma en como los cambios en el estatus inmunológico afecta la actividad de diversas regiones de sistema nervioso.

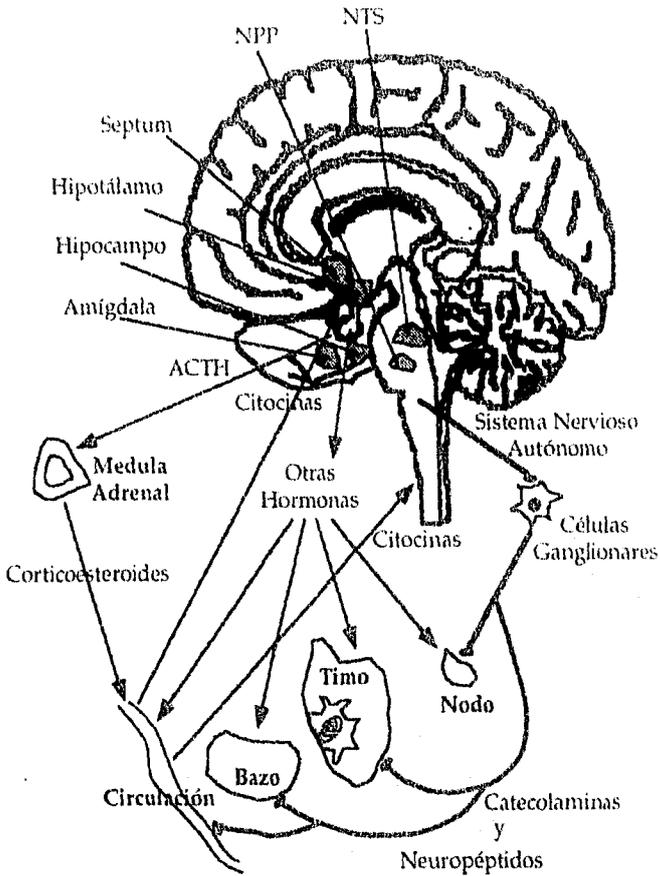
Un problema de este planteamiento es el de como las interleucinas liberadas periféricamente logran acceder al sistema nervioso para llevar a cabo su función mensajera. El transporte pasivo a través de la barrera hemato-encefálica es poco probable debido al tamaño y estructura de las interleucinas. En contraste se ha descrito un sistema de transporte activo para la IL-1 y el TNF- α (Gutierrez, Banks,

& Kastin, 1993), que permite el paso de estas proteínas de la sangre al cerebro, en donde receptores a estas interleucinas en células endoteliales llevan a cabo la labor. Se ha propuesto que los receptores a otras interleucinas en células endoteliales podrían traducir la señal con la mediación de productos eicosanoides o bien transportar activamente a la molécula a través de la actividad de proteínas acarreadoras (Cunningham & Souza, 1993). La posibilidad de un fenómeno de extravasación aún cuando propuesta se piensa poco probable. Por otro lado se observado que algunos tipos de células linfoides llegan a estar presentes en parénquima, lo cual se debe probablemente a que las células linfoides a través de una diapedesis logran cruzar la barrera hematoencefálica. Cabe señalar que si bien muchas interleucinas pueden ser producidas en sistema nervioso, éstas se producen principalmente por la microglía activada durante procesos inflamatorios y su producción se asocia más a condiciones patológicas que a condiciones fisiológicas.

Recientemente se ha obtenido evidencia que indica la posibilidad de que el nervio vago sea la principal ruta de acceso para la función comunicativa de las interleucinas en la interacción neuroinmune, debido a la presencia de receptores en terminales simpáticas (Luheshi, Hammond, & Dam, 1996). De esta manera también los núcleos de tallo que integran información visceral como el núcleo del tracto solitario (NTS) han sido implicados de manera importante en la integración de información proveniente del sistema inmune (Luheshi, Hammond, & Dam, 1996).

De esta manera tenemos que el sistema nervioso es capaz de ejercer una importante influencia sobre el sistema inmune a través de dos sistemas neurales efectores. El primero representado por el eje hipotálamo pituitaria, en donde a través de hormonas el sistema nervioso ejerce un control homeostático de la actividad inmunitaria, ayudando a mantener un estatus estable del sistema inmunológico. Husband (1993) le atribuye una función tónica a la regulación hipotalámica, mientras que a la regulación ejercida por el sistema nervioso autónomo se le atribuye una función fásica, con la que se ejerce influencia nerviosa sobre la inmunidad en respuesta a las demandas ambientales.

Así mismo, el sistema nervioso se informa de lo que acontece en el sistema inmune a través de los cambios en las concentraciones de interleucinas, las cuales actúan en algunas estructuras del sistema límbico y a nivel del sistema nervioso autónomo. Probablemente estas estructuras del sistema límbico y algunas regiones corticales son las responsables de organizar la modulación neuro inmune.



Esquema 1. Se muestran las principales vías de comunicación entre el sistema nervioso central y el sistema inmune. ACTH, Hormona Adeno Cortico Trópica; NTS, Núcleo del Tracto Solitario; Núcleo Pretraquíal del Puente.

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

El Condicionamiento de la Respuesta Inmune

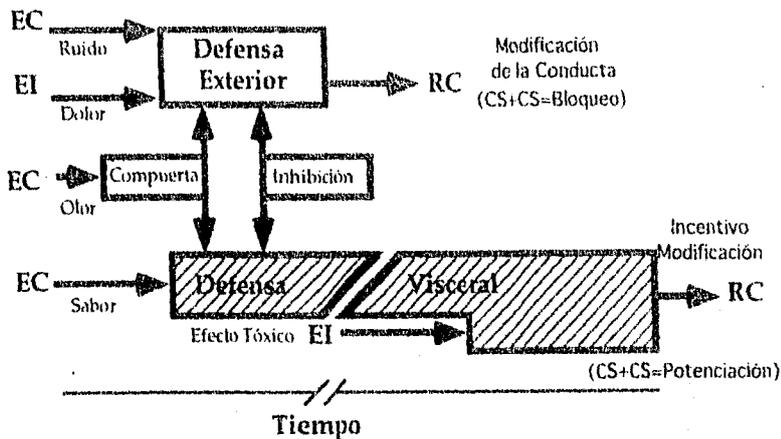
Los primeros intentos por condicionar al sistema de defensa fueron hechos en 1926 por Metal'nikov y Chorine (Ader & Cohen, 1985), quienes buscaron condicionar el incremento de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) evocado por la inyección de antígeno (que en este caso era *Bacillus anthracis*, como estímulo incondicionado EI), apareándola entre 18 y 25 veces con un estímulo inmunológicamente neutro (rascar o calentar la piel como estímulo condicionado EC), utilizando conejillos de indias como sujetos experimentales. Los autores reportan el haber obtenido un efecto condicionado, aunque claramente la respuesta condicionada fue débil y transitoria comparada con la respuesta inducida por el antígeno.

El éxito del condicionamiento de la respuesta inmune surgió con el uso de un modelo de evitación al sabor denominado condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), descrito originalmente por García, Kimmeldorf y Koelling (1955). Este se convirtió en un paradigma clásico por sus implicaciones teóricas y por su utilidad práctica, ya que es un procedimiento de condicionamiento con el que fácilmente se obtiene la aversión condicionada al sabor, tanto que basta un solo ensayo para que el animal aprenda, además de que puede perdurar por meses y su extinción total toma varios ensayos.

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

Esta evidencia sugirió que los circuitos involucrados en cada tipo de condicionamiento eran diferentes y por lo tanto los centros nerviosos en donde

ocurrían los mecanismos de integración de los estímulos, tenían que tener ciertas peculiaridades. De esta manera se planteó un modelo funcional para los reflejos defensivos (esquema 2) en el cual explicaba como los estímulos exteroceptivos entre sí, podían entrar en una relación temporal y desarrollar un condicionamiento, mientras los estímulos gustativos y viscerales hacían lo mismo en otro sistema (García, Lasiter, Bermudez-Rattoni, & Deems, 1985). La percepción olfativa representa un enlace entre ambos sistemas, esto debido a que se demostró que cuando un estímulo gustativo es apareado con malestar gástrico, se puede inducir la aversión al olor si este se acompaña de un estímulo gustativo, pero no si solo se aparean olor y malestar, de la misma manera, el estímulo olfativo puede ser relacionado temporalmente con un estímulo exteroceptivo.



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

Esquema 2. Mediante un diagrama de bloque se representan los sistemas defensivos externos e internos (visceral), ilustrando los diferentes estímulos que pueden entrar selectivamente en una relación temporal para desarrollar un condicionamiento. Cabe señalar que el olor se presenta como una compuerta entre los dos sistemas ya que puede ser relacionado temporalmente en ambos sistemas.

En 1974 Robert Ader de la Universidad de Rochester, interesado en el GAS, utilizaba otras drogas en lugar del usual LiCl como productor de malestar gástrico. Cuando usó ciclofosfamida como estímulo incondicionado apareada con sacarina, pudo observar la adquisición de una aversión condicionada al sabor. Al realizar pruebas de extinción para valorar la fuerza del condicionamiento, observó que muchos de los animales morían después de varias exposiciones al sabor, además el índice de mortandad estaba asociada al número de reexposiciones a la sacarina y al volumen consumido durante el entrenamiento. La ciclofosfamida es bien conocida por su capacidad inmunosupresora y colateralmente produce irritación gástrica.

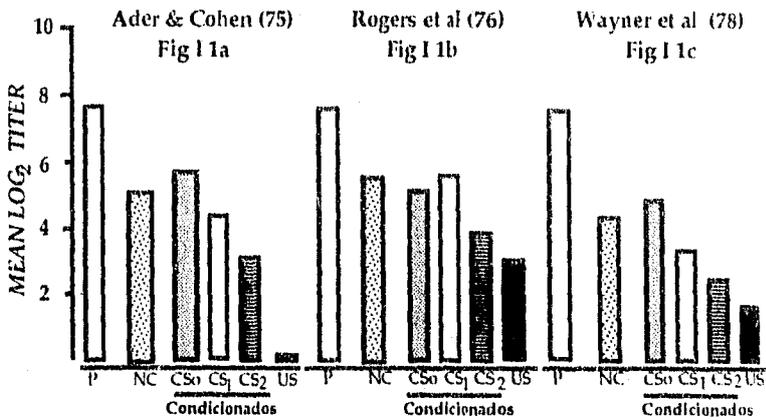
Basándose en estas observaciones, Ader propuso que el apareamiento de un estímulo gustativo con una droga inmunosupresora resultaría en una inmunosupresión condicionamiento. La mortandad entonces, sería el resultado de la exposición repetida al estímulo condicionado, el cual, al producir un efecto negativo sobre el sistema inmune, permitiría que los animales fueran más susceptibles al ataque de agentes patógenos.

Estas especulaciones fueron probadas con experimentos controlados, para discernir el verdadero carácter de éste fenómeno. En 1975, Ader y Cohen utilizaron ratas Wistar separadas individualmente a las que se mantenía con restricción de agua, permitiéndoles beber durante un período de 15 min una vez al día, esto durante 5 días para obtener un nivel basal de consumo de agua. Después de los 5 días de medición del consumo de agua, a tres grupos de ratas (CS1, CS2 y CS0) se les condicionó, por medio de la presentación durante 15 min, de sacarina sódica al 0.1% en su bebedero, apareada con una inyección ip de una solución de 50 mg/kg de ciclofosfamida. Otro grupo de animales, denominado no condicionado (NC) se le presentó agua apareada con ciclofosfamida (en trabajos posteriores este grupo recibió apareamientos de sacarina y ciclofosfamida de manera no contingente, observándose un efecto similar). Finalmente se utilizó un grupo control denominado placebo (P), al cual se le apareó la presentación de sacarina con solución salina isotónica.

Tres días después del condicionamiento, todos los animales fueron inmunizados con eritrocitos de carnero y 30 min después de la inmunización los grupos de animales condicionados, el grupo NC y el grupo P fueron expuestos a la sacarina (excepto el CS0), uno de los subgrupos CS recibió otra exposición a la sacarina 3 días después de la inmunización (CS2), el otro solo fué expuesto una vez (CS1), mientras al tercero (CS0) se le presentó solamente agua. Los grupos NC y CS0 sirvieron como controles del condicionamiento. El grupo P representó a la respuesta inmune normal. Cabe mencionar que también se utilizó un grupo para evaluar el efecto incondicionado (US) de la ciclofosfamida, el cual recibió el mismo tratamiento que los grupos condicionados, pero el día de la reexposición a la sacarina fué reinyectado con ciclofosfamida. Seis días después de la inmunización se tomaron muestras de sangre de todos los animales, para medir, por medio de hemaglutinación, los títulos de anticuerpos de una respuesta inmune primaria.

Las ratas condicionadas reexpuestas a la sacarina presentaron una reducción significativa de su consumo de agua con sacarina, en comparación a los animales P y a aquellos a los que se les presentó agua sola en lugar de la solución con sacarina

(Fig 1 1a). Los animales del grupo P como se esperaba, presentaron una respuesta inmune normal. La respuesta inmune de los animales NC y los del grupo CS0 era semejante, pero un poco más baja que la de los controles. Los grupos CS1 y CS2 presentaron una clara inmunosupresión cuya magnitud dependía del número de reexposiciones a la sacarina. Ambos grupos presentaron diferencias significativas en comparación a los grupos CS0, NC y P. Estos resultados apoyaron la hipótesis de que el apareamiento de sacarina y ciclofosfamida produciría un condicionamiento inmunosupresor (CIS), demostrándose que el efecto del estímulo condicionado era un efecto real, en virtud de que los grupos inyectados con ciclofosfamida pero sin la presentación del estímulo condicionado, no presentaban la misma supresión que aquellos condicionados que fueron reexpuestos a la SAC.



Tomado de Ader & Cohen (1985) *The Behavioral and Brain Sciences* 8:3 pp 379-394

Fig 1 1. Se muestran los resultados obtenidos en el CIS por tres diferentes grupos de investigación. En el eje de las Y se muestran los títulos de anticuerpos contra eritrocitos de carnero a los seis días después de la inmunización y en el eje de las X los diferentes grupos. P=Placebo; NC=No condicionado o no contingente; CS0=Condicionado no reexpuesto; CS1=Condicionado reexpuesto en una ocasión; CS2=Condicionado reexpuesto en dos ocasiones; UCS=Incondicionado. Los títulos de anticuerpos están presentados en una escala logarítmica y en todos los casos se encontraron diferencias significativas entre los grupos condicionados y los controles ($p < 0.05$).

Un evidente defecto de los trabajos originales de Ader, es el tiempo que transcurre entre el apareamiento de sacarina-ciclofosfamida y la reexposición a la sacarina. El efecto inmunosupresor de la ciclofosfamida dura aproximadamente 10 días y por lo tanto el efecto que ellos observan está contaminado por la supresión inducida por este fármaco. Sin embargo cabe resaltar que las diferencias que se observan entre el grupo CS0 y los CS1 y CS2, implica la existencia de un efecto inmunosupresor evocado por la reexposición al estímulo condicionado y por lo tanto se puede hablar de una inmunosupresión condicionada.

Estos trabajos fueron replicados más tarde por otros dos grupos de investigadores (Rogers, Reich, Strom, & Carpenter, 1976; Wayner, Flannery, & Singer, 1978) quienes encontraron efectos semejantes (Fig I 1b y 1c) a los observados por Ader y Cohen en 1975. Además, estos otros grupos de investigación utilizaron períodos más largos entre la adquisición y la reexposición. El fenómeno de CIS se convirtió entonces en una importante línea de investigación que como Ader y Cohen, muchos otros investigadores siguieron. De esta manera se encontraron evidencias de que éste mismo procedimiento de condicionamiento, produce efectos supresores de la actividad de células NK (O'Reilly & Exon, 1986); disminuye la proliferación de linfocitos ante la estimulación con un mitógeno (Neveu, Dantzer, & LeMoal, 1986); decremента el número de células formadoras de plaquetas (Bovbjerg, Kim, Siskind, & Weksler, 1987b); inhibe las respuestas de hipersensibilidad de tipo retardada (Bovbjerg, Cohen, & Ader, 1987a); decremента la proliferación de linfocitos (Neveu et al., 1986); la actividad de células NK se disminuye (O'Reilly & Exon, 1986) y se ha observado que se inhibe la producción de IgM (Kusnecov, Husband, & King, 1988).

La crítica principal a la que se enfrentaron los trabajos con inmunosupresión condicionada fué que su asociación con el condicionamiento aversivo a los sabores hacia pensar que se podía tratar de un condicionamiento en donde el estrés estaría mediando el efecto inmunosupresor. Kelley y Dantzer (1986) argumentaban que "el conflicto que experimentan los animales entre beber una solución aversiva o no beber en lo absoluto, les produce un estado estresante que es capaz de incrementar los niveles de corticoesteroides, causando así una inmunosupresión mediada por estrés. Este problema pudo ser resuelto tempranamente (Ader, Cohen, & Bovbjerg, 1982) utilizando un sistema de exposición a dos bebederos, en el cual a las ratas se les presentaba en un bebedero una solución con sacarina y en el otro agua (cuando la sacarina había sido previamente apareada con ciclofosfamida). 15 minutos después de haber elegido una solución que beber, se les forzaba a consumir 5ml de sacarina por medio de una jeringa. Con este procedimiento pudieron obtener el condicionamiento inmunosupresor de la misma manera que con el sistema de un bebedero. Adicionalmente, el grupo de Ader (Ader & Cohen, 1985) había ya realizado experimentos con el afán de observar si los corticoesteroides estaban involucrados en el CIS. Apareando sacarina con LiCl se observaba un incremento en la concentración de corticoesteroides en plasma, durante la adquisición y la prueba, sin embargo la reexposición a la sacarina no producía efecto alguno en la respuesta inmune. Además el incremento en la concentración de corticoesteroides si bien se producía ante la administración del cloruro de litio, también se observaba

cuando se presentaba un estímulo novedoso no condicionado, probablemente debido a una reacción de estrés evocada por el sabor novedoso. Roudelush y Bryant (1991) encontraron que el efecto inmunosupresor producido por el condicionamiento, no está asociado a un incremento en la concentración de corticosteroides. Además se ha visto que la aversión al sabor, no correlaciona con la magnitud del efecto inmunosupresor del condicionamiento (Ader & Cohen, 1985).

En otros experimentos se ha demostrado que con el uso de pequeñas dosis de ciclosporina A apareada en repetidas ocasiones con sacarina, no se obtiene aversión al sabor pero sí un condicionamiento inmunosupresor (Klosterhalfen & Klosterhalfen, 1990). También con el uso de suero antilinfocitos como estímulo incondicionado apareado con sacarina, se ha podido obtener un condicionamiento inmunosupresor sin condicionamiento aversivo a los sabores (King, Husband, & Kusnekov, 1987; Kusnekov, Sivyer, King, Husband, Cripps, & Clancy, 1983). Con estos experimentos se pudo disociar al fin el condicionamiento aversivo a los sabores de la inmunosupresión condicionada, por lo cual se puede hablar del condicionamiento inmunosupresor como un condicionamiento por sí mismo. Siguiendo esta línea de investigaciones, se realizaron experimentos con el fin de determinar si la adición de un estímulo productor de irritación gástrica en la adquisición del condicionamiento inmunosupresor obtenido con el apareamiento de sacarina y suero antilinfocitos permitía que este se expresaba de manera más robusta (Gauci, Bull, Schedlowski, Husband, & King, 1991). Encontraron que los animales a los que se les había apareado la sacarina con el suero antilinfocitos junto con LiCl no presentaron una respuesta condicionada tan fuerte como los animales a los que solo se les apareó la sacarina y el suero.

