

00322

49



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“AUMENTO CONDICIONADO DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS: ESTUDIO DE SU REPRODUCIBILIDAD AL CAMBIAR DE ANTÍGENO”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
OSCAR FLORES MUCIÑO

DIRECTOR DE TESIS:

M. en Bt. HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A



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.

PAGINACION

DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Aumento condicionado de la respuesta de anticuerpos: Estudio de su reproducibilidad al cambiar de antígeno"

realizado por Flores Muciño Oscar

con número de cuenta 09412642-6 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario M.en Bt. Héctor Enrique Espinosa Arciniega

Propietario Dr. Federico Bermúdez Rattoni

Propietario Dr. Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Suplente Dr. Guillermo Salgado Maldonado

Suplente Lic. Leticia Ramírez Lugo

Héctor Enrique Espinosa Arciniega
Federico Bermúdez Rattoni
Guillermo Salgado Maldonado

Leticia Ramírez Lugo

Consejo Departamental de Biología

M.en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

B

Dedicatorias.

A Dios...

.... Porque le debo todo lo que soy y porque una vez más me permitió lograr una de mis metas.

A mis padres....

..... Por su amor, sus enseñanzas, su invaluable apoyo y sobre todo por compartir conmigo los buenos y malos momentos que sucedieron durante la realización de éste sueño.

A mis hermanas.....

..... Por todos los momentos gratos que hemos compartido, pero sobre todo porque con su amor, apoyo y muestras de confianza lograron ser el sustento emocional de éste sueño.

!!!Lo Logramos!!!

Reconocimientos.

..... A la UNAM y la Facultad de Ciencias por permitirme formar parte de dos grandes instituciones y por darme una formación universitaria y científica.

..... Al M. en Bt. Enrique Espinosa por toda su confianza, su paciencia, sus enseñanzas, pero sobre todo por tomar la gran responsabilidad de dirigir éste trabajo.

..... Al Dr. Federico Bermúdez por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y desarrollarme como científico, así como por sus valiosas aportaciones y su apoyo a éste trabajo.

..... A Dr. Silvestre Alavez, Dr. Guillermo Salgado y Lic. Leticia Ramírez por aceptar ser parte de mi jurado, así como por el valioso tiempo dedicado y las aportaciones realizadas para mejorar éste trabajo.

¡¡¡Gracias!!!

D

Agradecimientos.

..... A todos mis primos, tíos, sobrinos y demás familiares por su apoyo constante para seguir adelante.

..... A Georgina Pérez porque sin su cariño, confianza, apoyo y dedicación todo el trabajo hubiese sido más difícil.

..... A mis grandes amigos Ari Franco, Mario Morales, Ana C. Vázquez, Marcela Villar, Norma Morales, Denisse Espíndola, Marco A. Franco, Antonia Ramírez, José A. Torres y Carlos Mendoza quienes con su amistad fueron un gran apoyo no sólo humano sino también profesional y porque puedo presumir de tener a los mejores amigos.

..... A todos mis compañeros del laboratorio, Lety, Luis N., Vanesa, Carlos, Sandra, Israela, Marisela, Sergio, Luciana, Maribel, Ranier, Victor, Jimena, Miriam, Elizabeth, Israel, Luis R., no sólo por su amistad sino por hacer grato todo el tiempo que pasé en el laboratorio. Agradezco también a Yolanda Díaz, Oreste Carvajal y Félix Sierra por su apoyo técnico y porque sin su trabajo realizar el mío hubiera sido muy complicado.

..... A todos mis amigos y compañeros de la facultad porque de todos he aprendido algo.

..... A todos aquellos que creyeron en mí.

!!!! Muchas Gracias !!!!

E

La felicidad humana generalmente no se logra con grandes golpes de suerte que pueden ocurrir pocas veces, sino con pequeñas cosas que ocurren todos los días.

Benjamín Franklin

F

Índice

	Pág.
Resumen.....	3
1. Introducción.....	5
Importancia biológica del sistema Inmune y el sistema nervioso.....	5
Interacciones entre el sistema Inmune y el sistema nervioso.....	7
El condicionamiento pavloviano como modelo de comunicación neuro-inmune.....	8
Condicionamiento de la respuesta de anticuerpos.....	11
2. Planteamiento del problema	15
3. Hipótesis.....	16
4. Objetivo.....	17
5. Metodología.....	18
5.1 Animales.....	18
5.2 Entrenamiento de Adquisición.....	18
5.3 Evocación.....	20
5.4 Muestras de Sangre.....	20
5.5 Prueba de ELISA.....	21
5.6 Análisis estadístico.....	22
6. Resultados.....	24

6.1 Efectos del tratamiento de adquisición.....	24
6.2 Efectos del Condicionamiento.....	32
7. Discusión.....	35
8. Conclusiones.....	43
9. Bibliografía.....	45

Resumen.

El sistema nervioso central y el sistema inmune son de gran importancia en los vertebrados ya que contribuyen a la supervivencia y adaptación de estos a su medio ambiente. Anteriormente ambos sistemas eran considerados como independientes uno del otro, pero en los últimos años las investigaciones en el campo de la Psiconeuroinmunología han dado evidencias de que procesos del sistema inmune pueden ser regulados por el sistema nervioso y viceversa (Ader y Cohen, 2001), un ejemplo de esto es la modulación del sistema inmune mediante el condicionamiento Pavloviano clásico.

En ratas Wistar se han reportado activaciones de la respuesta de anticuerpos contra lisozima de huevo de gallina como causa de la sola reexposición a un estímulo condicionado (sacarina), el cual fue previamente apareado con un antígeno proteico (lisozima de huevo de gallina) usando un solo apareamiento entre ambos estímulos (Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001).

En el presente trabajo buscamos analizar la reproducibilidad del condicionamiento de la respuesta de anticuerpos en un sólo entrenamiento originalmente descrito para la lisozima pero usando otro antígeno (hemocianina) como estímulo incondicionado. Nuestros datos no soportan la posibilidad de condicionar los efectos inmunológicos de la hemocianina. Y sugieren que la preexposición a la sacarina (la cual fue usada como estímulo condicionado) por sí sola antes de un reto inmune, trae consigo un aumento en los niveles de anticuerpos contra hemocianina (KLH).

A partir de éstas evidencias concluimos que éste fenómeno de activación condicionada de anticuerpos, usando un solo ensayo de apareamiento, no es generalizable para todos los antígenos de origen proteico, y pone en duda la neutralidad de la sacarina para ser considerada como estímulo condicionado.

1. Introducción.

Importancia biológica del sistema inmune y el sistema nervioso

La fisiología de un animal, es decir, las funciones de sus células, tejidos, órganos y/o sistemas, están muy bien sincronizadas al ambiente que este ocupa, asegurando de esta manera su sobrevivencia y adaptación (Randall et al., 1997); de esta manera, encontramos una gran variedad de especies animales en las que adaptaciones fisiológicas a su medio ambiente les permiten sobrevivir ante las condiciones que éste les ofrece.

Un sistema fisiológico de gran importancia en la adaptación de los animales a las condiciones de su medio ambiente es el sistema inmune, el cual está presente en todos los animales multicelulares y tiene la capacidad de reaccionar en contra de los microorganismos patógenos, además de manifestarse en contra de todo material que resulta "extraño" o ajeno al animal (Smith y Wood, 1997).

En los vertebrados la defensa inmunológica está compuesta por dos tipos generales de Inmunidad, la Inmunidad no específica o Innata y la Inmunidad específica o adquirida; dentro de la inmunidad innata encontramos mecanismos de defensa con la característica de actuar de manera inespecífica contra cualquier agente extraño, además, éste tipo de Inmunidad constituye el primer frente del mecanismo de defensa. La inmunidad específica, presente sólo en los vertebrados (Smith y Wood, 1997), se caracteriza principalmente, además de su especificidad, por tener "memoria inmunológica", es decir, cuando el cuerpo entra en contacto por segunda vez con el agente extraño,

puede emitir una respuesta inmunitaria más rápida y en mayor intensidad que la primera. Dentro de la Inmunidad específica encontramos la Inmunidad celular, basada principalmente en respuestas mediadas por células (linfocitos T citotóxicos y colaboradores principalmente), y la Inmunidad humoral, que es la Inmunidad mediada por anticuerpos (Smith y Wood, 1997).

Al igual que el sistema inmune, el sistema nervioso es de gran relevancia debido a que el trabajo de recoger la información del medio ambiente y del interior del cuerpo, así como de integrar esa información y generar respuestas que sean apropiadas a las situaciones percibidas corresponde a las células de este sistema (Randall et al., 1997). Un claro ejemplo de la importancia del sistema nervioso es el aprendizaje, que puede definirse como el proceso por medio del cual adquirimos nuevos conocimientos acerca de los eventos del mundo (Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá, 2001), y se constituye como un medio importante por el que los organismos sobreviven a su medio ambiente (Ader y Cohen, 2001).

Por mucho tiempo el sistema nervioso y el sistema inmune fueron considerados como independientes así, el sistema inmune se consideró como un sistema autónomo, y por lo tanto autorregulatorio, con lo cual se le ha definido innecesariamente como la agencia de defensa que es independiente del sistema nervioso (Ader, 2000).

Interacciones entre el sistema inmune y el sistema nervioso

La Psiconeuroinmunología, surgida en los últimos 25 años, estudia las interacciones entre los procesos endocrinos, neurales e inmunológicos (Solomon, 1987; Ader, 1992). Hallazgos recientes sugieren que procesos inmunoregulatorios son en realidad influenciados por el cerebro y, a la inversa, funciones neurales y endocrinas están influenciadas por el sistema inmune. (Ader, 2000)

También se ha encontrado que los tejidos linfoides se encuentran expuestos no solamente a las hormonas en circulación, sino que también están inervados por el sistema nervioso autónomo; por lo tanto, inervaciones noradrenérgicas simpáticas pueden interactuar con células linfocitárias. Además las células linfoides tienen receptores que unen y responden a la liberación de neurotransmisores (revisado por Grossman et al., 1992), y se ha reportado que la producción de anticuerpos se acompaña de cambios eléctricos y químicos en el cerebro (citado en Ader, 1992)

Una parte de los estudios realizados en el campo de la Psiconeuroinmunología se basan en la información que se tienen acerca de las vías anatómicas que comunican a ambos sistemas (Dhabar et al., 1995; Berczi et al., 1998; Cremaschi et al., 2000; Scaccianoce et al., 2000; Pacheco-López et al., 2002;) y en la participación de moléculas de origen inmune en el sistema nervioso y viceversa (Farrar et al., 1987; Dantzer et al., 1993; Straub et al., 1998)

En el caso de moléculas de origen neuroendocrino que tienen participación o influencia en el sistema Inmune se ha reportado por ejemplo que la adrenocorticotropina induce una reducción de la actividad de las células NK (asesinas naturales) (Jain et al., 1991; Pérez y Lysle, 1995); mientras que la sustancia P se cree que puede mediar, al menos en parte, un aumento en los niveles de IL-1, IL-6 y el IFN- α por estrés (revisado por Espinosa y Bermúdez, 2001).

Los estudios sobre la conducta también han sido importantes para demostrar las interacciones entre el sistema nervioso central y el sistema Inmune (Grossman et al., 1992). Dentro de este campo destaca el estudio del efecto del estrés sobre la Inmunidad (Laudenslager et al., 1988; Irwin et al., 1990; Hermann et al., 1994). Estos trabajos ponen de manifiesto una comunicación bidireccional entre el sistema nervioso y el sistema Inmune, desechando poco a poco la idea de un sistema Inmune autorregulado y, por consiguiente, independiente del sistema nervioso

El condicionamiento pavloviano como modelo de comunicación neuro-inmune

Un modelo de estudio utilizado para demostrar el papel del sistema nervioso en la modulación de la Inmunidad es el condicionamiento clásico (Ader y Cohen, 2001). A pesar de que los estudios más viejos sobre interacciones entre el sistema Inmune y el sistema nervioso usando paradigmas de condicionamiento son los realizados por investigadores soviéticos a principios del siglo XX (Metal'nikov y Chorine, 1926 revisado en

Ader, 2003), no es sino hasta la década de 1970's cuando se retoman los estudios de Interacciones neuro-Inmunes usando paradigmas de condicionamiento clásico.

La metodología básica del Condicionamiento Pavloviano inicia con un estímulo incondicionado (EI) biológicamente significativo, el cual provoca una respuesta Incondicionada (RI), por ejemplo, comida como el EI y salivación como la RI. El EI es asociado con un estímulo condicionado (EC) neutro, por ejemplo una campana; después de un determinado número de entrenamientos asociativos entre ambos estímulos, el EC adquiere la habilidad de evocar la respuesta por sí mismo. Cuando la respuesta ocurre ante el estímulo condicionado se le llama respuesta condicionada (RC) (Anderson, 2001). El condicionamiento clásico es un fenómeno de aprendizaje y memoria que implica la asociación por el sistema nervioso de los estímulos condicionado e incondicionado durante la adquisición del condicionamiento; implica también el almacenamiento de esta información a largo plazo, la cual se manifestará posteriormente en la evocación en la cual, el sistema nervioso detecta el estímulo condicionado y con ello incide en la realización de la respuesta condicionada (revisado por Espinosa y Bermúdez, 2001).