La utilidad clínica del condicionamiento de la respuesta inmune se ha demostrado en experimentos en los que el CIS decreta la tasa de mortandad en animales con enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso (Ader & Cohen, 1982) y así mismo, se ha visto que el CIS disminuye la probabilidad de rechazo a transplantes (Grochowicz, Schedlowski, Husband, King, Hibber, & Bowen, 1991).

El condicionamiento inmunosupresor, originalmente descrito por Ader y Cohen, surgió de un paradigma de CAS, el cual como ya se mencionó, tiene una expresión fuerte y de larga duración, de la misma forma, el CIS tiene una expresión robusta y puede perdurar por meses aún cuando se haya obtenido con un solo ensayo de apareamiento, en contraste, en los experimentos realizados por

Metal'nikov y Chorine, encuentran una respuesta condicionada débil y transitoria, producto de un gran número de apareamientos. Esto probablemente se pueda explicar con el sistema de los reflejos defensivos descrito por John García. En este contexto, el CIS se estaría dando como una asociación dentro del sistema de defensa visceral. Esto implicaría que los estímulos olfativos y gustativos tendrían mayor posibilidad de ser asociados con la respuesta inmune que los estímulos visuales o somatosensoriales, con lo cual se explica el porqué los intentos rusos no tuvieron el éxito esperado. El modelo de García no implica que sea imposible desarrollar condicionamientos con estímulos poco afines, pero sí, que existen reflejos condicionados más naturales, o mejor dicho que forman parte de los procesos evolutivos de los organismos, por su parte, algunos reflejos condicionados son difíciles de obtener debido a que el organismo no cuenta con sistemas neurales predeterminados para ello, lo que implica que el organismo tiene que implementar nuevas estrategias de plasticidad neural que son costosas en términos temporales y energéticos. Así mismo, existen sistemas neurales que facilitan la adquisición del aprendizaje, en virtud de que las nuevas conductas aprendidas son indispensables para la efectiva adaptación del organismo al medio, por ejemplo, el sistema neural que subyace al CAS y que probablemente también este mediando el CIS, es necesario para que el organismo adquiera un aprendizaje que le permitirá hacer una selección adecuada de los alimentos que puede consumir.

Al conocer la existencia de relaciones anatómicas y funcionales entre el sistema nervioso y el sistema inmune podemos reconocer la existencia de sistemas de interacción que propicien el fenómeno de condicionamiento de la respuesta inmune. Sin embargo poco se ha estudiado acerca de los mecanismos de interacción entre ambos sistemas que nos permita entender como y de que manera se da el CIS.

Para poder acceder al estudio de los mecanismos involucrados en el condicionamiento, se debe primero de iniciar con algún tipo de datos capaces de dirigir nuestra línea de investigación. De esta manera el interés ha sido empezar por estudiar el papel de estructuras neurales en el condicionamiento inmunosupresor, partiendo de los datos que se tienen acerca de las estructuras involucradas en el CAS y en los sistemas de modulación neural de la respuesta inmune.

Corteza Insular

En el caso del CAS, durante los últimos años, se ha ido describiendo el sustrato neural de este paradigma (Barker, Best, & Donjan, 1977; Donjan, 1980). En

1972 se reportó que una región cortical conocida en ese entonces como corteza gustativa, participaba en el CAS (Brawn, Slick, & Lorden, 1972), dado que lesiones de dicha región producían considerables déficits en el aprendizaje.

La corteza insular (CI) es una región que en la rata ocupa aproximadamente 1×3 mm de área y se encuentra localizada en la confluencia de la arteria cerebral media y el surco rinal en la rata, lo que representa las áreas 13 y 14 de Krieg. En un principio se consideró a esta corteza como la corteza gustativa primaria, basándose en sus relaciones anatómicas con los núcleos ventrobasales del tálamo (Frommer, 1961), lo cual coincidía con el criterio anatómico de una corteza sensorial.

En 1975 Brawn y Kiefer, interesados en determinar si la CI realmente estaba involucrada en la percepción de los sabores, realizaron lesiones de la CI y midieron el consumo de diferentes concentraciones de quinina, salina y sacarosa, encontrando que las ratas con ablaciones de esta corteza, consumían diferentes cantidades de las diversas concentraciones de las soluciones antes mencionadas, al igual que los animales intactos (Fig 12), observando sólo un pequeño incremento del consumo en la parte media del gradiente de concentración, lo cual sugiere que la CI no es importante para la percepción y discriminación de los sabores.

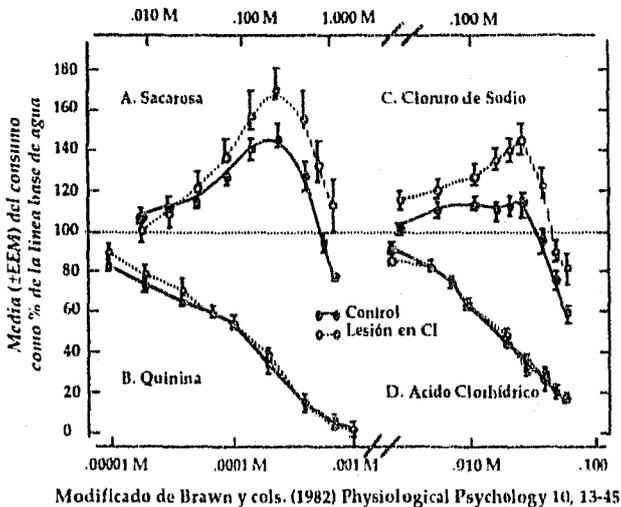


Fig 12. Se muestra la media (\pm EEM) del consumo (eje y) de soluciones a diferentes concentraciones (eje x) de sacarosa, cloruro de sodio, quinina y ácido clorhídrico en ratas con lesión en corteza insular y en animales intactos. La línea punteada en el 100% de el eje de las ordenadas representa el consumo basal de agua.

Por lo anterior se propuso que la CI estaba involucrada en los procesos cognoscitivos relacionados a estímulos gustativos más que en los procesos perceptuales de dichos estímulos. Los autores (Brawn et al., 1982) mencionan que el efecto observado en los animales con lesión en corteza insular en donde se observa un pequeño desajuste de la curva de discriminación, es una pequeña alteración de la discriminación fina de los sabores, probablemente debido a que se ven afectados los aspectos cognoscitivos de la integración de estímulos gustativos.

La CI también se ha caracterizado por su importancia en la integración de estímulos viscerales. Esta región cortical presenta relaciones anatómico funcionales con el NTS (Van-der-Kooy, McGinty, Koda, Gerfen, & Bloom, 1982), el cual es un núcleo en donde converge gran cantidad de información visceral. De esta manera, se ha involucrado a la CI en la representación cortical de estímulos viscerales. Inclusive, algunos autores se han referido a la CI como corteza visceral (Kiefer, 1985; Lasiter, Glazman, & Mensah, 1982), atribuyéndole un importante papel en la integración de este tipo de estímulos (Bermúdez-Rattoni, Introini-Collison, & McGaugh, 1991).

El hecho de que la CI reciba información tanto de las vísceras como de las vías gustativas, hizo de ésta una región importante para la integración de los estímulos involucrados en el CAS, por lo cual se ha dejado de considerar a la CI como una corteza gustativa o visceral, o como una región involucrada en la percepción de dichas cualidades sensoriales y se ha comenzado a estudiar su papel en el aprendizaje.

De esta manera, se ha observado que las lesiones de CI tienen efectos sobre otros tipos de aprendizajes como la prevención pasiva (Bermúdez-Rattoni et al., 1991; Dunn & Everit, 1988) y el laberinto de agua de Morris (Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991). Ambos aprendizajes, al igual que el CAS, tienen en común que son aprendizajes motivados aversivamente; es decir implican la elaboración de un valor hedónico negativo de los estímulos condicionados y probablemente ocurren por medio de las relaciones de la CI con estructuras del sistema límbico, como la amígdala y el hipocampo, y con algunas del tallo cerebral.

Lo anterior apoya la idea de que la CI está involucrada en el aprendizaje o dicho de otra manera, en los aspectos asociativos del condicionamiento. Así entonces, la CI participaría en la integración de los estímulos involucrados en los aprendizajes aversivos, en especial de estímulos gustativos y viscerales, los cuales se requieren para la elaboración de un CAS. Además, las conexiones anatómicas de

la corteza insular con regiones como el núcleo parabraquial del puente y el NTS, así como la relación que guarda con estructuras del sistema límbico como la amígdala, hacen probable que participe también en el CIS el cual requiere de la integración de estímulos gustativos con información proveniente del sistema inmune. En este sentido, algunas evidencias indican que el sistema inmune a través de factores solubles como las interleucinas, puede informar al sistema nervioso acerca de los cambios que éste sufre, ya sea por medio de receptores en el sistema nervioso autónomo (Saito, Akiyoshi & Shimizu 1991) o a través de receptores en regiones del sistema límbico (Cunningham & Souza, 1993) como el hipocampo o la amígdala, con los cuales la CI tiene relaciones anatómicas y funcionales (Kiefer, 1985).

De lo anterior se desprenden dos trabajos, el primero diseñado para evaluar el papel de la corteza insular en el condicionamiento inmunosupresor descrito por Ader y Cohen (1975) en el que se aparean sacrina y cyclofosfamida, en virtud de que este modelo es el que mejor caracterizado está hasta el momento. El segundo trabajo pretende estudiar la participación de otra estructura relacionada a la corteza insular como es la amígdala y avanzar en la caracterización del papel de estas en el condicionamiento de la respuesta inmune.

Trabajo #1

Efecto de lesiones Excitotóxicas de la Corteza Insular en el Condicionamiento Inmunosupresor

Introducción:

De la revisión de la literatura se puede concluir lo siguiente: Existe evidencia de la relación entre la corteza insular y el condicionamiento aversivo a los sabores; de las relaciones anatómico-funcionales entre esta región cortical y estructuras involucradas en la neuroinmunomodulación. También hay evidencia de una posible relación entre el CAS y el CIS (ambos pueden ser concebidos como casos de condicionamiento interoceptivo). En este contexto, el propósito general del primer trabajo será determinar los sustratos neurales del condicionamiento de la respuesta inmune. Específicamente, el objetivo será evaluar los efectos que lesiones de la CI tienen en la adquisición de una tarea de CIS, como la descrita originalmente por Ader y Cohen (1975), quienes aparean sacarina y ciclofosfanida, debido a que este modelo de condicionamiento de la respuesta inmune es el más estudiado y del que más información se tiene. En el condicionamiento de la respuesta inmune, como se menciona en el capítulo V, el apareamiento contingente de sacarina y ciclofosfanida provoca que el estímulo gustativo por sí solo induzca una inmunosupresión condicionada. La manera de medir esta inmunosupresión, en general, es mediante la titulación de los anticuerpos presentes en el suero de los animales, y una de las técnicas más sencillas y mejor establecidas es la de hemaglutinación. Una vez establecido el fenómeno utilizando la misma técnica de titulación que Ader y Cohen, se utilizará la técnica de ELISA porque tiene mayor sensibilidad y puede arrojar datos en una escala intervalar y no ordinal como es el caso de la hemaglutinación directa.

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

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

La variable independiente es la lesión de la CI, la cual se realizará con infusiones bilaterales de N-metil-D-aspartato (NMDA) en la CI, con lo se obtienen lesiones en donde se afectan preferencialmente somas neurales, dejando las fibras de paso intactas. Esta técnica de lesión, permite además obtener lesiones más precisas y delimitadas por la cantidad de solución infundida, permitiendo resolver preguntas acerca de la participación de las células susceptibles a esta toxina, en el fenómeno a estudiar, dejando a un lado la discusión acerca de la participación de las fibras de paso.

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

Hipótesis:

Los mecanismos neurales necesarios para la adquisición del CIS se llevan a cabo en las células de la CI. Por ello, se requiere de la integridad de la CI para que el CIS pueda ser adquirido por el animal, lo que implica que las lesiones químicas de la corteza insular han de impedir la adquisición del CIS, observándose que 1) los animales con lesiones de la CI y los cuales hayan sido entrenados en el CIS por medio del apareamiento de sacarina y ciclofosfamida y en su momento reexpuestos al estímulo condicionado, presentarán títulos de anticuerpos en rangos normales y estadísticamente diferentes de los títulos de anticuerpos en animales condicionados intactos o con lesiones control, en estos últimos, los títulos de anticuerpos serán significativamente menores debido al efecto inmunosupresor condicionado, mientras que los títulos normales reflejaran ausencia de efecto condicionado.

Método

Sujetos:

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

Lesiones:

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

Condicionamiento:

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

Inmunización y Titulación de Anticuerpos:

Al quinto día de la segunda línea base y 30 minutos antes de la reexposición a la sacarina se inmunizó a todos los animales con eritrocitos de carnero (2ml/Kg de eritrocitos al 1% en solución salina fosfato .15M 7.4 pH) en la primera serie de experimentos y con lisozima de gallina (500µg/kg) en la segunda. Se tomaron muestras de sangre obtenidas por medio de un pequeño corte en la cola de la rata (Akana, Scribner, Bradbury, Strack, Walker y Dallman, 1992), a los 4 (muestra A), 8 (mB) y 12 (mC) días después de la inmunización, de aproximadamente 1.5 ml de sangre, cada una de estas muestras se dejó durante 4 hrs a 36 Cº para permitir la formación de un coágulo que facilitara la separación del suero. Después de esto, las muestras de sangre se centrifugaron a 3500 rpm para separar el suero con una pipeta calibrada en 100µl, obteniendo un volumen final de suero de aproximadamente 600µl por muestra.

Para hacer la determinación de los títulos de anticuerpos en el suero, se utilizó en la primera serie de experimentos la técnica de hemaglutinación directa, debido a que es una técnica fácil de instrumentar, regularmente usada en otros experimentos de condicionamiento inmunosupresor, y que está muy bien

establecida para determinar anticuerpos en suero (Gatermann, Meyer y Wanner, 1992). Se hicieron las adecuaciones correspondientes para el presente experimento, en donde se utilizaron los eritrocitos de carnero como antígeno y al suero de la rata como la fuente de anticuerpos. Inicialmente los sueros son calentados a 56° durante 15 min para eliminar el complemento y evitar así la lisis de los eritrocitos. Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos, en estos pozos se colocan 50µl de solución salina fosfato con gelatina al 0.1% (SSFcG), para así colocar 50µl del suero y hacer las diluciones para la determinación, de manera tal que el primer pozo estará a una dilución 1:2 y el último de 1:256. Si el título de la muestra no se determina con estas diluciones, se procede a realizar diluciones empezando con 1:10. Una vez efectuadas las diluciones se colocan 25µl de eritrocitos de carnero al 1% en SSFcG, dejándose agitar durante 30 min, al final de los cuales se refrigera para tomar las lecturas al día siguiente. Cuando se observa la aglutinación de los eritrocitos, se le denomina como positivo, y se cuantifica con respecto a la dilución en donde se encuentre el último título positivo, siendo este el título final de la muestra. Cabe señalar que todas las muestras se hacen por duplicado, y cuando se observan discrepancias entre una misma muestra se procede a repetir la prueba para dicha muestra.

En la segunda serie de experimentos se inmunizó a los animales con ovalbumina diluida (2mg/300µl) en solución salina (0.15M), y se inyectó intraperitonealmente 300µl de la solución a cada animal.

Para hacer la titulación de anticuerpos por medio de la técnica de ELISA, se fija el antígeno (Ovalbumina) a la placa diluyendo éste en amortiguador de carbonatos (10 mg/100ml, el amortiguador se prepara al 1% y se ajusta a pH 9.6), dejando 50 µl de la solución en cada pozo de las placas de ELISA de 96 pozos (Maxisor Nunc) durante toda la noche. Se quita la solución con el antígeno y se lava con PBS, después se colocan 100µl por pozo de la solución bloqueadora, la cual es leche descremada en PBS (al 5%) con Tween-20 (0.05%), dejándose agitar vigorosamente durante 2 minutos y después reposar durante 2 hrs a 37°C. Se lavan nuevamente las placas con PBS, asegurándose al final que la placa quede completamente seca. Se agregan 50µl del primer anticuerpo diluido en solución bloqueadora en una proporción 1:100, después de esto se incuba a 37° C durante dos horas.

Se agregan 50µl del segundo anticuerpo (IgG de carnero anti-IgM de rata) después de haber repetido el paso de lavado. El segundo anticuerpo se diluye (1:15000) en solución bloqueadora y se incuba a 37° C por dos horas. Para revelar,

se lava la placa y se agregan 50µl de solución reveladora (ABTS 50mg en 1ml de agua desionizada con ácido cítrico al 0.1M y 1µl de H₂O₂). La placa se incuba a 37°C por 10 minutos. Se lee con el espectrofotómetro a 540λ con 600λ de referencia.

Histología:

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

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

1ª Serie de Experimentos

Efecto de la lesión de Corteza Insular en la Inmunosupresión Condicionada Evaluación por medio de Hemaglutinación directa

Procedimiento:

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

Cuadro 1. Protocolo experimental de los tres experimentos. mL B = muestra de línea base, mA = muestra A, mB = muestra B, mC = muestra C. Lx = lesión; Sac = sacarina; Cy = ciclofosfámido; I = inmunización con eritrocitos de carnero, el signo + representa el apareamiento, mientras el - indica que se realizó el procedimiento el mismo día. El punto indica la aplicación del tratamiento.

Experimento 1	Días								
	0	3	12	16	20	35	39	43	47
Tratamiento	mLB	Lx	Sac+Cy	I - Sac	mA	mB	mC		
CS	•		•	•	•	•	•	•	•
CSo	•		•	•	•	•	•	•	•
CS-LxCI	•	•	•	•	•	•	•	•	•
CS-LxCP	•	•	•	•	•	•	•	•	•
CS-ShCI	•	•	•	•	•	•	•	•	•

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

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

Resultados:

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

grupos CS, CS-LxCP y CS-ShCl, lo cual implica en que las lesiones de la corteza parietal no tuvieron ningún efecto en la adquisición del CIS y que el efecto es causado exclusivamente por las lesiones inducidas por el NMDA en la CI.

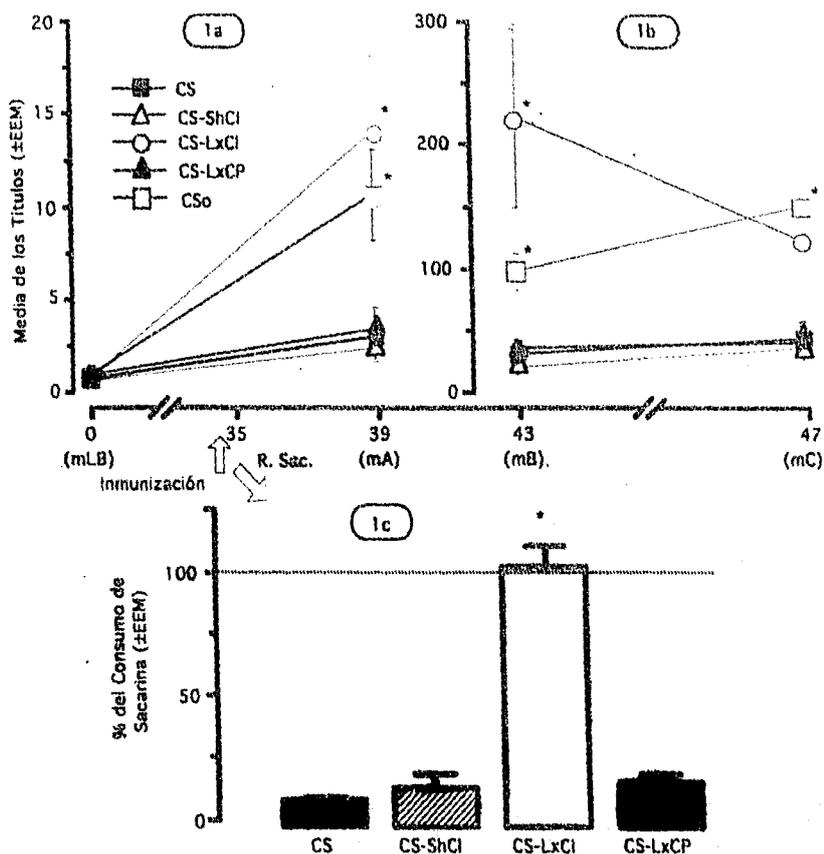


Figura 1. Se muestra el efecto de las lesiones de CI en la adquisición del CIS y CAS. En la Fig 1a se presentan los títulos de anticuerpos para eritrocitos de carnero (eje Y) durante las muestras (eje X) de línea base y la muestra A (4 días después de la inmunización). En la figura 1b se presentan los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

Para evaluar el CAS se tomó el porcentaje de consumo de sacarina con respecto al promedio de los últimos dos días de línea base (consumo de sacarina/el consumo promedio de 2 días de línea base \times 100). De tal manera que los datos

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

Efecto de la lesión de Corteza Insular en la Respuesta Inmune Normal

Procedimiento

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

Resultados:

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

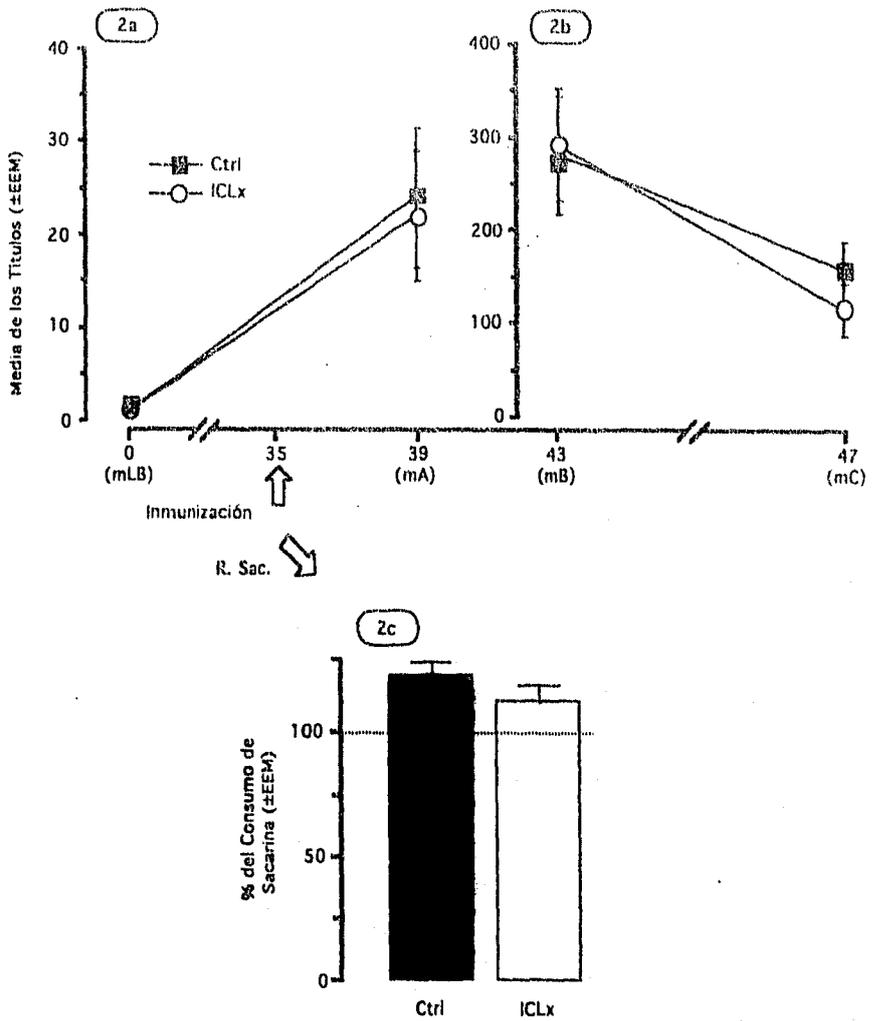


Figura 2. Resultados del segundo experimento. En la fig 2a y 2b se muestra el efecto de la lesión de Cl en la respuesta inmune normal de la rana. Títulos de anticuerpos (eje Y) para eritrocitos de carnero durante las muestras (ej X) de LB, muestra A (Fig 2a), B y C (Fig 2b). En la fig 2c se presenta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

Efecto de la lesión de Corteza Insular en la Inmunosupresión Causada por Ciclofosfamida

Procedimiento:

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

Resultados:

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

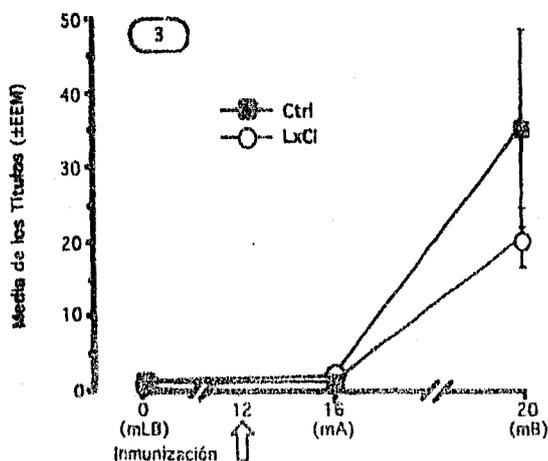


Figura 3. Efecto de la lesión de CI en la inmunosupresión causada por la ciclofosfamida. Se presentan los títulos de anticuerpos (eje Y) durante las 3 diferentes muestras: mLB, mA y mB, a los 8 días respectivamente, después de la inmunización e inyección de la ciclofosfamida (eje X). Note que la escala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

Resultados Histológicos:

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

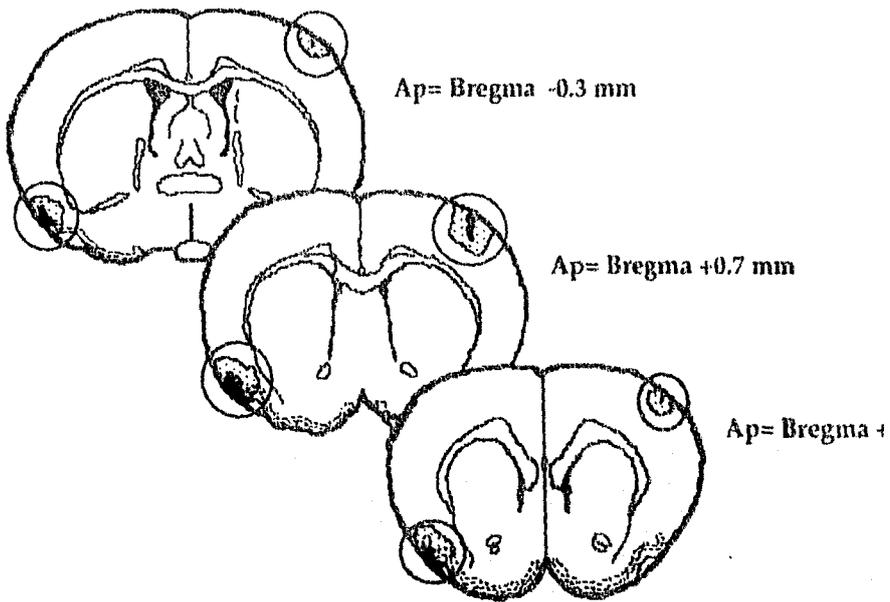


Figura 4. Representación esquemática de los cortes histológicos en donde las regiones pintadas marcan el área de la lesión más grande y las oscuras la lesión más pequeña, se esquematiza del lado izquierdo la lesión de la CI y del lado derecho la de corteza parietal.

2ª Serie de Experimentos

Efecto de la lesión de Corteza Insular en la Inmunosupresión Condicionada

Evaluación por ELISA

Para evaluar más detalladamente y para corroborar nuestros resultados, utilizamos la técnica de ELISA para medir la producción de IgM anti-ovalbumina (OVA) en animales condicionados. 46 ratas experimentalmente ingénuas fueron separadas y agrupadas en las mismas condiciones que en la primer serie de experimentos, todas las otras condiciones experimentales se mantuvieron idénticas a las de los anteriores (ver Cuadro 1).

Las condiciones de inmunización y titulación de anticuerpos se describen en detalle en la metodología general del trabajo.

Rersultados

Se puede observar en la figura 5, la producción de IgM anti-ovalbúmina en la muestra basal de sangre y en las tres muestras tomadas después de la inmunización. El análisis estadístico a través de ANOVA, mostró diferencias significativas entre grupos ($F(4, 38) = 44.87$ $p < 0.001$), indicando un efecto significativo del tratamiento. El análisis también arrojó diferencias estadísticas entre las diferentes muestras ($F(3,114) = 81.813$ $p < 0.001$), con interacción entre tratamiento y días ($F(12,114) = 17,45$ $p < 0.001$). En la muestra de línea base no se observaron diferencias estadísticas entre los grupos. Las diferencias entre grupos se presentaron en las muestras tomadas después de la inmunización; mA ($F(4,38) = 31.72$ $p < 0.001$), mB ($F(4,38) = 54.143$ $p < 0.001$) and mC ($F(4,38) = 7.204$ $p < 0.001$). El análisis post hoc de Sheffe mostró diferencias entre los grupos CS₀ y CS en las muestras A, B y C (p 's < 0.01), indicando que la baja producción de IgM en los grupos CS, LxCP y ShCI es un efecto de la reexposición al estímulo condicionado. los animales condicionados con lesión en corteza insular mostraron diferencias estadísticas al compararse con los grupos CS, ShCI y LxCP en las muestras A (p 's < 0.01), B (p 's < 0.01) y C (solo LxCI vs CS $p < 0.01$).

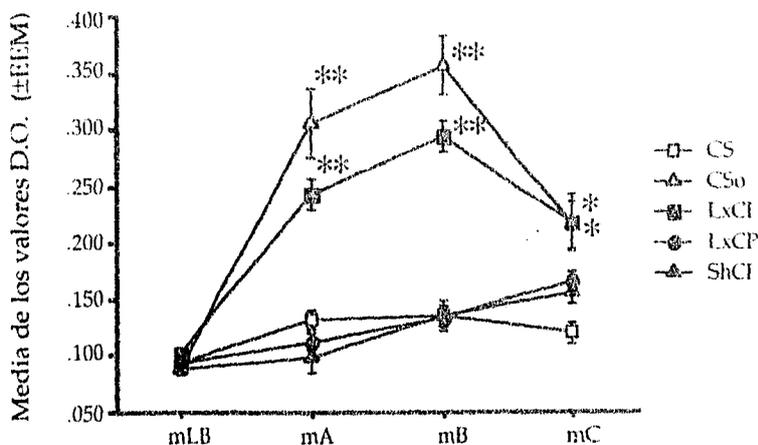


Figura 5. Se presentan los valores de densidad óptica de la ELISA que detecta IgM anti-OVA en animales condicionados con lesión y sin lesión, en la muestra basal y las muestras mA (4 días), mB (8 días) y mC (12 días) después de la inmunización. ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$

La aversión condicionada al sabor se presentó en los animales de los grupos LxCP, ShCI y CS, y fue afectada notablemente en los animales del grupo LxCI como se esperaba (Porcentaje de consumo de sacarina: CS Media=9.93 EEM=0.87; LxCI Media=114.17, EEM=8.57; LxCP Media=13.78, EEM=3.27; ShCI Media=17.15, EEM=3.78). Debe anotarse que los animales consumen aproximadamente entre 12 y 19 ml de agua en cada sesión de 10-min y que no se observan diferencias en el consumo entre los diferentes grupos. Además, el consumo de sacarina durante la adquisición no es diferente entre los animales lesionados y no lesionados, aunque con un pequeño pero no significativo incremento en los animales con lesión en la corteza inular.

En este experimento también se evaluó el efecto de la lesión en corteza inular en la producción normal de IgM (usando el mismo procedimiento descrito en la Cuadro 1) con 12 ratas Wistar Macho (Ctrl, n=6; LxCI, n=6). Los resultados mostraron que las lesiones de corteza inular no afectan la producción normal de IgM anti-OVA, como se observa en la figura 6. No se presentaron diferencias estadísticas entre los grupos en ninguna de las muestras. Sin embargo claramente la producción de IgM en estos grupos es mayor que la observada en los grupos condicionados, probablemente debido al uso de la ciclofosfamida en estos animales. Este efecto también se observó en la primera serie de experimentos (Ver Figuras 1 y 2).

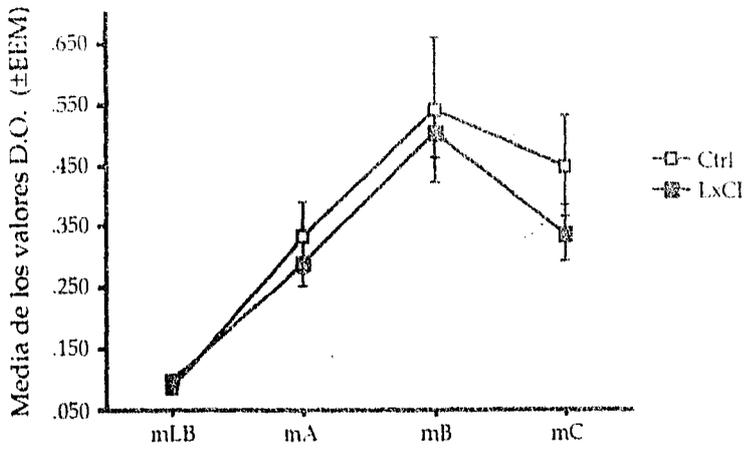


Figura 6. Se presentan los valores de densidad óptica de la ELISA que detecta IgM anti-OVA en animales condicionados con lesión y sin lesión, en la muestra basal y las muestras mA (4 días), mB (8 días) y mC (12 días) después de la inmunización. ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$

Trabajo #1
DISCUSION

El resultado principal de estos experimentos fue que las lesiones inducidas por NMDA en la CI pero no la corteza parietal, interrumpen la adquisición de la inmunosupresión condicionada. Consecuentemente, en el primer experimento vimos que los animales con lesiones CI condicionados, no mostraron el efecto del condicionamiento inmunosupresor como se indica con los títulos de menor hemaglutinación a SRBC. Un resultado similar se repitió en el segundo experimento utilizando un antígeno diferente y una metodología más precisa para detectar los anticuerpos. Asimismo, la respuesta inmune humoral normal no se ve afectada por las lesiones CI determinadas por la hemaglutinación y en la producción de IgM medida por ELISA. Además, la acción inmunosupresora de la ciclofosfamida no se ve afectada por las lesiones CI. Dicho efecto parece ser exclusivo para las lesiones CI, ya que las lesiones sham PC e CI no afectaron la inmunosupresión condicionada. El descubrimiento que los animales con lesiones del CI no adquieren la inmunosupresión condicionada ni el condicionamiento aversivo al sabor (aunque las lesiones CI no afecten la discriminación del sabor) parece indicar que la CI participa en la regulación del mecanismo asociativo del condicionamiento inmunosupresor, como se ha propuesto en el condicionamiento aversivo al sabor (García et al.,1985).

El condicionamiento de la respuesta inmune sugiere que el CNS debe recibir información sobre los cambios que ocurren en el estado inmune, y también que el sistema nervioso es capaz de ajustar la respuesta inmune. Se ha notado que la amígdala (así como otras áreas del cerebro) responde a cambios inmunes, y que puede tener un papel importante en modular la respuesta inmune (Galkina, Al'perina, Podgornaia & Devoino, 1990; Masek, Pterovicky & Seifert, 1992; Cunningham & Souza, 1993; Nistico, Caroleo, Arbitrio & Pulvirenti, 1994). La CI tiene relaciones anatómicas con estructuras límbicas, sobre todo con la amígdala (van der Kooy et al, 1984), la cual tiene proyecciones bidireccionales con la CI, observada anatómicamente y electrofisiológicamente (Lasiter, 1982; Pascoe & Kapp, 1987). Por lo tanto, es posible que la amígdala sea la puerta de entrada para la información inmune que la CI requiere para desarrollar el CIS. En experimentos para evaluar los efectos de las lesiones excitotóxicas de la amígdala y la CI sobre la adquisición del aprendizaje visceral, como el condicionamiento aversivo al sabor, se ha observado que las lesiones de la CI, pero no de la amígdala, interrumpen la adquisición del condicionamiento visceral (Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991; Dunn & Everitt, 1988). No obstante, no queda claro el papel de la amígdala en la

inmunosupresión condicionada, y existen experimentos actuales para tratar este asunto.

Se desconoce el sistema efector por medio del cual la CI podría modular respuestas inmunes; sin embargo, es posible que otorgue un poco de luz el estudio de la modulación inmune ejercido por el sistema nervioso autónomo. La CI está conectada directa y bidireccionalmente con el núcleo del tracto solitario (Cechetto & Chen, 1990; Norgren, 1978); dicho núcleo es la puerta de entrada de toda la información visceral y es un modulador crucial del sistema nervioso autónomo. El sistema nervioso autónomo es un camino importante por el cual el CNS modula las respuestas inmunes, ya que existe una inervación simpática directa del tejido linfóide (Felten, Felten, Carlson, Olschowka & Livnat, 1985; Reder, Karaszewsk & Arnason, 1989; Heilig, Irvin, Grewal & Sercarz, 1993). Estas relaciones anatómicas de la CI y su papel en el aprendizaje y la memoria de tareas motivadas aversivamente (Bermúdez-Rattoni et al, 1991; Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991) hacen de esta estructura un buen candidato para el control de los mecanismos neurales fundamentales de la asociación entre el estímulo gustativo y el efecto inmunosupresor de la ciclofosfamida.