El condicionamiento Pavloviano ha sido usado para demostrar influencias de la conducta sobre la inmunidad, esto ha mostrado que la respuesta inmune humoral y celular puede ser modificada a través de un condicionamiento clásico de aprendizaje (Grossman et al., 1992; Álvarez-Borda et al., 1995). Aunque algunos estudios han utilizado un modelo de condicionamiento para suprimir algunas de las funciones de la respuesta inmune (Ader y Cohen,

1975; Gorczynski, 1991; Exton et al., 2000) también existen estudios enfocados a lograr activaciones condicionadas de las funciones de la respuesta inmune, por ejemplo la actividad de las células asesinas naturales (revisado por Ader y Cohen, 2001).

Gorczyński y sus colaboradores (Gorczyński et al., 1982) introducen el uso de un antígeno como estímulo inmunoactivador, en un estudio en ratones en el que reportan un aumento de precursores de células T citotóxicas en respuesta a la reexposición al EC por sí solo. En este experimento se utiliza un aloinjerto¹ como estímulo incondicionado, mientras que el ambiente que envolvió al procedimiento quirúrgico, es decir, el lugar, la anestesia, la manipulación, etc., fueron utilizados como estímulo condicionado.

Existen también dos trabajos importantes que han demostrado un papel relevante del sistema nervioso en la expresión de respuestas inmunes (reacciones alérgicas) mediante el uso de un procedimiento de condicionamiento Pavloviano. En el primer estudio, se reporta liberación de histamina en cobayos como consecuencia de un procedimiento de condicionamiento clásico y la consecuente reexposición a un olor (que actuó como estímulo condicionado) el cual fue asociado con un cambio inmunológico (estímulo incondicionado) de una manera contingente (Russell et al., 1984). En el segundo estudio, lograron que mastocitos liberadores de proteasa II fueran producidos en ratas, por la reexposición a un estímulo audiovisual (estímulo condicionado) el cual anteriormente fue asociado con una inyección subcutánea

¹ Aloinjerto se refiere a un trasplante de piel cuyo donante es una animal de la misma especie pero de diferente cepa

de albúmina de huevo, que fungió como estímulo incondicionado (MacQueen et al., 1989)

Condicionamiento de la respuesta de anticuerpos.

En el modelo de activación condicionada de la producción de anticuerpos, la administración del antígeno es apareada a un estímulo gustativo u olfativo. Después de que la respuesta de anticuerpos inicial regresa a sus niveles basales, la reexposición al sabor u olor (evocación) da lugar a una reactivación de los niveles de anticuerpos (revisado por Espinosa y Bermúdez, 2001). Existen tres trabajos que demostraron un aumento en los niveles de anticuerpos como resultado del apareamiento de un EC novedoso con un antígeno de origen proteico como EI (Ader et al., 1993; Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001).

Ader y sus colegas (Ader et al., 1993) condicionaron los efectos inmunológicos de la hemocianina (KLH) una proteína encargada del transporte de oxígeno en Moluscos y Artrópodos que tiene características notables entre las cuales se destacan: su gran tamaño y sus numerosos centros de coordinación de oxígeno mediante átomos de Cu^{+2} , los cuales le confieren un color azul intenso cuando la proteína está oxigenada, en contraposición al estado en que la hemocianina está desoxigenada y adquiere un color grisáceo. La hemocianina se utiliza en el campo de la investigación como insumo para producir anticuerpos en animales de experimentación. Como es una proteína que está presente en la linfa (la sangre) de moluscos, cuando se le inyecta a

los mamíferos (a una distancia evolutiva mucho mayor) la reacción de estos es producir contra ella muchos anticuerpos (Harris y Markl, 1999).

En el trabajo realizado por Ader (Ader et al., 1993) se asoció un estímulo condicionado gustativo con una baja dosis de hemocianina como antígeno, usando cinco ensayos de apareamiento entre ambos estímulos, cada ensayo fue separado por un intervalo de 3 a 4 semanas. El EC usado en éste experimento fue una solución de leche con chocolate, mientras que el EI fue una dosis de KLH (100 ng/0.2 ml). Los entrenamientos de adquisición consistieron en una hora de exposición al EC, seguido por una inyección intraperitoneal del EI. La prueba de evocación consistió en reexponer al grupo experimental al EC, mientras que los grupos controles pudieron ser o no reexpuestos a dicho estímulo, cabe destacar que en la evocación los animales de todos los grupos recibieron una dosis baja ("refuerzo") de KLH.

Los niveles de anticuerpos anti-KLH en los animales del grupo experimental no difirieron con los niveles de los animales de uno de los grupos control que fue reinyectado con la dosis experimental de KLH (100 ng/0.2 ml) durante la evocación. Por otro lado el grupo experimental sí presentó niveles mayores de anticuerpos comparado con los otros grupos control que no fueron reinyectados con KLH. Estos resultados muestran un aumento condicionado de la respuesta de anticuerpos, lo cual apoya la idea de usar antígenos como estímulo incondicionado, aunque también abren la posibilidad de que el aumento condicionado de anticuerpos sólo sea posible al exponer a los animales al estímulo incondicionado en una dosis mínima durante la evocación, lo cual apoyaría la creencia de un proceso asociativo entre ambos estímulos.

Otro trabajo importante relacionado con el aumento condicionado de anticuerpos, es el presentado por Álvarez-Borda y sus colegas (Álvarez-Borda et al., 1995), en el que se evaluó la producción de anticuerpos como resultado de un condicionamiento. Cabe destacar que en dicho trabajo emplearon un solo entrenamiento asociativo entre el EC (sacarina) y el EI (inyección intraperitoneal de lisozima de huevo de gallina). En el día de la adquisición los animales del grupo experimental recibieron una solución de sacarina al 0.1 % por 10 minutos, seguida de una inyección intraperitoneal de 0.3 ml de Lisozima de Huevo de Gallina (HEL, 500 µg/ml). Durante la prueba de evocación (veinticinco días después de la adquisición) los animales del grupo experimental fueron reexpuestos a una solución de sacarina al 0.1 % por 10 minutos.

Los resultados presentados por Álvarez-Borda y sus colaboradores (Álvarez-Borda et al., 1995) muestran niveles mayores de anticuerpos IgG e IgM en los días posteriores a la evocación en el grupo experimental en la dilución 1/50 de las muestras, esto comparado con los grupos controles; además dichos niveles no presentaron diferencias estadísticas con la respuesta secundaria de anticuerpos normal. A partir de estos resultados Álvarez-Borda y sus colegas, concluyeron que su experimento demostró que un sólo entrenamiento asociativo entre el EC y el EI son suficientes para aumentar la respuesta de anticuerpos y que ésta puede ser muy similar en magnitud y tiempo a la respuesta secundaria normal, además mencionan que sus datos muestran que dicho aumento condicionado de anticuerpos es independiente de la reexposición a una dosis mínima del EI durante la evocación. Por último,

éste trabajo soporta los hallazgos de que un antígeno puede ser usado como estímulo incondicionado.