Existen evidencias para sugerir que la neocorteza puede participar en la modulación de la inmunidad (Neveu, 1992; Watkins, 1994). Se ha reportado que las grandes lesiones neocorticales unilaterales del lóbulo frontoparietooccipital afectan varios parámetros de la respuesta inmune en sí de forma asimétrica (Neveu, 1988; Betancur, Neveu, Vitiello & Le Moal, 1991). Según nuestros resultados, las lesiones en la CI afectan la respuesta inmunosupresora en los animales condicionados, dejando sin cambio la respuesta humoral inmunológica no condicionada normal. Las lesiones realizadas en el trabajo de Neveu y colegas no incluyen la CI; por eso puede ser que dichos datos no se puedan generalizar a la CI, pero es importante analizar más el efecto de la CI en otros parámetros de la respuesta inmune normal y condicionada. No obstante, esto sugiere que en realidad la neocorteza puede ser un modulador importante del sistema inmune. Sin embargo, todavía hay que averiguar el papel preciso de la CI en la inmunosupresión condicionada. Sobre todo hay que investigar la naturaleza del estímulo no condicionado a fin de entender cómo responde el cerebro y cómo puede darse el mecanismo asociativo.

En conclusión, los resultados de los presentes experimentos indican que las lesiones NMDA de la CI interrumpen severamente la adquisición del CIS, lo cual sugiere que la integridad funcional de la CI es necesaria para la integración neural de los estímulos involucrados en el condicionamiento inmunosupresor.

Trabajo #2

Efecto de las lesiones de Corteza Insular y Amígdala en la Adquisición y Evocación del Condicionamiento Inmunosupresor

Con los trabajos previamente presentados, hemos podido demostrar que las lesiones excitotóxicas de la corteza insular impiden la adquisición del condicionamiento inmunosupresor, pero no afectan la respuesta inmune normal ni la inmunosupresión causada por la ciclofosfamida. El efecto disruptor se pudo evidenciar evaluando a animales inmunizados con eritrocitos de carnero y titulando los anticuerpos con hemaglutinación directa, al igual que en los trabajos originales de Ader y Cohen (1985). Así también, animales inmunizados con ovalbumina y evaluados mediante la titulación con una técnica de ELISA, nos permitieron replicar los resultados antes mencionados.

La única manera en que podemos evaluar un aprendizaje es por la expresión de la conducta que este ha modificado. Sin embargo, en psicología se han generado conceptos tales como adquisición, consolidación, almacenamiento y evocación, los cuales se refieren a partes de un continuo proceso de aprendizaje y memoria. En las neurociencias se pueden utilizar diferentes estrategias para diseccionar las diversas facetas de este fenómeno, una de ellas es con la modificación de los parámetros temporales en los que se efectúa la manipulación del sistema nervioso para observar un efecto en la expresión de la conducta modificada por el aprendizaje.

En el caso del CAS se ha visto que las lesiones de corteza insular efectuadas antes del ensayo de adquisición de la tarea, afectan la aversión condicionada. De la misma manera, al efectuar las lesiones después del ensayo de adquisición se observa que los animales no presentan el condicionamiento. Esto implica que la corteza es necesaria aún después de que el aprendizaje se ha dado y sugiere su participación en un proceso asociado a la evocación del aprendizaje.

Si bien los datos que hemos obtenido hasta ahora indican que la corteza insular participa en la adquisición del condicionamiento inmunosupresor, el papel que juega durante la expresión del condicionamiento se desconoce. Por lo tanto, es de nuestro interés evaluar el efecto de lesiones en corteza insular efectuadas después de la adquisición del condicionamiento inmunosupresor en la expresión del mismo. Con esto ampliaremos nuestros datos acerca de la participación de la corteza insular en la modulación de la inmunosupresión condicionada.

Para continuar analizando los aspectos anatómicos de la regulación del condicionamiento inmunosupresor, hemos de estudiar el papel que juegan otras estructuras nerviosas en este paradigma de modulación inmunológica. Es por eso que decidimos estudiar el papel de otra estructura relacionada a la corteza insular y escogimos a la amígdala, debido a que esta estructura nerviosa presenta conexiones bidireccionales con la corteza insular (Lasiter, 1982) y se ha implicado también en diferentes fenómenos de aprendizaje, principalmente, los que son motivados aversivamente (McGaugh, Cahill, Parent, Mesches, Coleman-Mesches, & Salinas, 1995).

La amígdala es una estructura considerada como parte del sistema límbico y la cual juega un papel esencial en muchos aspectos del procesamiento de información emocional. El papel de la amígdala en la regulación de las emociones ha sido ampliamente estudiado, sin embargo en las últimas décadas se ha encontrado que esta estructura es de gran importancia para los procesos de aprendizaje y la memoria, siendo ahora este problema el que más atención ha recibido. La evidencia que soporta este planteamiento, ha surgido de estudios en los que lesiones de la amígdala afectan diversos aspectos del aprendizaje y la memoria en animales y pacientes humanos (Sarter & Markowitsch, 1985). Existen también datos que aseguran que la amígdala es de especial importancia en la mediación de la memoria influida afectivamente (McGaugh, 1992). La evidencia de que lesiones de la amígdala afecta el aprendizaje y la memoria en animales entrenados en aprendizajes motivados tanto apetitiva como aversivamente, sugiere que la amígdala puede servir como vínculo entre los estímulos y sus consecuencias (Gaffan, 1992), y/o que la amígdala puede ser un sitio en donde suceden los cambios neurales que subyacen la memoria afectiva.

El papel de la amígdala en la regulación del condicionamiento aversivo a los sabores es un tema de controversia. Algunos autores han obtenido datos que sugieren la participación de esta estructura en la modulación de la aversión condicionada a los sabores (Lasiter & Glanzman, 1985). El grupo de Bures (Gallo, Roldán, & Bures, 1992) ha encontrado que la aplicación de tetrodotoxina (TTX) durante la adquisición del condicionamiento, produce un déficit importante en la expresión de éste, lo cual no sucede si se aplica la TTX antes de la adquisición. Otros grupos han encontrado que las lesiones con excitotoxinas, ya se NMDA o Kainato, no impiden la adquisición del CAS (Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991; Dunn & Everit, 1988), sin embargo, está bien establecido que las lesiones de amígdala afectan la potenciación al olor (Fenández-Ruiz, Miranda, Bermúdez-Rattoni, & Drucker-Colín, 1993), el cual es un aprendizaje que consiste en la

asociación de un olor y un sabor, subsecuentemente estos estímulos son apareados con LiCl, y se induce una aversión tanto al olor como al sabor.

Si bien la importancia de la amígdala radica principalmente en su papel en el aprendizaje y la memoria, datos recientes han apuntado que la amígdala puede ser una región que participa en los sistemas de interacción neuroinmune.

Se ha observado que la amígdala cambia su actividad eléctrica durante condiciones de reto antigénico y con el uso de inmunosupresores (Masek et al., 1992), también se ha observado que los cambios en el status inmunológico produce cambios en las concentraciones de metabolitos de catecolaminas (Galkina et al., 1990), lo cual sugiere que tanto su actividad eléctrica como metabólica se ve afectada en situaciones de reto inmunológico. En esta región, se expresan receptores para interleucinas, particularmente IL-1 (Cunningham & Souza, 1993). Así mismo, se ha sugerido que la amígdala regula procesos asociados a los efectos de la hormona liberadora de corticotropina sobre la actividad inmunitaria (Hauger, Irwin, Lorang, Aguilera, & Brown, 1993).

De esta manera, la pregunta que se ha planteado es si en la corteza insular se llevaban a cabo tanto la integración de los estímulos durante la adquisición como el reconocimiento del estímulo condicionado para evocar el efecto inmunosupresor producto del condicionamiento, además, los antecedentes que señalan a la amígdala como una importante estructura en la interacción neuroinmune y por que esta esta cercanamente relacionada a la corteza insular, permiten plantearnos la pregunta acerca del efecto que lesiones de amígdala tienen en el condicionamiento inmunosupresor. Es así que el siguiente trabajo tiene por objetivo estudiar el efecto de lesiones de corteza insular y amígdala efectuadas antes y después del entrenamiento sobre la adquisición y expresión del condicionamiento inmunosupresor.

Hipótesis

Dados los experimentos previos con lesiones de corteza insular en el condicionamiento de la respuesta inmune y antecedentes en los que se ha observado que las lesiones de corteza insular afectan la evocación del CAS, esperamos que las lesiones de esta estructura impidan tanto la adquisición como expresión del condicionamiento. De esta manera se podría pensar que la corteza insular participa también en los sistemas efectores de la respuesta inmune condicionada.

En el caso de las lesiones de amígdala, el panorama no es tan claro, sin embargo el hecho de que esta estructura responda ante cambios en el status inmunológico y de que exprese receptores para interleucinas hace pensar que al menos puede participar en la adquisición del condicionamiento inmune.

Método

Los sujetos, técnicas y procedimientos de condicionamiento fueron los mismos que se utilizaron en el trabajo #1, con la particularidad de que en este trabajo solo se utilizó la técnica de ELISA para medir la producción de anticuerpos. Cabe señalar que las coordenadas utilizadas para la lesión de la amígdala fueron las siguientes: AP -2.2, L \pm 4.5 y DV -8.0.

Procedimiento

Se separaron los animales en animales condicionados y animales no condicionados. Los animales condicionados presentan dos grupos de animales sin manipulación quirúrgica (Controles), uno de controles condicionados (CS n=9), a los cuales se les dió la adquisición del condicionamiento y se reexpuso al sabor de la sacarina; un grupo condicionado no reexpuesto (CSo n=10), al cual se le dió el apareamiento de los estímulos pero no fué reexpuesto a la sacarina, el cual es un control generalmente usado en experimentos en donde se pretende demostrar la presencia de un condicionamiento inmune. Los grupos experimentales en los animales condicionados se dividen en dos grupos (Ver Cuadro 2), uno con lesiones previas al entrenamiento (*Adquisición*) y otro con lesiones posteriores al entrenamiento (*Evocación*), cada uno contiene animales con lesión en corteza insular (LxCI, adq n=8; evoc n=6), animales con lesión en amígdala (LxAm, adq n=8; evoc n=8) y sus respectivos controles con lesión fantasma (ShCI, adq n=9; evoc n=7 y ShAm, adq n=6; evoc n=4), los cuales reciben una inyección bilateral de amortiguador fosfato al 0.1M el cual es el vehículo en el que se diluye el NMDA.

En el caso de los animales no condicionados (Controles de la respuesta inmune), estos tienen tres grupos, un control intacto (Ctrl, n=8), uno de lesión en corteza insular (Ctrl-LxCI, n=8) y otro de lesionados en amígdala (Ctrl-LxAm, n=8). Estos grupos se hicieron con el afán de determinar si las lesiones de amígdala o corteza insular afectaban la respuesta inmune normal.

Cuadro 2. En el Cuadro se muestra el orden cronológico de los tratamientos, mLB (sangrado de línea base), Lx (lesión en sea en corteza insular o amígdala), Sac+CY (condicionamiento), I (Inmunización), Sac (exposición a sacarina) y mA, mB y mC (las muestras a 4, 8 y 12 días después de la inmunización).

Días	0	3	16	24	37	41	45	49
Trat	mLB	Lx	Sac+Cy	Lx	I Sac	mA	mB	mC
Adq	x	x	x		x x	x	x	x
Evoc	x		x	x	x x	x	x	x
CS	x		x		x x	x	x	x
CSo	x		x		x	x	x	x
LxCtrl	x	x			x	x	x	x
Ctrl	x				x	x	x	x

Resultados

En el condicionamiento aversivo a los sabores, se puede observar (Fig 1) como los animales con lesiones de corteza insular consumen más sacarina que los animales controles y los animales con lesión fantasma, esto se observa tanto en animales con lesión previa a la adquisición ($F_{4,35} = 21.49$ $p < 0.01$) como en animales con la lesión efectuada posterior al entrenamiento ($F_{4,29} = 19.35$ $p < 0.01$). De esta manera los animales con lesión en corteza insular presentan un consumo de sacarina significativamente diferente de los controles (Adq $p < 0.01$ y Evoc $P < 0.01$) y sus respectivos sham (Adq $p < 0.01$ y Evoc $P < 0.01$). No existen diferencias estadísticas entre los animales lesionados antes del entrenamiento y los animales lesionados después, a pesar de que se observa un menor consumo de sacarina en los segundos, esto no representa aversión.

En el caso de los animales con lesión en la amígdala, estos presentan un consumo promedio de sacarina por debajo del 50% de su consumo basal de agua, al igual que sus respectivos sham. No existen diferencias estadísticas entre los animales con lesión en amígdala y los controles condicionados.

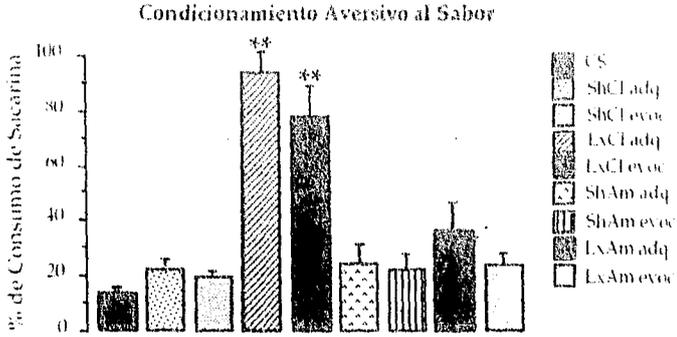


Fig 1 Se presentan los resultados del Condicionamiento Aversivo a los Sabores, representado por el porcentaje de consumo de sacarina con respecto a su línea base de agua, en animales con lesión excitotóxica (NMDA) o lesión fantasma (Buffer) en corteza insular y amígdala, antes (adq) y después (evoc) de la adquisición del condicionamiento. Los asteriscos representan $P < 0.01$.

Los resultados de las ELISAs, indican que los animales controles condicionados presentan un decremento en la producción de anticuerpos significativamente menor que los controles no condicionados. Así mismo se pueden observar diferencias estadísticas entre los animales de grupo CS y el grupo CSo, lo cual implica que el decremento en la producción de anticuerpos se debe a la reexposición a la sacarina una vez apareada con ciclofosfamida.

Los animales no condicionados con lesiones de amígdala y corteza insular presentan un nivel de producción de anticuerpos semejante al grupo control no condicionado. Entre estos grupos no se presentan diferencias estadísticamente significativas, sin embargo si se presentan diferencias estadísticas con el ANOVA de repetidas medidas ($F_{3,6} = 88.03$ $p < 0.01$) sin presentarse interacción (ver Figura 2).

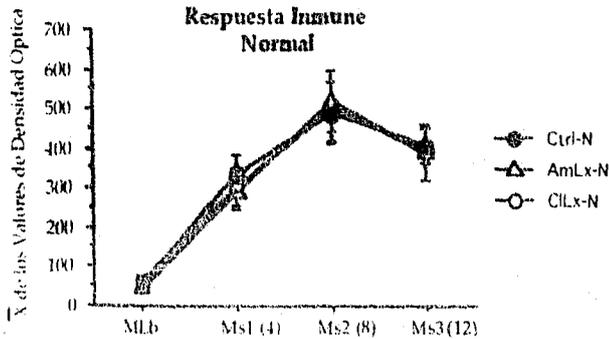


Fig 2. Se presentan los resultados de la ELISA para IgM anti-Ovalbumina en animales lesionados en corteza insular y amígdala, y controles intactos, no sometidos al procedimiento de condicionamiento.

En el grupo de animales condicionados, se observa un efecto estadísticamente significativo del tratamiento (lo que implica diferencias entre grupos) sobre la producción de IgM, durante las muestras de los días 4, 8 y 12 tanto en lesiones efectuadas antes (Adquisición: mA F 5,44 = 24.27 $p < 0.01$; mB F 5,44 = 49.87 $p < 0.01$; mC F 5,44 = 11.02 $p < 0.01$) como después del entrenamiento (Evocación: mA F 5,38 = 36.65 $p < 0.01$; mB F 5,38 = 42.79 $p < 0.01$; mC F 5,38 = 11.76 $p < 0.01$).

Con respecto a lesión de corteza insular efectuada en animales condicionados, se observa que estos presentan títulos de anticuerpos significativamente más altos que el grupo CS durante todas las muestras después de la inmunización, tanto en lesiones previas (Fig 3) como en las lesiones posteriores (Fig 4) a la adquisición (Adq: mA $p < 0.01$, mB $p < 0.01$; mC $p < 0.01$; Evoc: mA $p < 0.01$, mB $p < 0.01$; mC $p < 0.01$), así mismo, estos grupos presentan diferencias estadísticas con respecto a los animales con lesión fantasma en corteza insular (Adq: mA $p < 0.01$, mB $p < 0.01$; mC $p < 0.01$; Evoc: mA $p < 0.01$, mB $p < 0.01$; mC $p < 0.01$).

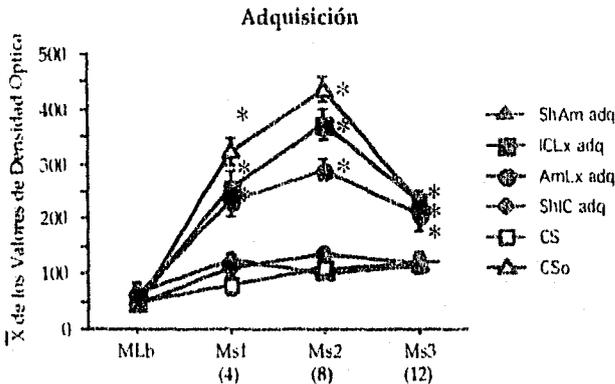


Fig 3.- Se presentan los resultados de la ELISA para IgM de los animales condicionados y con lesiones efectuadas antes de la adquisición del condicionamiento inmunosupresor. Los asteriscos representan diferencias con el control (CS) con una $P < 0.01$.

Los animales con lesión de amígdala efectuada antes de la adquisición, presentan títulos de anticuerpos significativamente mayores que los animales del grupo CS ($p < 0.01$) y que sus controles sham ($p < 0.01$), vease la figura 3. Sin embargo la lesión de amígdala efectuada después del entrenamiento, no presenta diferencias estadísticamente significativa con ninguno de los controles (ver figura 4).

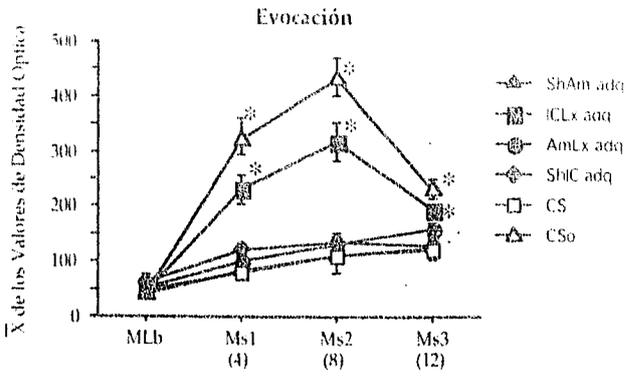


Fig 4- Se presentan los resultados de la ELISA para IgM de los animales condicionados y con lesiones efectuadas después de la adquisición del condicionamiento inmunosupresor. Los asteriscos representan diferencias con el control (CS) con una $P < 0.01$.