El trabajo realizado por Madden (Madden et al., 2001) estuvo enfocado a replicar el trabajo de Álvarez-Borda (Álvarez-Borda et al., 1995), pero realizando dos modificaciones al protocolo original, estas consistieron en realizar la prueba de reexposición al EC (evocación), 45 días después del entrenamiento de adquisición y no 25 días después como se llevó a cabo en el trabajo de Álvarez-Borda (Álvarez-Borda et al., 1995), la otra diferencia fue la obtención de muestras de sangre en los animales experimentales, pocos días antes de la evocación, además de las muestras basales y posteriores a la evocación. Madden y sus colegas reportan que sólo encontraron diferencias en los niveles de IgG posteriores a la reexposición a la sacarina entre los grupos en una de las tres diluciones (1/270) que llevaron a cabo. Este trabajo confirma los resultados de Álvarez-Borda (Álvarez-Borda et al., 1995), aunque sugiere un efecto significativo pero menor al encontrado por nuestro grupo. Sin embargo ésta discrepancia puede ser atribuida a las diferencias en tiempo en los dos experimentos entre la adquisición y la evocación.

2. Planteamiento del problema.

En la actualidad, el fenómeno de activación condicionada de la respuesta de anticuerpos a partir de un solo entrenamiento asociativo, ha sido demostrado completamente sólo para la lisozima de huevo de gallina (HEL) (Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001). Las principales condiciones de los estímulos bajo las cuales se ha logrado ésta activación condicionada son el uso de una dosis del EI a una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ (HEL). Por otro lado, la sacarina que es utilizada como EC, se presenta en una concentración del 0.1%. En la bibliografía, no existe ningún trabajo que demuestre un aumento condicionado de la respuesta de anticuerpos bajo estas condiciones usando otro antígeno diferente a la HEL.

Por lo tanto, en el presente trabajo se usó una dosis de 50 $\mu\text{g/ml}$ de KLH como EI, dosis que proporciona una respuesta de anticuerpos perceptible (Espinosa et al., 2002). Adicionalmente, se modificó la concentración de sacarina usada como EC (0.15%) con la finalidad de hacerlo más sobresaliente y con ello facilitar su asociación con el EI.

3. Hipótesis.

Si el aumento condicionado de la respuesta de anticuerpos usando un solo entrenamiento asociativo es generalizable para todos los antígenos de origen proteico entonces utilizando hemocianina como estímulo Incondicionado, esperamos obtener un aumento en los niveles de anticuerpos como resultado de un procedimiento de condicionamiento.

4. Objetivo.

El presente trabajo está enfocado a analizar la reproducibilidad del condicionamiento de la respuesta de anticuerpos en un sólo entrenamiento asociativo, originalmente descrito para la lisozima, pero usando hemocianina como estímulo incondicionado.

5. Metodología.

5.1 Animales.

Se usaron 50 ratas Wistar de un peso entre los 250 y 300 gr al inicio del experimento, separadas en cajas individuales en un cuarto con ciclo invertido de luz oscuridad 12 por 12 horas con comida y agua *ad libitum*. Las manipulaciones se realizaron a las 9 a.m., después de dos semanas para permitirles la aclimatación a las condiciones del bioterio. Después de éste tiempo, se obtuvieron nuevamente los pesos de las ratas y se hicieron 5 grupos, un grupo experimental que fue reexpuesto al EC durante la evocación (CS), un grupo control con el mismo tratamiento que el experimental pero sin la reexposición al EC (CS₀), un grupo pre-expuesto al EC antes de la adquisición (pCS), un grupo que no es expuesto al EC durante la adquisición pero sí durante la evocación (NC) y un grupo reexpuesto al EI solamente durante la evocación (UCS). Los grupos se organizaron en función al peso de los animales, de manera tal que no existieran diferencias significativas en peso entre ellos.

5.2 Entrenamiento de Adquisición².

Cinco días antes del entrenamiento de adquisición, los animales fueron privados de agua, la cual les era administrada durante 15 minutos por la mañana (9:00 a.m.) y 15 minutos por la noche (8:00 p.m.), usando bebederos graduados, para conocer el consumo basal de los animales, además de

² En esta etapa se lleva a cabo el entrenamiento de asociación entre el estímulo condicionado y el estímulo incondicionado.

entrenar a los animales a beber únicamente cuando se les colocara el bebedero y a cierta hora; todos los animales, a excepción de los del grupo pCS, recibieron agua durante las dos sesiones diarias de consumo, los animales del grupo pCS recibieron por la mañana una solución de sacarina (Sigma) al 0.15 % en agua desionizada y por la noche, recibieron solamente agua. Previo a éste tratamiento de adquisición los animales fueron reagrupados, a excepción de los del grupo preexpuerto, para obtener cuatro grupos sin diferencias estadísticas en consumo de agua y peso.

Tabla 1. Tratamiento por Grupo durante la adquisición y la evocación

Grupo (n=10)	Entrenamiento Previo a la adquisición. (Día -4)	Tratamiento de adquisición (Día 0)	Entrenamiento Previo a la evocación. (Día 41)	Tratamiento durante la evocación (Día 46)
CS	Agua	EC + EI	Agua	EC
CSo	Agua	EC + EI	Agua	Agua
pCS	Sacarina*	EC + EI	Agua	EC
NC	Agua	Agua + EI	Agua	EC
UCS	Agua	EC + EI	Agua	Agua + EI

***Recibió sacarina al 0.15 % solo por la mañana, en los consumos nocturnos, se le dio agua. EC = Estimulo Condicionado (sacarina 0.15 %); EI = Estimulo Incondicionado (0.5 ml de KLH 50 µg/ml)**

El día de la adquisición, las manipulaciones fueron hechas a las 9:00 a. m. Se les presentó a los animales agua o sacarina (Sigma), según el grupo al que pertenecen (ver tabla 1), durante 15 minutos. Posterior a este consumo, se les inyectó intraperitonealmente 0.5 mililitros de una solución de hemocianina (KLH, 50 µg/ml, Pierce Chemical) en solución salina; la concentración de la solución de sacarina fue del 0.15%.

5.3 Evocación³ (Día 46).

Cinco días antes de la evocación los animales fueron privados de agua y se les entrenó nuevamente para consumir agua únicamente 15 minutos por la mañana (9:00 a.m.) y 15 minutos por la noche (8:00 p.m.). Las manipulaciones se realizaron a la misma hora que en la adquisición (9:00 a.m.) y consistió en darles de beber por 15 minutos agua a los animales de los grupos CSo y UCS; y sacarina (Sigma) los animales de los grupos CS, pCS y NC (ver tabla 1). Después de éste consumo, sólo los animales del grupo UCS recibieron una inyección intraperitoneal de 0.5 ml de una solución de hemocianina (KLH, 50 µg/ml, Pierce Chemical) en solución salina.

5.4 Obtención de muestras de sangre

Se obtuvieron muestras de sangre previo al entrenamiento de adquisición (muestras basales), al día 43 posterior a la adquisición (muestra pre-evocación) y a los 4, 8, 12 y 16 días posteriores a la evocación (días 50, 54, 58 y 62 del experimento). Para obtener la sangre, los animales fueron anestesiados por inhalación de CO₂, una vez dormido el animal se le extrajeron 0.5 ml de sangre del tejido ubicado en la parte anterior del ojo. De esas muestras se obtuvieron las células blancas por centrifugación, las cuales fueron colectadas en tubos eppendorf nuevos y almacenadas a -82°C para determinar posteriormente los niveles de anticuerpos mediante la prueba de ELISA⁴.

³ En este día se realiza la reexposición del grupo CS al EC.

⁴ Siglas en ingles de Enzyme Linked Immuno Sorben Assay.

5.5 Prueba de ELISA.

La prueba de ELISA se llevó a cabo de la siguiente manera: se preparó una solución de buffer de carbonatos (NaHCO_3 ; $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$; pH de 9.6), y se le agregó KLH a una concentración de $0.5 \mu\text{l/ml}$; de esta solución se colocaron $100 \mu\text{l}$ en cada uno de los 96 pozos de la placa para ELISA y se dejó incubando la placa a temperatura ambiente toda la noche.

Al siguiente día se lavaron las placas y se les bloqueó con $250 \mu\text{l}$ por pozo de una solución de bloqueo por una hora; después se colocaron las muestras y los controles en cada una de las placas, tal y como se observa en la figura 1. Se hicieron siete diluciones sucesivas $1/2$ de la muestra a partir de la dilución $1/50$, siendo la última la dilución $1/6400$.

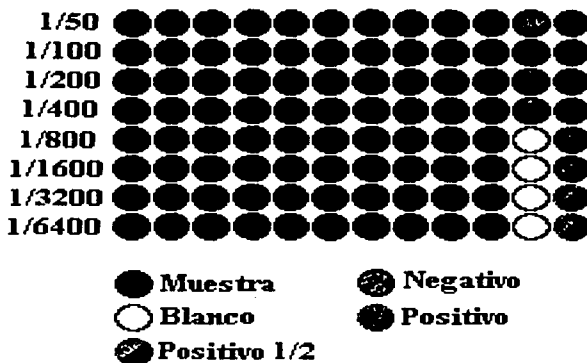


Figura 1. Patrón de distribución de las muestras y controles en cada placa de ELISA. Las diluciones de $1/50$ a $1/6400$ se distribuyeron horizontalmente, llevando cada muestra su duplicado. Los controles positivos, negativo y el blanco se colocan en las dos últimas columnas.

Para el subtipo IgG el conjugado utilizado es anti IgG de rata (Pierce Chemical) a una dilución 1/5000 en solución de bloqueo (caseína al 5 %), se dejó incubar dos horas a 37°C; por otro lado para el subtipo IgG2a se colocó primero un conjugado blotinilado preparado en ratón anti IgG2a de rata (Zymed) diluido 1/1000 en solución de bloqueo de albúmina sérico bovina al 0.25 % (Sigma) y TWEEN al 0.05 % (Sigma) en PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.9 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8.1 mM; NaCl, 154 mM; pH 7.4,) dos horas después se le colocó un conjugado de streptavidina peroxidasa de rábano (Zymed) diluido 1/8000 en solución de bloqueo de albúmina sérico bovina al 0.25 % (Sigma) y TWEEN al 0.05 % (Sigma) en PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.9 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8.1 mM; NaCl, 154 mM; pH 7.4), dejando incubar las placas dos horas a 37°C entre cada conjugado. Dos horas después de los conjugados se les colocó a cada placa 100 μl de una solución reveladora de ABTS (Sigma) al 0.1 % mas H_2O , (Merck) al 0.1 % en solución buffer de ácido cítrico (0.1M, pH 4.2) por pozo y se incubaron a 37°C por 20 minutos. Una vez transcurrido éste tiempo se leyó la absorbancia de los pozos en un espectrofotómetro a 405 nm de longitud de onda, obteniendo valores de absorbancia para cada muestra y su duplicado, se guardaron en tablas de Excel para su análisis posterior.

5.6 Análisis estadístico

Los valores de absorbancia obtenidos de cada muestra y su duplicado, pueden ser presentados en diferentes formas para el análisis estadístico, se presentan estos valores en tres formas diferentes: mediante absorbancias normalizadas, titulación de absorbancias crudas y titulación de absorbancias normalizadas.

Para la transformación de absorbancias a absorbancias normalizadas se obtiene primero el valor promedio de la absorbancia de cada muestra y su duplicado, éste valor se divide a su vez entre la absorbancia del control positivo obteniendo así un valor único de absorbancia normalizada.

Para el reporte de titulación de absorbancias crudas, se obtiene primero un valor promedio entre la absorbancia de la muestra y su duplicado, para obtener así, ocho valores de absorbancia, uno para cada dilución de la muestra; a partir de estos valores y del valor del control negativo de cada muestra se usa una regresión para buscar la recta que se acerque más a estos valores y a partir de ella predecir en qué dilución encontramos el valor correspondiente a 2.5 veces más el valor del control negativo de la placa (valor de título). El proceso de titulación de absorbancias normalizadas es idéntico al de la titulación de absorbancias crudas, la diferencia es que los valores de la muestra y del control negativo son normalizados y a partir de esta normalización se aplica la regresión.

Una vez obtenidos los valores, se les aplicó una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) para la comparación entre los grupos en los diferentes días del experimento, en los casos que existieron diferencias estadísticas se aplicó una prueba post-hoc de Fisher para determinar entre qué grupos existían las diferencias.