Trabajo #2

Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos en el CAS, se observó claramente que las lesiones de corteza insular afectan tanto la adquisición como la evocación del condicionamiento por su parte las lesiones de amígdala no afectan de manera alguna este aprendizaje. La anterior replica resultados obtenidos previamente (Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni, Ormsby, Escobar, & Hernández-Echeagaray, 1995), con lo que se corrobora la participación de la corteza insular en los procesos de adquisición y retención del la aversión condicionada al sabor.

En el caso de la amígdala, las lesiones parecen no afectar el condicionamiento, a pesar de que los animales con lesiones efectuadas antes de la adquisición presentan un consumo un poco mayor que los controles intactos, este resultado no es estadísticamente significativo. Lo anterior parece estar de acuerdo con algunos otros trabajos en los que se ha observado que las lesiones de amígdala no afectan al condicionamiento aversivo a los sabores (Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991; Dunn & Everit, 1988).

En los trabajos efectuados por el grupo de Bures (Gallo et al., 1992) en donde encuentran efectos sobre el CAS con el bloqueo de la amígdala a través del uso de TTX, la inhibición de la región la hacen minutos después de la presentación de la sacarina y previo a la presentación de LiCl. Los autores discuten el hecho de que la inactivación de la amígdala produce un efecto sobre el CAS menos evidente que la inactivación de la corteza insular, sin embargo se plantea la controversia de si la amígdala participa o no en el CAS. De hecho para Yamamoto (Yamamoto, 1993), la amígdala es más importante en la adquisición del CAS que la propia corteza insular.

Es probable que los efectos de las lesiones de la amígdala sobre el CAS sean dependientes del tiempo, por ejemplo, las lesiones efectuadas cerca del momento de la adquisición tienen efectos sobre el CAS debido a que se están denervando las fibras amígdalo corticales que pueden causar una alteración en la corteza insular que explique dicho efecto, mientras que cuando se efectúa la lesión de la amígdala varios días antes o después de la adquisición, pueden ocurrir mecanismos compensatorios que permiten restablecer la actividad normal de la corteza insular, lo cual da lugar a una adecuada adquisición y expresión de la tarea de aversión.

Los datos obtenidos en la medición de anticuerpos, demuestran en primer lugar la presencia de un efecto inmunosupresor condicionado en virtud de que los animales del grupo CS presentan diferencias estadísticas con los animales del grupo CS0. Este efecto condicionado no se presenta en animales con lesión en amígdala y en corteza insular cuando esta ha sido efectuada antes de la adquisición del entrenamiento, ya que los títulos de anticuerpos en los animales de los grupos LxAm y LxCI, presentan diferencias estadísticas con el grupo CS, durante todas las muestras de sangre. En contraste, cuando la lesión es efectuada después del entrenamiento, solo los animales con lesión en corteza insular presentan títulos de anticuerpos significativamente más altos que los animales del grupo CS durante todas las muestras, lo que implica que solo los animales con lesión insular pierden la expresión del condicionamiento inmunosupresor cuando la lesión es efectuada una vez dada la sesión de adquisición.

Cabe señalar que el hecho de que ninguna de las lesiones haya tenido efecto sobre la respuesta inmune normal, implica que los efectos observados en el condicionamiento se deben a efectos específicos sobre el sistema que controla este fenómeno.

Lo anterior permite plantear que las lesiones de corteza insular afectan el condicionamiento inmunosupresor, tanto al efectuarse antes del apareamiento de estímulos como después, a diferencia de las lesiones de amígdala, las cuales solo afectan el condicionamiento cuando se efectúan antes de la adquisición. De esta manera, es posible que la corteza insular esté involucrada en los procesos relacionados con la adquisición y evocación del condicionamiento, mientras que la amígdala es posible que solo participe en la adquisición de este aprendizaje.

Con estos datos se refuerza la idea de que la corteza insular participa activamente en los mecanismos neurales relacionados con el control conductual de la respuesta inmune, permitiendo que el animal elabore un proceso asociativo tal que le permita adquirir un condicionamiento inmunosupresor, además se añade la idea de que la corteza insular este participando probablemente en los procesos neurales que permiten la expresión de este aprendizaje.

En el caso de la amígdala, su participación se limita a los procesos asociativos que permiten que el animal adquiera un nuevo condicionamiento, pero después de que el animal ha aprendido la amígdala ya no es indispensable.

Estos datos difieren de los obtenidos en el condicionamiento aversivo a los sabores. En el caso del CAS, las lesiones de amígdala no producen efecto alguno, mientras que en el condicionamiento inmunosupresor, las lesiones de amígdala impiden su adquisición. Esto puede fortalecer en cierta forma la participación de la amígdala en el condicionamiento inmunosupresor, debido a que esta estructura parece no interferir con aspectos de la representación sensorial de estímulos gustativos, lo cual sigue siendo asunto de controversia en el caso de la corteza insular. Sin embargo, dado que la participación de la amígdala se limita a la adquisición, y en vista de que se ha reportado que esta estructura puede responder ante cambios en el estatus inmunológico, es posible que esté funcionando como una estructura sensorial cuyo papel en el condicionamiento inmune es recibir la información acerca del estado del sistema inmunológico para poderla asociar con el estímulo gustativo.

De esta manera, en próximas investigaciones, será importante esclarecer con detalle el papel que juega la amígdala en el condicionamiento inmunosupresor, buscando esclarecer si su papel es sensorial (recepción de la información inmunitaria) o bien, si es el sitio en donde se lleva a cabo la integración de los estímulos para permitir su asociación y así dar lugar al condicionamiento.

En este sentido, es probable que la estructura más importante para la integración de los estímulos sea la corteza insular, ya que para que se de la evocación del aprendizaje, el animal debe reconocer al estímulo condicionado asociado al estímulo incondicionado, lo que implica una integración de estos. Probablemente el único papel sensorial que lleve a cabo la corteza insular, sea el de reconocer estímulos relacionados a otros o bien a una experiencia como lo es el caso del CAS. Si bien es cierto que la corteza insular tiene células que reciben aferencias gustativas, también recibe aferencias viscerales, lo cual hace posible pensar que se trata de una corteza capaz de integrar este tipo de estímulos. Otro argumento que sugiere que la corteza está más involucrada en procesos asociativos que en procesos sensoriales, es el hecho de que las lesiones de esta estructura no afectan la discriminación de los sabores, pero sí la ejecución en diversos aprendizajes como es el laberinto de agua y la prevención pasiva.

La corteza insular podría ser la responsable de otorgar un componente hedónico a los estímulos gustativos y probablemente a otros, para permitir tanto la asociación con otros estímulos para permitir el aprendizaje. En el caso de que la corteza insular falte después de que ha sido adquirido el aprendizaje, al volver a

Estos datos difieren de los obtenidos en el condicionamiento aversivo a los sabores. En el caso del CAS, las lesiones de amígdala no producen efecto alguno, mientras que en el condicionamiento inmunosupresor, las lesiones de amígdala impiden su adquisición. Esto puede fortalecer en cierta forma la participación de la amígdala en el condicionamiento inmunosupresor, debido a que ésta estructura parece no interferir con aspectos de la representación sensorial de estímulos gustativos, lo cual sigue siendo asunto de controversia en el caso de la corteza insular. Sin embargo, dado que la participación de la amígdala se limita a la adquisición, y en vista de que se ha reportado que esta estructura puede responder ante cambios en el estatus inmunológico, es posible que esté funcionando como una estructura sensorial cuyo papel en el condicionamiento inmune es recibir la información acerca del estado del sistema inmunológico para poderla asociar con el estímulo gustativo.

De esta manera, en próximas investigaciones, será importante esclarecer con detalle el papel que juega la amígdala en el condicionamiento inmunosupresor, buscando esclarecer si su papel es sensorial (recepción de la información inmunitaria) o bien, si es el sitio en donde se lleva a cabo la integración de los estímulos para permitir su asociación y así dar lugar al condicionamiento.

En este sentido, es probable que la estructura más importante para la integración de los estímulos sea la corteza insular, ya que para que se de la evocación del aprendizaje, el animal debe reconocer al estímulo condicionado asociado al estímulo incondicionado, lo que implica una integración de estos. Probablemente el único papel sensorial que lleve a cabo la corteza insular, sea el de reconocer estímulos relacionados a otros o bien a una experiencia como lo es el caso del CAS. Si bien es cierto que la corteza insular tiene células que reciben aferencias gustativas, también recibe aferencias viscerales, lo cual hace posible pensar que se trata de una corteza capaz de integrar este tipo de estímulos. Otro argumento que sugiere que la corteza está más involucrada en procesos asociativos que en procesos sensoriales, es el hecho de que las lesiones de esta estructura no afectan la discriminación de los sabores, pero sí la ejecución en diversos aprendizajes como es el laberinto de agua y la prevención pasiva.

La corteza insular podría ser la responsable de otorgar un componente hedónico a los estímulos gustativos y probablemente a otros, para permitir tanto la asociación con otros estímulos para permitir el aprendizaje. En el caso de que la corteza insular falte después de que ha sido adquirido el aprendizaje, al volver a

exponer al animal al estímulo, este no le otorgará el valor edónico apropiado para que se de la respuesta condicionada.

De ésta manera se piensa que la corteza insular no esta funcionando como una región en donde se almacene la información gustativa, sino como una región que le da a los estímulos la característica edónica (negativa) que les permite formar parte de un condicionamiento. Congruente con esta idea, están datos obtenidos en el laboratorio, en donde se a observado que trasplantes de corteza insular en un huesped cuya corteza insular se encuentra lesionada, permite que los animales evoquen un condicionamiento adquirido antes de la lesión (Bermúdez-Rattoni et al., 1995). Además se ha observado que las lesiones de corteza insular afectan aprendizajes motivados aversivamente pero no aprendizajes motivados con reforzamiento.

En conclusión, los datos aqui presentados, muestran como lesiones de corteza insular y amígdala afectan la adquisición del condicionamiento inmunosupresor, mientras que solo las lesiones de corteza insular afectan los procesos de evocación que permiten la expresión del condicionamiento. Lo anterior reitera lo observado previamente, respecto a la participación de la corteza insular en el condicionamiento inunosupresor, y va más alla, agregando el dato que sugiere la participación de la amígdala en la adquisición de este condicionamiento. Lo anterior implica que la mediación del condicionamiento inmunosupresor se da por la mediación de mecanismos centrales que podrán ser caracterizados con futuras investigaciones.

Conclusiones Generales

El conocimiento que tenemos ahora sobre las relaciones funcionales entre el sistema nervioso y el sistema inmune, nos permiten reconocer la existencia de sistemas de interacción cuya actividad permite la modulación funcional de ambos sistemas. Al reconocer esto, no resulta tan sorprendente el hecho de que la respuesta inmune pueda ser condicionada a través de un modelo de condicionamiento clásico.

Sin embargo, cuando queremos explicar los mecanismos que intervienen en la generación de un condicionamiento clásico, tenemos que conocer, en primer lugar, la forma en como son procesados los estímulos involucrados en el condicionamiento, lo que implica conocer las vías de entrada de la información y las estructuras que la procesan, así mismo hemos de conocer el sistema involucrado en la integración de los estímulos que da lugar a la asociación y por ende al fenómeno de condicionamiento, finalmente sería necesario entender el sistema eferente que controla la respuesta de interés.

En este sentido, al pensar en explicar los sistemas asociados al condicionamiento inmunosupresor, podemos reconocer de inmediato la vía de acceso de la información gustativa al sistema nervioso central, la cual se constituye por un grupo de células receptoras, situadas en la lengua, que responden específicamente a diversos factores químicos. Las células gustativas están inervadas por fibras aferentes de los pares craneales VII, IX y X, las cuales envían sus fibras al NTS, y este haciendo relevo en los núcleos parabraquiales del puente envía sus fibras al tálamo ventromedial, de donde se manda información gustativa al giro postcentral en la corteza sensorial y a la corteza insular.

Por su parte, el agente inmunosupresor produce efectos letales sobre las células de proliferación rápida, de tal forma que una gran cantidad de células linfoides mueren, pero el problema radica en como es que dicho evento se transforma en información que acceda al sistema nervioso en forma de estímulo y como es que este estímulo es procesado. Hasta el momento esto no lo podemos responder con exactitud y sólo se tienen algunos datos que sugieren la existencia de un sistema aferente de información inmune. Existen células nerviosas que expresan receptores para interleucinas, las cuales pueden ser liberadas en forma importante durante eventos de muerte celular en poblaciones de células linfoides, suponemos entonces que las estructuras nerviosas con receptores a interleucinas serían

candidatos apropiados a llevar a cabo la función receptora ante el estímulo que traduciría el evento inmunosupresor en información inmune útil para el sistema nervioso. Como se mencionó en la introducción, una de las estructuras que expresa receptores para interleucinas es la amígdala, la cual presenta conexiones funcionales con la corteza insular.

El hecho de que las lesiones de amígdala hayan causado un efecto en la adquisición del condicionamiento inmunosupresor, hace pensar que pudiera ser ésta una estructura importante para explicar la vía de entrada de información inmune. Dado que las interleucinas presentan receptores en ésta y otras regiones de sistema nervioso, al ser liberadas como producto de la inmunosupresión, es posible que las interleucinas sean las señales que accesan al sistema nervioso formando así el estímulo incondicionado. Ahora que el problema del como se procesa dicha información puede ser difícil de resolver, pero pensamos que la amígdala podría ser el actor principal en este proceso. Existen datos acerca de los efectos de drogas inmunosupresoras y de procesos de reto inmunológico sobre la actividad metabólica y eléctrica de la amígdala (Galkina et al., 1990), lo que apoyan la idea de que la amígdala pudiera servir como una estructura relacionada con el sistema de procesamiento de información acerca del status inmunológico que el cerebro requiere para dar lugar al condicionamiento inmunosupresor, lo cual explicaría el porque las lesiones de amígdala afectan la adquisición y no la evocación, ya que la entrada de información del estímulo incondicionado no es necesaria para que se evoque la respuesta condicionada.

Dado que la amígdala envía fibras a la corteza insular y en virtud de que se le atribuye a esta corteza un importante papel en el aprendizaje, es posible que sea en la corteza insular en donde se llevan a cabo los procesos de asociación para dar lugar al condicionamiento inmunosupresor. Esto es apoyado en parte por los datos obtenidos en los experimentos antes mencionados, en los cuales las lesiones de corteza insular afectan tanto la adquisición como la evocación del condicionamiento inmunosupresor.

Cabe aclarar que la función primordial de la corteza insular debe estar en los procesos de asociación más que en el procesamiento de la información gustativa. Datos como los de Kifer (Kiefer, 1985) en los que las lesiones de corteza insular no afectan la discriminación de los sabores apuntan hacia esta idea, además, en el laboratorio se ha visto que el bloqueo colinérgico con el uso de anti-NGF, afecta la capacidad de adquirir un nuevo aprendizaje en las ratas pero no altera de forma alguna aprendizajes aprendidos previamente, lo cual implica que si bien las

lesiones de corteza insular alteran tanto la adquisición como la evocación, ambos procesos deben depender de sistemas independientes en los cuales, al menos en el aprendizaje, participa activamente la modulación colinérgica que ha de depender de estructuras como el núcleo basalis magnocelularis. Esto es claramente una evidencia de que al menos un sistema de modulación en la corteza insular está implicado exclusivamente en el aprendizaje y no en procesos perceptuales dado que si ese fuera el caso no podría darse la evocación de la nueva conducta.

Existen otras evidencias (Shimura, Suzuki, & Yamamoto, 1995) en las que se observa que la estimulación gustativa produce un incremento en la concentración de acetilcolina, pero cuando el estímulo gustativo fue previamente apareado con el cloruro de litio, esta concentración incrementa dramáticamente. Un efecto similar se ha observado en la actividad de proteínas cinasas (Rosenblum, Schul, Meiri, Hadari, Zick, & Dudai, 1995). Lo anterior implica que la parte importante de la representación gustativa está relacionada con la asociación entre el estímulo gustativo y el efecto gástrico, lo cual sigue fortaleciendo la idea de que esta corteza participa principalmente en procesos de asociación.

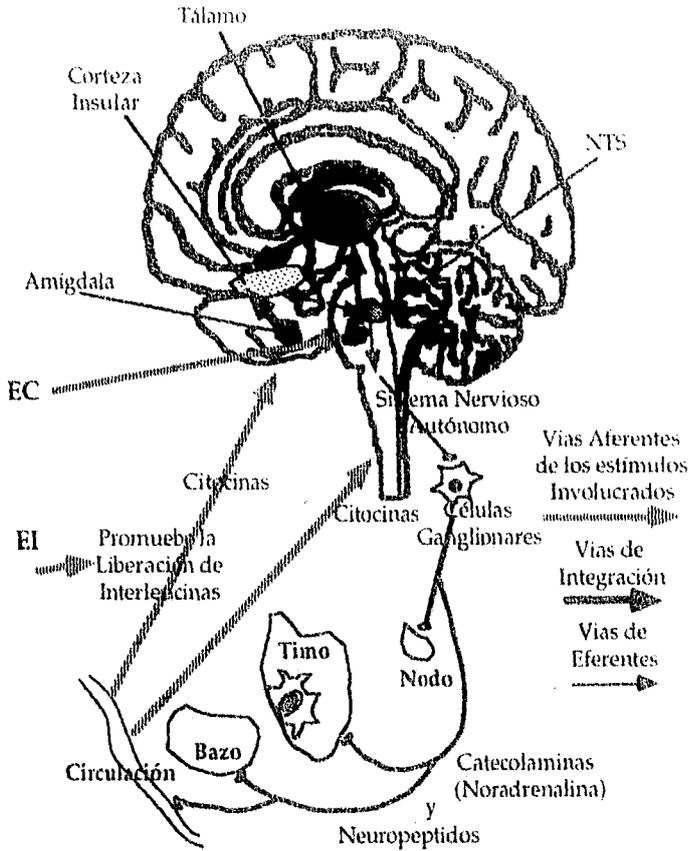
En cuanto al sistema eferente con el que se evoca la respuesta inmunosupresora condicionada, de acuerdo a los estudios anatómicos de la relación neuroinmune, se tienen dos posibles vías eferentes, una representada por el eje hipotálamo hipofisiario y otra representada por el sistema nervioso autónomo. Hasta el momento sólo existen datos que con un procedimiento de condicionamiento inmune asociado a estrés proponen que las catecolaminas podrían ser importantes factores efectores de la respuesta condicionada. Este dato no necesariamente apoya al sistema nervioso autónomo, ya que el hipotálamo por la influencia que ejerce sobre la glándula suprarrenal es capaz de controlar los niveles sanguíneos de adrenalina.

Sin embargo, parece que el hipotálamo ejerce un control tónico sobre la actividad inmunitaria, más que modular específicamente la dirección o potencia de la respuesta. Esta idea es apoyada por el control que ejerce el hipotálamo en los ciclos de secreción de los corticoesteroides y por la importancia de su papel en la homeóstasis del organismo, además, se ha visto que las lesiones del hipotálamo producen efectos en ocasiones reversibles sobre la actividad del sistema inmune. Esta reversibilidad de los efectos hace pensar en la existencia de otro sistema cuyo papel suena más importante en la regulación de la respuesta inmune.