6. Resultados.

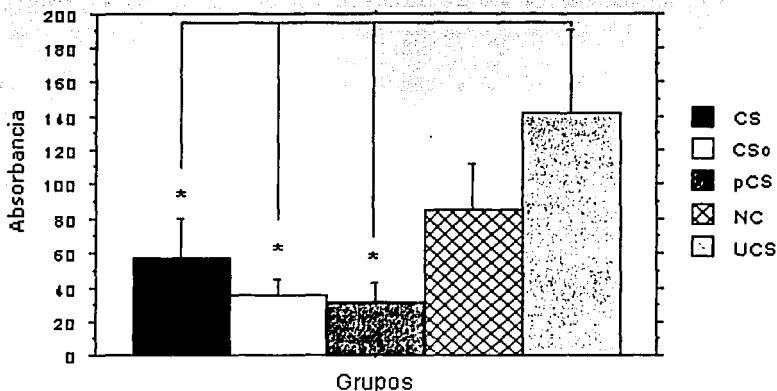
Dado que en éste experimento se contó con un grupo preexpuesto al EC, los animales de éste grupo fueron asignados, distribuyendo equitativamente a los animales en 5 grupos sin diferencias en peso, usando una prueba de ANOVA. Previo al tratamiento de adquisición todos los animales, a excepción de los del grupo pCS, fueron reagrupados, y mediante el uso de una prueba de análisis de varianza, fueron reubicados en cuatro grupos sin diferencias significativas en consumo basal de agua, ni en peso.

6.1 Efectos del tratamiento de Adquisición.

En los análisis estadísticos la prueba de ANOVA aplicada a los títulos de absorbancias normalizadas, mostró diferencias significativas en los niveles basales de anticuerpos IgG2a entre grupos ($F_{4,40} = 3.144$; $p < 0.05$); el análisis post-hoc de Fisher muestra que las diferencias se encuentran entre el grupo UCS con los grupos CS ($p < 0.05$), CSo ($p < 0.05$) y pCS ($p < 0.05$) (Gráfica 1); por lo que el grupo UCS fue excluido, una vez eliminado el grupo UCS la prueba de ANOVA no mostró diferencias entre los 4 grupos restantes.

Se analizaron las muestras basales y de los niveles previos a la evocación (Día 43) con la finalidad de conocer las diferencias en niveles de anticuerpos ocasionadas por recibir alguno de los tres tratamientos durante la adquisición, así como para formar dos grupos (CS y CSo) sin diferencias en niveles de anticuerpos antes de la evocación. Para comparar las diferencias en los niveles de anticuerpos anti-KLH ocasionadas por el tratamiento de adquisición, los animales fueron clasificados en uno de tres tratamientos que

recibieron durante la adquisición (ver tabla 1), los tres tratamientos son: animales no condicionados (los animales del grupo NC), animales condicionados (los animales de los grupo CS y CSo) y animales preexuestos (animales del grupo pCS).



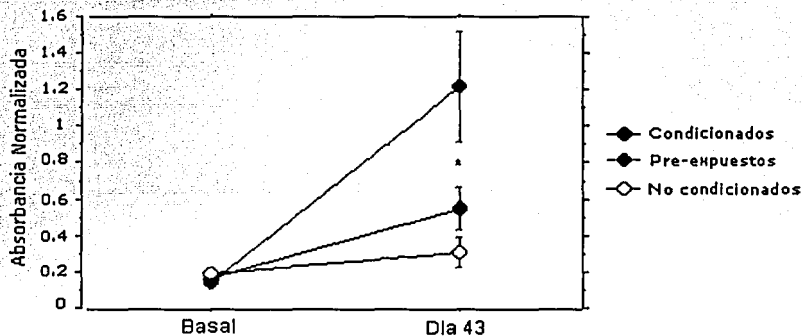
Gráfica 1. Determinación de los niveles basales de anticuerpos anti-KLH por grupos (Promedio ± Error Estándar). Se observan diferencias significativas al comparar el grupo UCS con los grupos CS, CSo y pCS ($F_{4,40}=3.144$; $p<0.05$). * $p<0.05$.

Los resultados se presentan en tres formas diferentes para cada subtipo de anticuerpo, es decir, se reportan las absorbancias normalizadas en ocho diluciones sucesivas, los títulos obtenidos mediante absorbancias sin normalizar y los títulos obtenidos a partir de absorbancias normalizadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgG.

Cuando comparamos las absorbancias normalizadas para IgG en la dilución 1/50 usando una prueba de análisis de varianza, no observamos diferencias significativas en los niveles basales entre los animales de los tres tratamientos. Sin embargo, en los niveles previos a la evocación (día 43) observamos diferencias entre los grupos ($F_{2,35} = 4.252$; $p < 0.05$), la prueba post-hoc de Fisher muestra que los animales preexpuestos presentan niveles mayores de IgG en el día 43, en comparación con los animales condicionados ($p < 0.05$) y con los no condicionados ($p < 0.05$). (Gráfica 2)

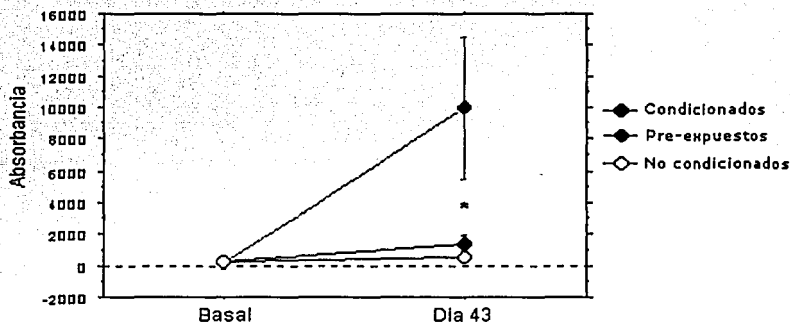


Gráfica 2. Absorbancias normalizadas de los niveles de IgG para la dilución 1/50 de los animales agrupados por tratamiento de adquisición (Promedio ± Error Estándar). En las muestras basales no existen diferencias significativas entre los grupos, mientras que en las muestras previas a la evocación (día 43) se observan diferencias ($F_{2,35} = 4.252$; $p < 0.05$). * $p < 0.05$.

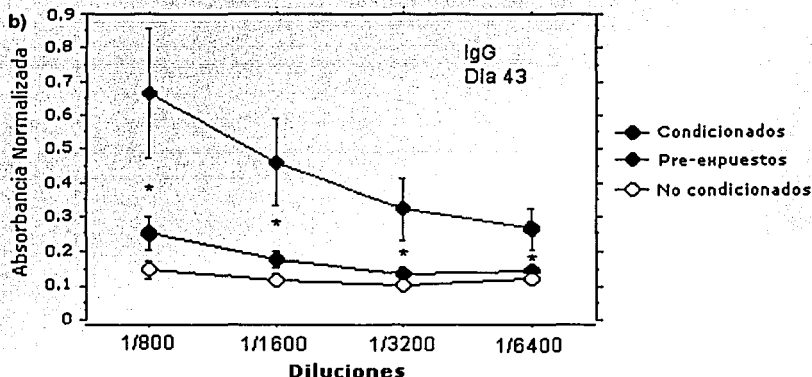
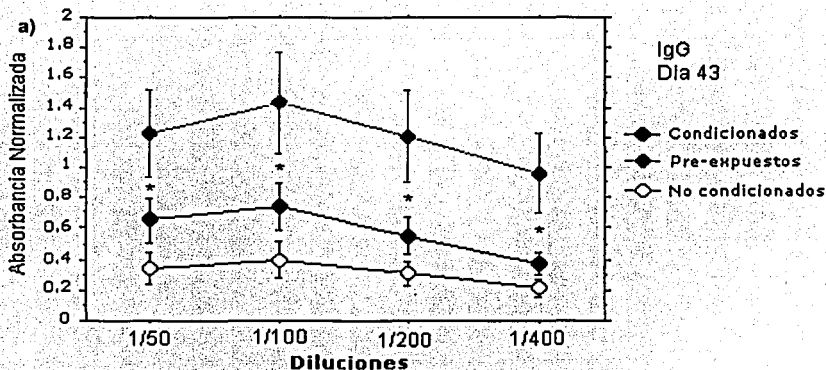
El efecto observado en las absorbancias normalizadas para IgG en las muestras previas a la evocación (día 43) en la dilución 1/50, también está presente en las diluciones 1/100 ($F_{2,35} = 4.758$; $p < 0.05$), 1/200 ($F_{2,35} = 5.470$; $p < 0.05$), 1/400 ($F_{2,35} =$; $p < 0.05$), 1/800 ($F_{2,35} = 6.375$; $p < 0.05$), 1/1600

($F_{2,35} = 6.851$; $p < 0.05$), $1/3200 F_{2,35} = 6.356$; $p < 0.05$) y $1/6400 F_{2,35} = 5.693$; $p < 0.05$). La prueba post-hoc de Fisher's muestra que en todas las diluciones los animales preexpuestos presentan mayores niveles de IgG en comparación con los animales condicionados ($p < 0.05$) y los no condicionados ($p < 0.05$) (Gráfica 4).

Por el contrario, en los niveles basales de IgG no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos en ninguna de las ocho diluciones. Las diferencias entre tratamientos en las muestras previas a la evocación (día 43) encontradas al analizar las absorbancias normalizadas para IgG, también se observan usando la titulación de absorbancias normalizadas y la titulación con absorbancias crudas ($F_{2,35} = 4.962$; $p < 0.05$). Además, los datos de titulación mediante absorbancias crudas y normalizadas muestran que no existen diferencias significativas entre tratamientos en los niveles basales de anticuerpos IgG (Gráfica 3).



Gráfica 3. Titulación de absorbancias crudas de los niveles de IgG en las muestra basales y del día 43 (Promedio \pm Error Estándar). En las muestras basales no existen diferencias entre los tratamientos, mientras que en el día 43 se observan diferencias entre estos ($F_{2,35} = 4.962$; $p < 0.05$). * $p < 0.05$.

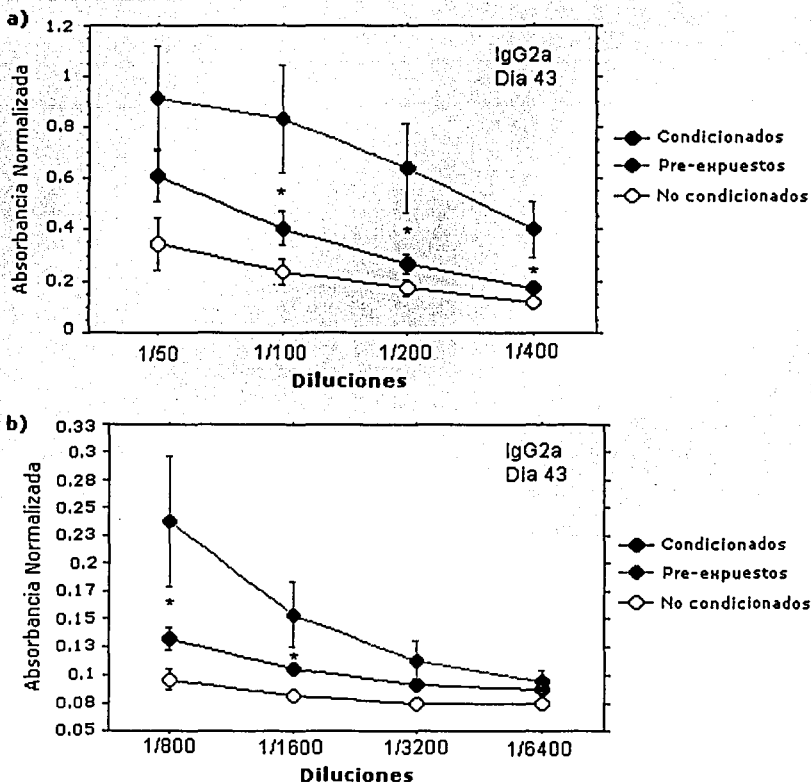


Gráfica 4. Absorbancias normalizadas de los niveles de IgG en el día 43 de los animales agrupados por tratamiento de adquisición (Promedio \pm Error Estándar). En las 8 diluciones sucesivas se observan diferencias estadísticas significativas entre los animales pre-expuestos, con los animales condicionados y los no condicionados ($p < 0.05$). a) Se muestran las cuatro primeras diluciones (1/50, 1/100, 1/200 y 1/400); b) Se muestran las últimas cuatro diluciones (1/800, 1/1600, 1/3200 y 1/6400). * $p < 0.05$

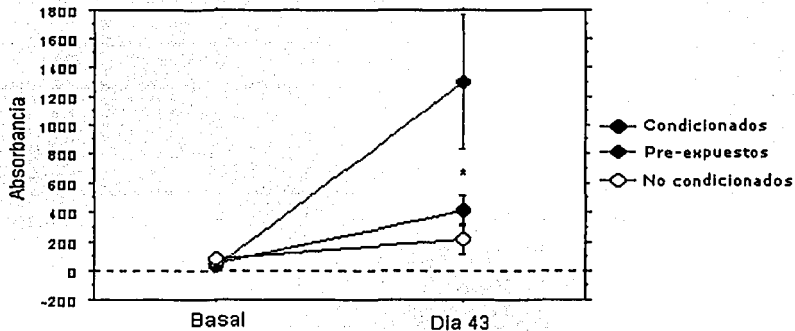
IgG2a

Cuando comparamos las absorbancias normalizadas para IgG2a en la dilución 1/50 usando una prueba de análisis de varianza, no observamos diferencias significativas en los niveles basales entre los animales de los tres tratamientos, tampoco observamos diferencias entre tratamientos en el día 43.