El sistema nervioso autónomo podría ser el mejor candidato como sistema efector de la respuesta inmunosupresora condicionada, en virtud de la diversidad con la que es capaz de modular la respuesta inmune, dadas sus eferencias hacia tejido linfóide primario y secundario, y a la variedad de neurotransmisores y neuromoduladores con los que interactúa con las células del sistema inmune, la modulación ejercida por este sistema sobre la respuesta inmune puede ser una modulación fásica y mucho más precisa que la que puede ejercer la vía del eje hipotálamo hipofisario..

Como se mencionó anteriormente, la corteza insular presenta conexiones bidireccionales con el NTS, el cual es el principal sitio de integración de la información autonómica, esta conexión hace pensar que la corteza insular podría ser capaz de modular la actividad del sistema nervioso simpático y así esta vía moduladora del sistema inmunológico.

Existen datos que apoyan la idea de que el sistema nervioso autónomo pudiera ser el efector de la respuesta inmune condicionado (Luecken & Lysle, 1992). Con el uso de un condicionamiento inmunosupresor obtenido con un modelo de choques eléctricos, se observó que los bloqueadores β -adrenérgicos administrados en la sangre, impiden la expresión del condicionamiento inmunosupresor, sugiriendo que la vía simpática a través de la secreción de noradrenalina puede ser la responsable de ejercer el efecto inmunosupresor condicionado.



Esquema 4. Se presentan las principales estructuras nerviosas y los posibles sistemas de neuromodulación que posiblemente sean los responsables del control conductual de la respuesta inmune, así como también, los posibles mecanismos de retroalimentación que usa el sistema nervioso para permitir el condicionamiento inmune.

De esta manera se pueden esquematizar las posibles vías neuroanatómicas implicadas en los mecanismos que dan lugar al condicionamiento supresor de la respuesta inmune (Ver esquema 4). Si bien este esquema es en realidad un conjunto de incógnitas, es capaz de guiar las investigaciones futuras para esclarecer la naturaleza del condicionamiento, y también queda claro que existe la posibilidad de explicar la forma en como el sistema nervioso y el sistema inmune interactúan para permitir que la respuesta inmune sea otra respuesta sujeta al estricto control del sistema nervioso.

Referencias

- Ackerman, K. D., Bellinger, D. L., & Felten, S. Y. (1991). Ontogeny and senescence of noradrenergic innervation of the rodent thymus and spleen. In R. Ader, N. Cohen, & D. L. Felten (Eds.), *Psychoneuroimmunology*, (pp. 71-125). New York: Academic Press.
- Ader, R. (1974). Letter to the editor. *Psychosomatic Medicine*, **36**, 183-184.
- Ader, R., & Cohen, N. (1975). Behavioral conditioned immunosuppression. *Psychosomatic medicine*, **37**, 333-340.
- Ader, R., & Cohen, N. (1982). Behavioral conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. *Science*, **215**, 1534-1536.
- Ader, R., & Cohen, N. (1985). CNS-Immune system interactions: Conditioning phenomena. *The Behavioral and Brain Science*, **8**, 379-426.
- Ader, R., Cohen, N., & Bovbjerg, D. (1982). Conditioned suppression of humoral immunity in the rat. *J of Comparative physiology and psychology*, **96**, 517-521.
- Ader, R., Cohen, N., & Felten, D. (1995). Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet*, **345**, 99-103.
- Akana, Scribner, Bradbury, Strack, Walker y Dalman, 1992
- Baciu, I., (1993), The role of nervous mechanism on immune response. *Rev. Roum. Physiol.*, **29**, 5-11
- Barker, L. M., Best, M. R., & Donjan, M. (1977). *Learning Mechanism in food selection*. Waco Texas: Baylor University Press.
- Basedovsky, H. O., Del-Rey, A. E., & Sorkin, E. (1985). Immune-neuroendocrine interactions. *J. immunology*, **7**, 325-328.
- Basedovsky, H. O., Sorkin, R., Felix, D., & Hass, H. (1977). Hypothalamic changes during immune response. *European Journal of Immunology*, **7**, 325-328.

- Bermúdez-Rattoni, F., Introini-Collison, I. B., & McGaugh, J. L. (1991). Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proceedings of the national academy of sciences*, *88*, 5379-5382.
- Bermúdez-Rattoni, F., & McGaugh, J. L. (1991). Insular Cortex and Amygdala Lesions Differentially Affect Acquisition on Inhibitory Avoidance and Conditioning Taste Aversion. *Brain Research*, *49*, 165-170.
- Bermúdez-Rattoni, F., Ormsby, C. E., Escobar, M. L., & Hernández-Echeagaray, E. (1995). The role of the insular cortex in the acquisition and long lasting memory for aversively motivated behaviors. In N. J. Hillsdale (Ed.), *Behavior Plasticity in the Central Nervous System: Learning and Memory* (pp. 67-82): Lawrence Erlbaum Associates.
- Blalock, J. E. (1984). The immune system as a sensory organ. *J. Immunology*, *132*, 1067-1070.
- Bovbjerg, D., Cohen, N., & Ader, R. (1987a). Behaviorally Conditioned enhancement of delayed-type hypersensitivity in mouse. *Brain Behavior and Immunity*, *1*, 64-71.
- Bovbjerg, D., Kim, Y. T., Siskind, G. W., & Weksler, M. E. (1987b). Conditioned suppression of plaque-forming cell response with cyclophosphamide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *496*, 588-594.
- Brawn, J. J., & Kiefer, S. W. (1975). Preference-Aversion functions for the basic taste stimuli in Rats Lacking gustatory Neocortex. *Bull. Psychonom. Soc.*, *6*, 438-439.
- Brawn, J. J., Lasiter, P. S., & Kiefer, S. W. (1982). The Gustatory Neocortex of the Rat. *Physiological Psychology*, *10*, 13-45.
- Brawn, J. J., Slick, T. B., & Lorden, J. F. (1972). Involvement of Gustatory Neocortex in the Learning of Taste Aversions. *Physiol. Behav.*, *9*, 637-641.
- Brooks, W. H., Cross, R. J., Roszman, T. L., & Markesbery, W. R. (1982). Neuroimmunomodulation: Neural anatomical basis for impairment and facilitation. *Annals of Neurology*, *12*, 56-61.

Cecheto y Chen, 1990

Cross, R. J., Brooks, W. H., Roszman, T. L., & Markesbery, W. R. (1982). Hypothalamic-Immune interactions. Effect of hypophysectomy on neuroimmunomodulation. *Journal of the neurological sciences*, *53*, 557-566.

Cross, R. J., Markesbery, W. R., Brooks, W. H., & Roszman, T. L. (1980). Hypothalamic-Immune Interactions. *Brain Research*, *196*.

Cunningham, E. T. J., & Souza, E. B. D. (1993). Interleukin 1 receptors in the brain and endocrine tissues. *Immunology Today*, *14*, 171.

Dennert, G., Landon, C., & Nowicki, M. (1988). Cell-mediated and glucocorticoid-mediated target cell lysis do not appear to share common pathways. *J. of Immunology*, *141*, 785-791.

Domjan, M. (1980). Ingestion aversion learning: Unique and general processes. In J. Rosenblatt, R. Hinde, C. Beer, & M. Busnel (Eds.), *Advances in the study of behavior* (pp. 108-35). New York: Academic Press.

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

Fabris, N., Mocchegiani, E., & Provinciali, M. (1995). Pituitary-Thyroid Axis and Immune System: A Reciprocal Neuroendocrine-Immune Interaction. *Hormone Research*, *43*, 29-38.

Felten, D. L., Cohen, N., Ader, R., Felten, S. Y., Carlson, S. L., & Roszman, T. L. (1991). Central neural circuits involved in Neural-Immune Interactions. In R. Ader, N. Cohen, & D. L. Felten (Eds.), *Psychoneuroimmunology*. New York: Academic Press.

Felten, D. L., Felten, S. Y., Carlson, S. L., Olschowka, J. A., & Livnat, S. (1985). Noradrenergic and Peptidergic Inervation of Lymphoid Tissue. *Journal of Immunology*, *137*, 755S-765S.

Felten, S. Y., & Felten, D. L. (1991). The Inervation of Lymphoid tissue. In R. Ader, N. Cohen, & D. L. Felten (Eds.), *Psychoneuroimmunology* (pp. 27-70). New York: Academic Press.

Fenández-Ruiz, J., Miranda, M. I., Bermúdez-Rattoni, F., & Drucker-Colín, R. (1993). Effects of Catecholaminergic Depletion of the Amygdala and Insular Cortex on the Potentiation of Odor by Taste Aversions. *Behavioral and Neural Biology*, *60*, 189-191.

Frommer, G. P. (1961). Gustatory afferent responses in the thalamus. In M. R. Kare, & B. Halpern (Eds.), *The physiological and behavioral aspects of taste* (pp. 75-82). Chicago: University of Chicago Press.

Gaffan, D. (1992). Amygdala and the memory of reward. In J. Aggleton (Ed.), *The amygdala* (pp. 471-484). New York: Wiley-Liss.

Galkina, O. V., Al'perina, E. L., Podgornaia, E. K., & Devoino, L. V. (1990). Izmenenie urovnia dopamina i ego metabolitov v strukturakh mozga i immunokompetentnykh organakh pri formirovanii immunogo otveta. *Bull. Eksp. Biol. Med.*, *110*, 66-68.

Gallo, M., Roldan, G., & Bures, J. (1992). Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behavioral and Brain Research*, *52*, 91-97.

Garcia, J., Hankins, W. G., & Rusiniak, K. W. (1974). Behavioral regulation of the milieu interne, in man and rat. *Science*, *185*, 824-831.

Garcia, J., Kimmeldorf, D., & Koelling, R. (1955). A conditioned aversion towards saccharine resulting to exposure to Gamma radiation. *Science*, *122*, 157-158.

Garcia, J., Lasiter, P. S., Bermudez-Rattoni, F., & Deems, D. A. (1985). A general theory of aversion learning. *Annals of the New York ucdemy of sciences*, *443*, 8-21.

Gatermann, Meyer y Wanner, 1992

Gauci, M., Bull, D. F., Schedlowski, M., Husband, A. J., & King, M. G. (1991). Lithium chloride and immunomodulation in taste aversion conditioning. *Physiology and Behavior*, *51*, 207-210.

Grochowicz, P. M., Schedlowski, M., Husband, A. J., King, M. G., Hibber, A. D., & Bowen, K. M. (1991). Behavioral conditioning prolongs heart allograft survival in rats. *Brain Behavior and Immunity*, *5*, 349-356.

Gutierrez, E. G., Banks, W. A., & Kastin, A. J. (1993). Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *Journal of Neuroimmunology*, *47*, 169-176.

Hauger, R. L., Irwin, M. R., Lorang, M., Aguilera, G., & Brown, M. R. (1993). High intracerebral levels of CRH result in CRH receptor downregulation in the amygdala and neuroimmune desensitization. *Brain Research*, *616*, 283-292.

Heilig, M., Irwin, M., Grewal, I., & Sercarz, E. (1993). Sympathetic regulation of T-helper cell function. *Brain Behavior and Immunity*, *7*, 154-163.

Hopkins, S. J., & Rothwell, N. J. (1995). Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. *Trends in Neurosciences*, *18*, 83-88.

Husband, A. J. (1993). Role of the central nervous system and behavior in the immune response. *Vaccine*, *11*, 805-815.

Isakovic, K., & Jankovic, B. D. (1973). Neuroendocrine correlates of immune response II. *International Archives of Allergy*, *45*, 373-384.

Kadlecova, O., Masek, K., Seifert, J., & Petrovicky, P. (1987). The involvement of some brain structures in the effects of immunomodulators. *Annals of the New York academy of sciences*, *496*, 394-398.

Kelley, K. W. (1991). Growth Hormone in immunobiology. In R. Ader, D. L. Felten, & N. Cohen (Eds.), *Psychoneuroimmunology*. San Diego Cal.: Academic Press.

Kelley, K. W., & Dantzer, R. (1986). Is conditioned immunosuppression truly conditioned. *Behavioral and Brain Sciences*, *9*, 758-760.

Kiefer, S. W. (1985). Neural mediation of conditioned food aversions. *Annals of the New York academy of sciences*, *443*, 100-109.

King, M. C., Husband, A. J., & Kusnekov, A. W. (1987). Behaviorally conditioned immunosuppression using anti-lymphocyte serum: Duration of effect and role of corticosteroids. *Medical Science Research*, *15*, 407-408.

Klosterhalfen, S., & Klosterhalfen, W. (1990). Conditioned cyclosporine effects but not conditioned taste aversion in immunized rats. *Behavioral Neurosciences*, *104*, 716-724.

Kusnecov, A. V., Husband, A. J., & King, M. G. (1988). Behaviorally conditioned suppression of mitogen-induced proliferation and immunoglobulin production. *Brain Behavior and Immunity*, *2*, 198-211.

Kusnecov, A. V., Sivyer, M., King, M. G., Husband, A. J., Cripps, A. W., & Clancy, R. L. (1983). Behaviorally conditioned suppression of immune response by anti-lymphocyte serum. *Journal of Immunology*.

Lasiter, P. S. (1982). Cortical substrates of taste aversion learning: Direct amygdalocortical projections to the gustatory neocortex do not mediate conditioned taste aversion learning. *Physiological Psychology*, *10*, 377-383.

Lasiter, P. S., & Glanzman, D. L. (1985). Cortical substrates of taste aversion learning: Involvement of the dorsolateral amygdaloid nuclei and the temporal neocortex in taste aversion learning. *Behav. Neurosci.*, *99*, 257-276.

Lasiter, P. S., Glzman, D. L., & Mensah, P. A. (1982). Direct connectivity between pontine taste areas and gustatory neocortex in the rat. *Brain Research*, *234*, 111-121.

Luecken, L. J., & Lysle, D.T., (1992). Evidence for the involvement of b-adrenergic receptors in conditioned immunomodulation. *J. Neuroimmunol.*, 209-220.

Luheshi, G. N., Hammond, E., & Dam, A. M. V. (1996). Cytokines as messengers of immune interactions. *Trends in Neurosciences*, *19*, 46-47.

Madden, K. S., Ackerman, K. D., Livnat, S., Felten, S. Y., & Felten, D. L. (1989). Patterns of Noradrenergic Innervation of Lymphoid Organs and Immunological Consequences of Denervation. In E. J. Goetzl, & N. H. Spector (Eds.), *Neuroimmune Networks: Physiology and Diseases* (pp. 137-147). New York: Alan R. Liss Inc.

Masek, K., Petrovicky, P., & Seifert, J. (1992). An introduction on the possible role of central nervous system structures in neuroendocrine-immune system interactions. *International Journal of Immunopharmacology*, *14*, 317-322.

- McGaugh, J. L. (1992). Affect, neuromodulatory systems, and memory storage. In S. A. Christianson (Ed.), *The handbook of emotion and memory: research and theory* (pp. 245-268). Hillsdale, N.J.: Lawrence Erlbaum Associates.
- McGaugh, J. L., Cahill, L., Parent, M. B., Mesches, M. H., Coleman-Mesches, K., & Salinas, J. A. (1995). Involvement of the amygdala in the regulation of memory storage. In J. L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni, & R. A. Prado-Alcalá (Eds.), *Plasticity in The Central Nervous System* (pp. 17-39). Mahwah, New Jersey: LEA.
- Miles, K., Chelmica-Schorr, E., Otten, G., & Arnason, B. G. W. (1985). Sympathetica ablation alter lymphocyte membrane properties. *Journal of Immunology*, **135**, 797-805.
- Munck, A., & Guyre, P. M. (1991). Glucocorticoids and immune function. In R. Ader, D. L. Felten, & N. Cohen (Eds.), *Psychoneuroimmunology* (pp. 447-444). San Diego Cal.: Academic Press.
- Nagy, E., Berczy, I., Wren, G. E., Asa, S. L., & Kovacs, K. (1983). Immunomodulation by bromocriptine. *immunopharmacology*, **6**, 231-243.
- Nance, D. M., Rayson, D., & Carr, R. I. (1987). The effects of lesions in the lateral septal area and hippocampal areas on the humoral immune response of adult female rats. *Brain Behavior and Immunity*, **1**, 292-305.
- Neveu, P. J. (1992). Asymmetrical brain modulation of the immune response. *Brain Research, Brain Research Reviews*, **17**, 101-107.
- Neveu, P. J. (1993). Lateralization and immunomodulation. *International Journal of Neuroscience*, **70**, 135-143.
- Neveu, P. J., Dantzer, R., & LeMoal, M. (1986). Behaviorally conditioned suppression of mitogen-induced lymphoproliferation and antibody production in mice. *Neuroscience Letters*, **65**, 293-298.
- Nistico, Caroles, Arbitrio y Pulvirenti, 1994
- Norgren, R. (1978). Projections from the nucleus of the solitary tract in rat. *Neuroscience*, **3**, 207-218.

O'Reilly, C. A., & Exon, J. H. (1986). Cyclophosphamide-conditioned suppression of the natural killer cell response in rats. *Physiology and Behavior*, *37*, 759-764.

Pascoe y Kapp, 1987

Reder, A. T., Karaszewsk, J. W., & B.G.W. Arnason (1989). Sympathetic nervous system involvement in immune responses of mice and patients with multiple sclerosis. In E. J. Goetzl, & N. H. Spector (Eds.), *Neuroimmune Networks: Physiology and Diseases* (pp. 137-47). New York: Alan R. Liss Inc 137-47.

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

Rosenblum, K., Schul, R., Meiri, N., Hadari, Y. R., Zick, Y., & Dudai, Y. (1995). Modulation of protein phosphorylation in rat insular cortex after conditioned taste aversion training. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *92*, 1157-1161.

Roudebush, R. E., & Bryant, H. U. (1991). Conditioned immunosuppression of a murine delayed type hypersensitivity response: Dissociation from corticosterone elevation. *Brain Behav. Immun.*, *5*, 308-317.

Saito, M., Akiyoshi, M., & Shimizu, Y. (1991). Possible role of sympathetic nervous system in responses to Interleukin-1. *Brain Research Bulletin*.

Sarter, M., & Markowitsch, H. J. (1985). Involvement of Amygdala in Learning and Memory: A critical review, with emphasis on anatomical relations. *Behavioral Neuroscience*, *99*, 342-380.

Shimura, T., Suzuki, M., & Yamamoto, T. (1995). Aversive taste stimuli facilitate extracellular acetylcholine release in the insular gustatory cortex of the rat: a microdialysis study. *Brain Research*, *679*, 221-226.

Van-der-Kooy, D. L., McGinty, J. F., Koda, L. Y., Gerfen, C. R., & Bloom, F. E. (1982). Visceral cortex: a direct connection from prefrontal cortex to the solitary nucleus of the rat. *Neuroscience Letters*, *33*, 123-127.

Van-der-Kooy, D.L. y Otros, 1984

Watkins, 1994

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

Wetmore, L., Green-Johnson, J., Gartner, J. G., Sanders, V., & Nance, D. M. (1994). The effect of kainic acid-induced lesions in the lateral septal area on cell-mediated immune function. *Brain Behavior and Immunity*, *8*, 341-354.

Yamamoto, T. (1993). Neuronal mechanisms of taste aversion learning. *Neuroscience Research*, *16*, 181-185.

FALTA PAGINA

No.

69 a la 102

Insular Cortex Lesions Impair the Acquisition of Conditioned Immunosuppression

VICTOR RAMÍREZ-AMAYA,*† BENJAMÍN ALVAREZ-BORDA,*
CHRISTOPHER E. ORMSBY,* RUBÉN D. MARTÍNEZ,‡
RUY PÉREZ-MONTFORT,§ AND FEDERICO BERMÚDEZ-RATTONI*¹

*Departamento de Neurociencias y †Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular,
‡Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, y §Departamento de
Psicofisiología, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma
de México, 04510 México, D.F., México

Conditioned immunosuppression can be readily obtained in animals by associating a taste with an immunosuppressive drug. On subsequent exposure to the conditioned taste, the animals show an attenuated immune response and also exhibit a conditioned taste aversion. It has been established that insular cortex lesions disrupt the acquisition of conditioned taste aversion. The effect of NMDA-induced lesions in either the insular cortex or the parietal cortex of male Wistar rats was evaluated in the acquisition of conditioned immunosuppression in two experiments. Unlesioned control rats showed the conditioned immunosuppressive response after reexposure to the taste, as indicated by lower hemagglutinating titers to sheep red blood cells in the first experiment and by a decreased IgM production to ovalbumin, measured by ELISA, in the second experiment. Insular cortex-lesioned rats did not show the conditioned immunosuppression in either experiment, while parietal cortex lesions and the sham-lesioned animals presented a clear decrease of hemagglutinating titer and a low IgM production. The insular cortex lesions did not affect the normal immune response, showing normal hemagglutinating titers and IgM production when compared to nonconditioned controls. The immunosuppressive action of cyclophosphamide also remained unaltered. In conclusion, these results show that the insular cortex is essential for the acquisition of conditioned immunosuppression. © 1996 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

Several neural systems are important modulators of immune responses; these include the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Blalock, 1994), the autonomic nervous system (Felten, Ackerman, Wiegand, & Felten, 1987), and the limbic system (Ader, Cohen, & Felten, 1995; Pan & Long, 1993; Wetmore, Green-Johnson, Gartner, Sanders, & Nance, 1994). Furthermore, there are reports showing that limbic structures and the autonomic nervous system can receive immune input (Abreu, Llorene, Hernández, & González, 1994; Yu & Shinnick-Gallagher, 1994). The neocortex has also been reported to be involved in immunomodulation (Neveu, 1992). Thus, it is not surprising that immune responses can be modulated by behavioral conditioning procedures (Ader & Cohen, 1981; Alvarez-Borda, Ramírez-Amaya, Pérez-Montfort, & Bermúdez-Rattoni, 1995). The first convincing proof was obtained by the work of Ader and Cohen in past decades (1975, 1982). In their model, the pairing of a novel taste with an immunosuppressive drug, such as cyclophosphamide, induces an attenuation of the immune response upon reexposure to the taste stimulus alone. The pairing

¹ To whom correspondence should be addressed at Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, P.O. Box 70-253, 04510 México, D.F., México. Fax: (525) 622 5607; e-mail: fbermudez@servidor.unam.mx or fbermude@ifscun1.ifsiol.unam.mx.

of saccharin with cyclophosphamide allows a conditioned immunosuppression (CIS) and at the same time produces a conditioned taste aversion; this is a learning paradigm which consists of the acquisition of an aversive response directed to a gustative stimulus that has been previously paired with a malaise inducing drug (Ader, Cohen, & Bovbjerg, 1982; García, Lasiter, Bermúdez-Rattoni, & Deems, 1985). Besides the well-known immunosuppressive effects, cyclophosphamide has also been used for producing conditioned taste aversion due to its induction of gastric malaise (Ader et al., 1982).

The neural mediation of conditioned taste aversion has been widely studied (Kiefer, 1985). In this regard it has been demonstrated that a neocortical region known as the insular cortex (IC) is essential for the acquisition and retention of this learning (García et al., 1985). The IC is known to be involved in visceral reactions and stress (van der Kooy, Koda, McGinty, Gerfen, & Bloom, 1984) and is referred to as the gustatory or visceral cortex, since it receives visceral and gustatory information from the thalamus (Kiefer, 1985). It has reciprocal connections with the nucleus of the solitary tract (Ito, 1992; Kiefer, 1985), which is the entry of all visceral and gustatory information and is an important relay of information from the sympathetic nervous system. This part of the neocortex has connections with limbic structures, including the amygdala, the mediodorsal nucleus of the thalamus, and the medial prefrontal cortex (Kiefer, 1985; Krushel & van der Kooy, 1988). It has been reported that lesions or inactivation of the IC block the acquisition of conditioned taste aversion (Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991; Gallo, Roldan, & Bures, 1992). However, the IC is not important for the sensory discrimination of gustative stimuli (Braun, Lasiter, & Kiefer, 1982). Moreover, other aversively motivated learning tasks are disrupted by permanent or reversible lesions of the IC, including inhibitory avoidance and the Morris water maze (Bermúdez-Rattoni, Introini-Collison, & McGaugh, 1991; Dunn & Everit, 1988).

The IC is essential for the acquisition of conditioned taste aversion. Therefore, it has been postulated that this region may integrate gustatory and visceral stimuli allowing the acquisition of conditioned taste aversion (García et al., 1985). We hypothesize that the IC can also be important for integrating immune and gustatory information to develop CIS. Therefore, the aim of the present work was to evaluate the effects of excitotoxic IC lesions on the acquisition of CIS.

EXPERIMENT 1

Materials and Methods

Thirty-seven male Wistar rats were caged individually and maintained under a 12:12-h light-dark cycle (lights on at 9:00 PM) with food *ad libitum*. Water was also available, except during the measurement of baseline water consumption and saccharin presentation.

On Day 0 of the experimental protocol (see Table 1a), baseline titers of antibody against sheep red blood cells (SRBC) were evaluated for blood samples (BLs) collected from incisions in the tail; Rats were placed in plastic containers, and a cut was made in the last eighth of the tail. Between 1 and 1.5 ml of blood was collected in Eppendorf micro test tubes; this procedure is a modified version of the one used by Akana, Scribner, Bradbury, Strack, Walker, and Dallman (1992). The samples were centrifuged at 3500 rpm for 15 min to obtain sera, which were tested for hemagglutinating activity. Direct hemagglutination tests were made according to standard procedures (Gatemann, Meyer, &

TABLE I
Experimental Procedures

a		Conditioning					
Experimental days:	0	3	16	35	39	43	47
Group	Sample	Surgery	Conditioning treatment	Test trial	Samples		
CS	BLs	None	Sac + Cy	I-Sac	4	8	12
CSo	BLs	None	Sac + Cy	I-H ₂ O	4	8	12
ICLx	BLs	NMDA	Sac + Cy	I-Sac	4	8	12
PCLx	BLs	NMDA	Sac + Cy	I-Sac	4	8	12
ICSh	BLs	PBS	Sac + Cy	I-Sac	4	8	12

b		Normal immune response					
Group	Sample	Surgery	Treatment	Test trial	Samples		
Ctrl	BLs	None	Sac + Sal	I-Sac	4	8	12
ICLx	BLs	NMDA	Sac + Sal	I-Sac	4	8	12

c		Cy immunosuppression			
Group	Sample	Surgery	Treatment ^a	Samples ^a	
Ctrl	BLs	None	I-Cy	4	8
ICLx	BLs	NMDA	I-Cy	4	8

Note. CS, conditioned; CSo, conditioned but not reexposed; ICLx, insular cortex lesion; PCLx, parietal cortex lesion; ICSh, insular cortex sham; Ctrl, intact control; Sac, saccharin; Sal, saline; Cy, cyclophosphamide; BLs, baseline sample; 4, 8, and 12, sampling day after immunization; +, paired; -30-min period (not paired).

^a Treatment was done at Day 12, and samples were taken at Days 16 and 20 of the experimental days.

Wanner, 1992). This is a test which measures the capacity of serum antibodies to agglutinate erythrocytes. Most of the direct agglutinating activity of an immune serum is due to IgM molecules which have multiple active sites (5 to 10) which bind with enough affinity to counteract the negative charges of erythrocyte membranes that tend to push red cells apart. Since IgG molecules have only 2 binding sites, an additional secondary serum containing anti-IgG antibodies is necessary to induce the hemagglutination mediated by IgG molecules; in this experiment only direct hemagglutination activity was measured. One percent (v/v) SRBC were used as antigen in PBS (0.1 M phosphate buffer and 0.15 M saline, pH 7.4) containing gelatin (1 mg/ml), sodium azide (1 mg/ml), and the sample sera as the source of antibodies.

On Day 3, two groups of rats received bilateral microinjections of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) into the IC or the parietal cortex, to induce excitotoxic lesions. Surgical procedures were performed under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg). Lesions were done bilaterally using stereotaxic procedures: in one group the lesions were made in the IC (AP +1.2, L ±5.5, DV -5.5) and in another group in the parietal cortex (AP +1.2, L ±4.0, DV -1.5). In each case the incisor bar was placed so that bregma and λ levels had the same DV coordinates (-4.5 on average). To produce

the lesions, NMDA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ solution in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4) was back filled into a 30-gauge needle connected via a water-filled polyethylene tube to a 10- μl Hamilton microsyringe. Each animal received bilateral injections in either the IC (ICLX, $n = 8$) or the parietal cortex (PCLX, $n = 8$) of 6 μl of NMDA solution over a 2-min period using a syringe pump (Sage Instruments). The needle remained in place for an additional 2 min after the injection to maximize diffusion. A sham-lesioned group (ICSh, $n = 7$) received phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) in the IC. Two additional groups were nonlesioned controls; one was a conditioned control (CS, $n = 8$) and the other was a control group in which the conditioned stimulus was not presented during the test (CS0, $n = 6$) (see below). Each experimental condition was applied simultaneously to all groups. To address the specificity of IC lesions, parietal cortex lesions were chosen as control, since this neocortical region is adjacent to the IC and is also involved in learning processes (e.g., Adelstein, Kesner, & Strassberg, 1992; Kesner, Berman, & Tardif, 1992), but not in conditioned taste aversion.

Nine days were allowed for postsurgical recovery. On Day 11 rats were deprived of water for 24 h and on Day 12 baseline water consumption was measured. After the deprivation period (at 9:00 AM) distilled water was given to the rats in graded test tubes for 10 min and the consumption was recorded. Rats were given access to water again at 7:00 PM. This procedure was used for all rats during the 4 days prior to the exposure to saccharin. On Day 16 all the animals received CIS acquisition. This consisted of a 10-min exposure to saccharin (0.1%) dissolved in their drinking water, followed immediately by an ip injection of 50 mg/kg of cyclophosphamide dissolved in distilled water (25 mg/ml). The saccharin solution was always presented in the corresponding morning session. The arithmetical average of the preceding two morning water intakes was defined as 100% of baseline consumption. Four hours later animals were given water *ad libitum*. On Day 31, water baseline consumption was measured again. On Day 35, all rats were immunized with SRBC diluted in PBS (1% v/v) injected ip in a dose of 2 ml/kg. Thirty minutes after the immunization, rats were reexposed to the saccharin for 10 min, with the exception of the CS0 group, which was placed in a different room and given water instead of saccharin. This group was included as a standard control procedure to ascertain the effect of conditioning (Ader & Cohen, 1985). Blood samples were taken 4 (sA), 8 (sB), and 12 (sC) days after the immunization; i.e., on Days 39, 43, and 47, respectively.

At the end of the experiment the animals were deeply anesthetized and perfused with a 4% paraformaldehyde solution (dissolved in 0.1 M PBS, pH 7.4) and brain tissues were processed with Nissl histological technique, to examine the precise locus of the lesions (Fig. 1). About 10% of the original lesioned animals had inadequate lesions and were not included in any analysis.

Simple ANOVA was calculated on the percentage of saccharin consumption with respect to the baseline from previous days, using a post-hoc pairwise Scheffe test. Statistical analysis of the titer values was carried out by multiple comparisons with the Kruskal-Wallis test and pairwise comparisons with the Mann-Whitney *U* test.

Results

As shown in Fig. 2a, the baseline hemagglutinating activities of all groups were near 0, with no statistical differences among them. A significant effect of treatment was found by the Kruskal-Wallis test in all samples taken after the immunization;

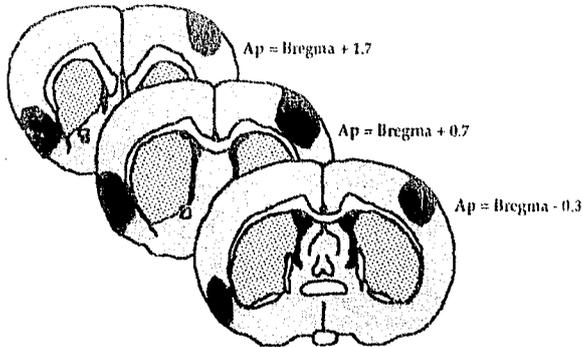


FIG. 1. Schematic representation of IC (left) and parietal cortex (right) lesions are shown. The darkened areas represent the smallest lesion, and the gray areas represent the largest lesion.

sA ($H(4,5) = 16.64, p < .001$), sB ($H(4,5) = 16.94, p < .002$), and sC ($H(4,5) = 13.14, p < .01$). The CS, ICSh, and PCLx groups showed a conditioned attenuation of the immune response in all samples taken after immunization (Fig. 2a). The effect of conditioning was evidenced by the CSo group, which did not express the conditioned immunosuppressive response. The CSo group had significantly higher hemagglutinating activity in sA, sB, and sC when compared to CS, ICSh, and PCLx (p 's $< .01$). The ICLx group exhibited disrupted CIS responses, as shown by the significantly higher antibody titer to SRBC in sA and sB (p 's $< .01$). The taste aversion test (Fig. 2b) after immunization revealed that the CS, ICSh, and PCLx groups had acquired a conditioned taste aversion, while rats with IC lesions showed disrupted conditioned taste aversion ($F(2,24) = 88.586, p < .001$; ICLx vs Ctrl, $p < .001$).

To investigate the possible effect of IC lesions on the normal immune response two groups of animals ($n = 15$) were used, one with IC lesions and the other as an intact control (see Table 1b). On Day 0, baseline blood samples were taken; 3 days later one group received NMDA-induced lesion of the IC (ICLx; $n = 7$) and the other served as a nonlesioned control group (Ctrl; $n = 8$). Baseline water consumption was measured on Day 12. On Day 16 all rats were exposed to saccharin for 10 min and injected ip with saline immediately afterward. Four hours later they were given water *ad libitum* until the next baseline water consumption was measured (15 days after conditioning). On Day 31, baseline water consumption was measured. All the rats were immunized with SRBC on Day 35 and reexposed to saccharin 30 min later. Blood samples were taken 4 (sA), 8 (sB), and 12 (sC) days after the immunization and tested for hemagglutinating activity.

Figure 3a shows the results of the immune response in ICLx and Ctrl groups. The groups had similar titers of antibodies for SRBC in all samples, indicating that IC lesions do not affect the normal immune response. Furthermore, both groups showed increased saccharin consumption when compared with the water baseline consumption in the second exposure to the taste. The results indicate a taste preference for saccharin (Fig. 3b), a finding consistent with previous evidence (Braun et al., 1982) demonstrating that IC lesions do not affect taste discrimination.

In order to test the effect of IC lesions on the immunosuppressive action of cyclo-

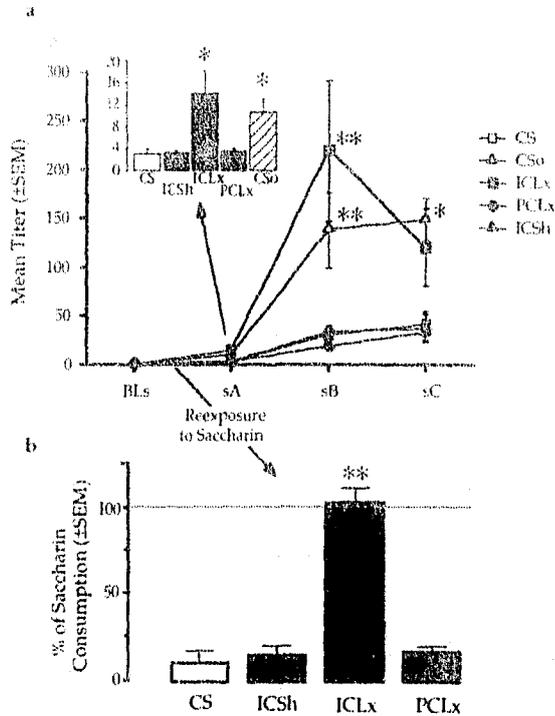


Fig. 2. Mean values of hemagglutinating titers (\pm standard error of the mean) from all conditioned groups are shown in (a). BLs is the sample taken at the beginning of the experiment. Samples sA, sB, and sC were taken 4, 8, and 12 days after immunization with SRBC and reexposure to saccharin. The percentage of saccharin consumption is shown in (b) for all groups except for CSO, which was not reexposed to saccharin. The preceding two morning water intakes were taken as 100% of consumption. * $p < .05$; ** $p < .01$.

phosphamide injection, an effect known to last approximately 10 days (Falter, Persinger, & Chretien, 1992), baseline blood samples were taken from two groups of rats ($n = 15$) at Day 0 (see Table 1c). On Day 3, one group received IC lesions (ICLX $n = 7$) and the other remained as a nonlesioned control (Ctrl $n = 8$). On Day 12 all rats were immunized with SRBC and 30 min later received an ip injection of cyclophosphamide (50 mg/kg). Four (sA) and eight (sB) days after immunization, blood samples were taken and tested for hemagglutinating activity. The immune response was attenuated in both groups as indicated by the very low antibody titers for SRBC (sA mean ICLX = 1.14, Ctrl = 1.00, SEM ICLX = 0.65, Ctrl = 0.74; sB mean ICLX = 21.71, Ctrl = 35.0, SEM ICLX = 3.91, Ctrl = 10.88) in both samples with no statistical differences among them. The immunosuppressive effect of cyclophosphamide is clear when compared with a normal group that was not exposed to the immunosuppressive drug (Fig. 3a, for these animals the following data were obtained: sA mean 22.50, SEM 19.82; sB mean 272.00, SEM 180.21). Thus, IC lesions did not alter the normal immunosuppressive effect of cyclophosphamide.

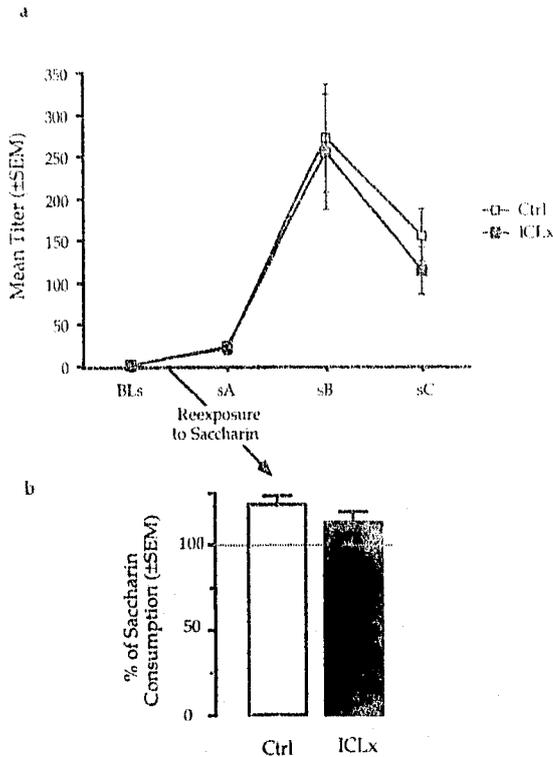


FIG. 3. Mean values of hemagglutinating titers (\pm standard error of the mean) from nonconditioned animals with (ICLx) or without (Ctrl) IC lesions are shown in (a). BLs is the sample taken at the beginning of the experiment. Samples sA, sB, and sC were taken 4, 8, and 12 days after immunization with SRBC. The percentage of saccharin consumption in the second exposure to this gustatory stimulus is shown in (b). The preceding two morning water intakes were taken as 100% of consumption. * $p < .05$; ** $p < .01$.

EXPERIMENT 2

Materials and Methods

To evaluate in more detail and corroborate our results we used the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to measure anti-ovalbumin (OVA) IgM production in conditioned animals. Forty-six experimentally naive male Wistar rats were separated as in the first experiment (CS, $n = 10$; CS0, $n = 8$; ICLx, $n = 8$; PCLx, $n = 9$; ICSh, $n = 8$), and all other methods were similar to those used in the first experiment (see Table 1a).

The day of saccharin reexposure rats were injected ip with 500 μ g of OVA (previously aggregated by heating 10 min at 50°C) in a volume of 300 μ l, 30 min before the reexposure. Blood samples were taken 4 (sA), 8 (sB), and 12 (sC) days after immunization.

Ninety-six-well ELISA plates were coated overnight at 4°C with 10 mg/ml of OVA

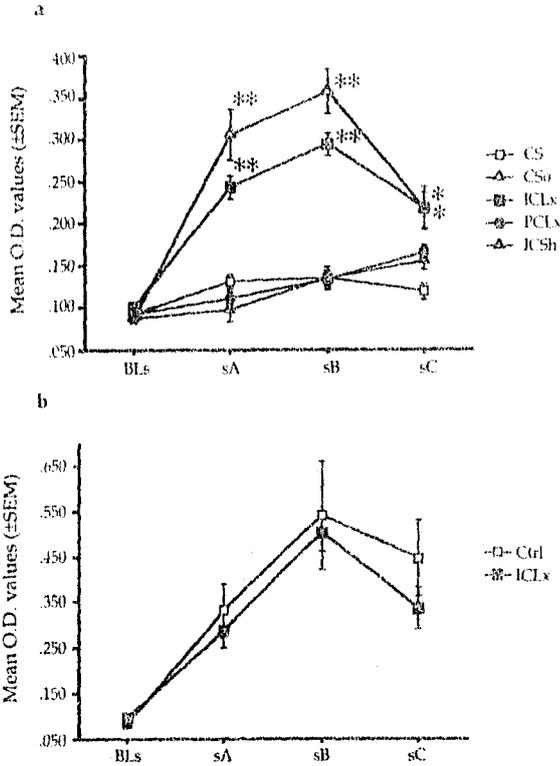


FIG. 4. Mean optic density values (\pm standard error of the mean) obtained from ELISA represent IgM production in conditioned animals (a) and from nonconditioned animals (b) with or without lesions. BLs is the sample taken at the beginning of the experiment. Samples sA, sB, and sC were taken 4, 8, and 12 days after immunization with ovalbumin and reexposure to saccharin. * $p < .05$; ** $p < .01$.

in carbonate buffer, pH 9.6, and postcoated for 1 h at 37°C with PBS+1% BSA (blocking buffer). The test sera were diluted 1:50 in blocking buffer and incubated for 2 h at 37°C. Peroxidase-conjugated rabbit IgG anti-rat IgM (Sigma) was diluted 1:10,000 in blocking buffer and incubated for 2 h at 37°C. The plates were then incubated for 20 min with 2,2'-azino-di-3-ethylbenzothiazoline sulfonic acid substrate dissolved at a concentration of 50 mg/ml in 0.1 M citrate buffer, pH 4.2, and 3% H₂O₂. Absorbance was read at 405 nm, using a reference wavelength of 490 nm. Group \times Sample days repeated-measures ANOVAs were applied to the absorbance values, and a one-way ANOVA was used within sample days to assess group differences, with Scheffe post-hoc tests where appropriate.

Results

Figure 4a shows the production of IgM anti-OVA antibodies in the baseline sample and in the three samples taken after the immunization. ANOVA analysis showed

statistical differences among groups ($F(4,38) = 44.87$ $p < .001$), indicating a significant effect of treatment. The analysis also yielded statistical differences between days ($F(3,114) = 81.813$ $p < .001$) and Treatment \times Days interaction ($F(12,114) = 17.45$ $p < .001$). In the baseline sample there were no statistical differences between groups. Statistical differences among groups were found in the samples taken after the immunization; sA ($F(4,38) = 31.72$ $p < .001$), sB ($F(4,38) = 54.143$ $p < .001$), and sC ($F(4,38) = 7.204$ $p < .001$). Scheffe post-hoc analysis showed differences between CS₀ and CS in sA, sB, and sC (p 's $< .01$), indicating that the low IgM production in CS, PCLx, and ICSh groups is an effect of the reexposure to the conditioned stimulus. Conditioned animals with IC lesions showed statistical differences when compared to the CS, ICSh, and PCLx groups in sA (p 's $< .01$), sB (p 's $< .01$), and sC (only ICLx vs CS = $p < .01$).

Conditioned taste aversion was present in CS, PCLx, and ICSh and disrupted in ICLx animals, as expected (percentage of saccharin consumption: CS mean = 9.93 SEM = 0.87; ICLx mean = 114.17, SEM 8.57; PCLx mean = 13.78, SEM = 3.27; ICSh mean = 17.15, SEM = 3.78). It should be noted that animals consume about 12 to 19 ml of water in every 10-min session and no differences were found in water consumption between groups. In addition, saccharin consumption of lesioned and unlesioned animals during the acquisition is similar with a slight but nonsignificant increase of saccharin consumption in the ICLx group (data not shown).

In this experiment, the effect of IC lesions on normal IgM production was also evaluated (using the procedure shown in Table 1b) with 12 male Wistar rats (Ctrl, $n = 6$; ICLx, $n = 6$). The results showed that IC lesions do not affect the normal IgM anti-OVA production, as shown in Fig. 4b. There were no statistical differences between groups in any of the samples (4, 8, and 12 days after immunization). However, there were higher IgM levels in these groups when compared to the conditioned groups, probably because of the use of cyclophosphamide in the conditioned animals. This effect was also seen in the first experiment (Fig. 3a vs Fig. 2a).

DISCUSSION

The main finding of these experiments was that NMDA-induced lesions in the IC but not in the parietal cortex disrupt the acquisition of conditioned immunosuppression. Thus, in the first experiment we found that conditioned animals with IC lesions did not show the immunosuppressive effect of conditioning as indicated by lower hemagglutinating titers to SRBC. A similar result was replicated in the second experiment using a different antigen and with a more precise methodology for antibody detection. Furthermore, the normal humoral immune response is not affected by IC lesions as determined by hemagglutination and IgM production measured by ELISA. Additionally, the immunosuppressive action of cyclophosphamide remains unaffected by IC lesions. This effect seems to be exclusive for IC lesions, since PC and IC sham lesions did not affect the conditioned immunosuppression. The finding that animals with lesions of the IC do not acquire the conditioned immunosuppression nor the conditioned taste aversion (despite the fact that IC lesions do not affect taste discrimination) suggests that the IC is involved in the regulation of the associating mechanism of the immunosuppressive conditioning, as has been suggested for conditioned taste aversion (Garcia et al., 1985).

Conditioning of the immune response implies that the CNS must be informed about changes occurring in the immune status and also that the nervous system is able to

alter the immune response. It has been observed that the amygdala (as well as other brain areas) responds to immune changes and may be important in modulating the immune response (Galkina, Al'perina, Podgornaya, & Devoino, 1990; Masek, Petrovicky, & Seifert, 1992; Cunningham & Souza, 1993; Nistico, Caroleo, Arbirio, & Pulvirenti, 1994). The IC has anatomical relations with limbic structures, especially with the amygdala (van der Kooy et al., 1984), which has bidirectional projections with the IC, observed anatomically and electrophysiologically (Lasiter, 1982; Pascoe & Kapp, 1987). Therefore, it is possible that the amygdala could be the entrance for the immune information that the IC requires to develop the CIS. In experiments evaluating the effects of excitotoxic lesions of the amygdala and the IC on the acquisition of visceral learning, such as conditioned taste aversion, it has been observed that lesions of the IC but not the amygdala disrupt the acquisition of visceral conditioning (Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991; Dunn & Everit, 1988). However, the role of the amygdala in conditioned immunosuppression is not clear and experiments are currently being performed to address this issue.

The effector system through which the IC could modulate immune responses is unknown; however, the study of the immune modulation exerted by the autonomic nervous system may shed some light. The IC is connected directly and bidirectionally with the nucleus of the solitary tract (Cechetti & Chen, 1990; Norgren, 1978); this nucleus is the entry of all visceral information and is a very important modulator of the autonomic nervous system. The autonomic nervous system is an important pathway through which the CNS modulates immune responses, since there is a direct sympathetic innervation of lymphoid tissue (Felten, Felten, Carlson, Olschowka, & Livnat, 1985; Reder, Karaszewski, & Arnason, 1989; Heilig, Irwin, Grewal, & Sercarz, 1993). These anatomical relations of the IC and their participation in learning and memory of aversively motivated tasks (Bermúdez-Rattoni et al., 1991; Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991) make this structure a good candidate for the control of the neural mechanisms underlying the association between the taste stimulus and the immunosuppressive effect of cyclophosphamide.

There is evidence suggesting that the neocortex may be involved in the modulation of immunity (Neveu, 1992; Watkins, 1994). It has been reported that large unilateral neocortical lesions of the frontoparietooccipital lobe affect various parameters of the immune response *per se* in an asymmetric manner (Neveu, 1988; Betancur, Neveu, Vitiello, & Le Moal, 1991). According to our results, lesions in the IC affect the immunosuppressive response in conditioned animals, leaving the normal humoral nonconditioned immunological response unaltered. The lesions performed in the work of Neveu and colleagues do not include the IC; for that reason those data may not be generalized to the IC, but it is important to further analyze the effect of the IC in other parameters of the normal and conditioned immune response. However, this suggests that in fact the neocortex can be an important modulator of the immune system. Nevertheless, the exact role of the IC in conditioned immunosuppression still has to be elucidated. In particular the nature of the unconditioned stimulus has to be studied, to understand how the brain responds to it and how the association mechanism may occur.

In conclusion, the results of the present experiments indicate that NMDA lesions of the IC produce a severe impairment of the acquisition of CIS, suggesting that the functional integrity of the IC is necessary for the neural integration of the stimuli involved in immunosuppressive conditioning.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Oreste Carbajal for his technical assistance. Supported by DGAPA (IN201993).

REFERENCES

- Abreu, P., Lorene, E., Hernández, M. M., & González, M. C. (1994). Interleukin-1 β stimulates tyrosine hydroxylase activity in the median eminence. *Neuroreport* **5**, 1356-1358.
- Adelstein, T. B., Kesner, R. P., & Strassberg, D. S. (1992). Spatial recognition and spatial order memory in patients with dementia of the Alzheimer's type. *Neuropsychology* **30**, 59-67.
- Ader, R., & Cohen, N. (1975). Behavioral conditioned immunosuppression. *Psychosom. Med.* **37**, 333-340.
- Ader, R., & Cohen, N. (1981). Conditioned immunopharmacological responses. In R. Ader (Ed.), *Psychoneuroimmunology*, pp. 185-228. New York: Academic Press.
- Ader, R., & Cohen, N. (1982). Behavioral conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. *Science* **215**, 1534-1536.
- Ader, R., & Cohen, N. (1985). CNS-Immune system interactions: Conditioning phenomena. *Behav. Brain Sci.* **8**, 379-426.
- Ader, R., Cohen, N., & Ilovbjerg, D. (1982). Conditioned suppression of humoral immunity in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **96**, 517-521.
- Ader, R., Cohen, N., & Felten, D. (1995). Psychoneuroimmunology: Interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet* **345**, 99-103.
- Akana, S. F., Scribner, K. A., Bradbury, M. J., Strack, A. M., Walker, C. D., & Dallman, M. F. (1992). Feedback sensitivity of the rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis and its capacity to adjust to endogenous corticosterone. *Endocrinology* **131**, 585-594.
- Alvarez-Borda, B., Ramírez-Amaya, V., Pérez-Montfort, R., & Hernández-Rattoni, F. (1995). Enhancement of antibody production by a learning paradigm. *Neurobiol. Learn. Mem.* **64**, 103-105.
- Bermúdez-Rattoni, F., Intorini-Collison, I. B., & McLaughl, J. L. (1991). Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5379-5382.
- Bermúdez-Rattoni, F., & McLaughl, J. L. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Res.* **549**, 165-170.
- Betancur, C., Neven, P. J., Vitiello, S., & Le Moal, M. (1991). Natural killer cell activity is associated with brain asymmetry in male mice. *Brain Behav. Immun.* **5**, 162-169.
- Blalock, J. E. (1994). The syntaxal immune-neuroendocrine communication. *Immunol. Today* **15**, 504-511.
- Braun, J. J., Lasiter, P. S., & Kiefer, S. W. (1982). The gustatory neocortex of the rat. *Physiol. Psychol.* **10**, 13-45.
- Cecchetto, D. F., & Chen, S. J. (1990). Subcortical sites mediating sympathetic responses from the IC in the rat. *Am. J. Physiol. (Reg. Integ. Comp. Physiol.)* **258**, R245-R255.
- Cunningham, E. T. J., & Souza, E. B. D. (1993). Interleukin 1 receptors in the brain and endocrine tissues. *Immunol. Today* **14**, 171.
- Dunn, L. T., & Everitt, B. J. (1988). Double dissociation of the effects of amygdala and IC lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in rat using the excitotoxic ibotenic acid. *Behav. Neurosci.* **102**, 3-23.
- Falter, H., Persinger, M. A., & Chretien, R. (1992). Transient suppression of a secondary humoral response in rats is evoked by lithium-pilocarpine-induced limbic seizures. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **43**, 315.
- Felten, D. L., Ackerman, K. D., Wiegand, S. J., & Felten, S. Y. (1987). Noradrenergic and sympathetic innervation of the spleen. *Neurosci. Res.* **18**, 28-36.
- Felten, D. L., Felten, S. Y., Carlson, S. L., Olschowka, J. A., & Livnat, S. (1985). Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J. Immunol.* **137**, 755S-765S.
- Galkina, O. V., Al'perina, E. L., Podgoraia, E. K., & Devoitno, L. V. (1990). Izmenenie urovnia dopamina i ego metabolilov v strukturakh mozga i immunokompetentnykh organakh pri formirovani immunogo otveta. *Izull. Eksp. Biol. Med.* **110**, 66-68.
- Gallo, M., Roldan, G., & Bures, J. (1992). Differential involvement of gustatory IC and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behav. Brain Res.* **52**, 91-97.
- Garcia, J., Lasiter, P. S., Hernández-Rattoni, F., & Deems, D. A. (1985). A general theory of aversion learning. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **443**, 8-21.
- Gatermann, S., Meyer, H. G., & Wanner, G. (1992). Staphylococcus saprophyticus hemagglutinin is a 160-kilodalton surface polypeptide. *Infect. Immun.* **60**, 4127-4132.

- Heilig, M., Irwin, M., Grewal, I., & Sercarz, E. (1993). Sympathetic regulation of T-helper cell function. *Brain Behav. Immun.* **7**, 154-163.
- Ito, S. (1992). Multiple projection of vagal non-myelinated afferent to the anterior IC in rats. *Neurosci. Lett.* **148**, 151-154.
- Kesner, R. P., Berman, R. F., & Tardif, R. (1992). Place and taste aversion learning: role of the basal forebrain, parietal cortex and amygdala. *Brain Res. Bull.* **29**, 345-353.
- Kiefer, S. W. (1985). Neural mediation of conditioned food aversions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **443**, 100-109.
- Kruschel, L. A., & van der Kooy, D. L. (1988). Visceral cortex: integration of the mucosal senses with limbic information in the rat agranular IC. *J. Comp. Neurol.* **270**, 39-54.
- Lasiar, P. S. (1982). Cortical substrates of taste aversion learning: Direct amygdalocortical projections to the gustatory neocortex do not mediate conditioned taste aversion learning. *Physiol. Psychol.* **10**, 377-383.
- Masek, K., Petrovicky, P., & Seifert, J. (1992). An introduction on the possible role of central nervous system structures in neuroendocrine-immune system interactions. *Int. J. Immunopharmacol.* **14**, 317-322.
- Neveu, P. J. (1988). Brain neocortex immunomodulation in rats. *Brain Res.* **474**, 394-398.
- Neveu, P. J. (1992). Asymmetrical brain modulation of the immune response. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **17**, 101-107.
- Nistlén, G., Caroleo, M. C., Arbitrio, M., & Pulvirenti, L. (1994). Dopamine D1 receptors in the amygdala enhance the immune response in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **741**, 316-323.
- Norgren, R. (1978). Projections from the nucleus of the solitary tract in rat. *Neuroscience* **3**, 207-218.
- Pan, Q., & Long, J. (1993). Lesions of the hippocampus enhance or depress humoral immunity in rats. *Neuroreport*, **4**, 864-866.
- Pascoe, J. P., & Kapp, B. S. (1987). Responses of amygdaloid central nucleus neurons to stimulation of the IC in awake rabbits. *Neuroscience* **21**, 471-485.
- Reder, A. T., Karaszewski, J. W., & Amason, B. G. W. (1989). Sympathetic nervous system involvement in immune responses of mice and patients with multiple sclerosis. In E. J. Goetzel & N. H. Spector (Eds.), *Neuroimmune networks: Physiology and diseases*, pp. 137-147. A. R. Liss; New York.
- van der Kooy, D. L., Koda, L. Y., McGinty, J. F., Gerfen, C. R., & Bloom, F. E. (1984). The organization of projections from the cortex to the amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J. Comp. Neurol.* **224**, 1-24.
- Watkins, A. D. (1994). Hierarchical cortical control of neuroimmunomodulatory pathways. *Neuropathol. App. Neurobiol.* **20**, 423-431.
- Weinore, L., Green-Johnson, J., Gartner, J. G., Sandets, V., & Nance, D. M. (1994). The effect of kainic acid-induced lesions in the lateral septal area on cell-mediated immune function. *Brain Behav. Immun.* **8**, 341-354.
- Yu, B., & Shinnick-Gallagher, P. (1994). Interleukin-1b inhibits synaptic transmission and induces membrane hyperpolarization in amygdala neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**, 590-600.

Received October 30, 1995