Al igual que en la dilución 1/50, en las siguientes siete diluciones la prueba de ANOVA muestra que no existe diferencia entre tratamientos en los niveles basales de IgG2a; por el contrario, la prueba de ANOVA muestra diferencias significativas entre tratamientos de adquisición en los niveles de IgG2a el día 43 en las diluciones 1/100 ($F_{2,35} = 4.561$; $p < 0.05$), 1/200 ($F_{2,35} = 5.395$; $p < 0.05$), 1/400 ($F_{2,35} = 5.175$; $p < 0.05$), 1/800 ($F_{2,35} = 4.637$; $p < 0.05$) y 1/1600 ($F_{2,35} = 3.835$; $p < 0.05$), mientras que para las diluciones 1/3200 y 1/6400 las diferencias encontradas en las diluciones anteriores, ya no son perceptibles. La prueba post-hoc de Fisher's nos muestra que en el día 43 los animales preexpuestos tienen mayores niveles de IgG2a en comparación con los animales condicionados ($p < 0.05$) y los no condicionados ($p < 0.05$) (Gráfica 5). Por otro lado, en los niveles basales no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos ni en la titulación de absorbancias crudas ni en la titulación de absorbancias normalizadas. Sin embargo, las diferencias estadísticas entre tratamientos observadas en la prueba de ANOVA en los niveles de IgG2a en el día 43 usando absorbancias normalizadas, también pueden observarse cuando los niveles de IgG2a se reportan utilizando titulación de absorbancias crudas ($F_{2,35} = 4.932$; $p < 0.05$) (ver gráfica 6) y titulación de absorbancias normalizadas ($F_{2,35} = 5.180$; $p < 0.05$).



Gráfica 5. Absorbancias normalizadas en todas las diluciones para IgG2a en el día 43 (Promedio \pm Error Estándar). a) Muestra diferencias estadísticas entre tratamientos en las diluciones 1/100 ($F_{2,35} = 4.561$; $p < 0.05$), 1/200 ($F_{2,35} = 5.395$; $p < 0.05$) y 1/400 ($F_{2,35} = 5.175$; $p < 0.05$), mientras que en la dilución 1/50 no existen diferencias. b) Se observan diferencias estadísticas entre tratamientos en las diluciones 1/800 ($F_{2,35} = 4.637$; $p < 0.05$) y 1/1600 ($F_{2,35} = 3.835$; $p < 0.05$), en las diluciones 1/3200 y 1/6400 no existen diferencias. * $p < 0.05$.



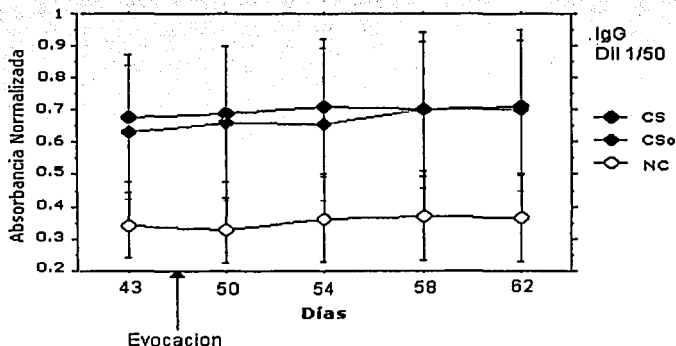
Gráfica 6. Titulación de absorbancias crudas para IgG2a en los niveles basales y del día 43 (Promedio ± Error Estándar). Se observan diferencias estadísticas entre tratamientos el día 43 ($F_{2,35} = 4.932$; $p < 0.05$), en los niveles basales no existen diferencias. * $p < 0.05$.

La prueba post-hoc de Fisher nos muestra que en la titulación de absorbancias crudas los animales preexpuestos tienen mayores niveles de IgG2a en el día 43, comparados con los animales condicionados ($p < 0.05$) y los no condicionados ($p < 0.05$); resultados similares se obtienen al utilizar titulación de absorbancias normalizadas.

Por otra parte, los animales condicionados, es decir, los del grupo CS y el grupo CS₀, fueron reagrupados previo a la evocación en dos grupos ($n = 10$) sin diferencias estadísticas en los niveles de anticuerpos usando una prueba de ANOVA y tomando en cuenta que hasta ese momento (día 43) estos animales habían recibido exactamente el mismo tratamiento, además de encontrarse bajo las mismas condiciones, esto con la finalidad de obtener dos grupos sin diferencias en los niveles de anticuerpos previos a la evocación.

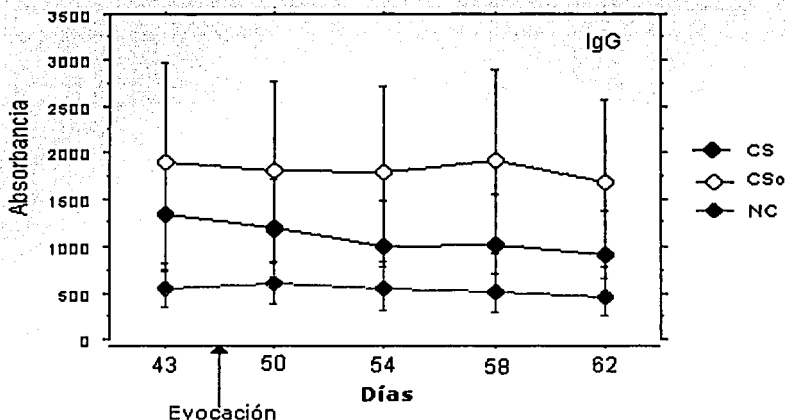
6.2 Efectos del Condicionamiento.

Para el análisis de los resultados con la finalidad de evaluar el condicionamiento de la respuesta de anticuerpos, los animales del grupo pCS fueron excluidos debido a sus elevados niveles de IgG e IgG2a en el día 43 del experimento (pre-evocación). Para fines de evaluar el condicionamiento, se compararon los niveles de anticuerpos IgG e IgG2a en los grupos NC, CS y CS_o, durante los días experimentales 43 (pre-evocación), 50, 54, 58 y 62 (post-evocación). En el análisis de varianza (ANOVA) de las absorbancias normalizadas de la dilución 1/50 para los niveles de IgG, no observamos diferencias entre grupos en los días 43, 50, 54, 58 y 62 (Gráfica 7). En las siguientes siete diluciones (1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 y 1/6400) tampoco se observan diferencias estadísticas entre grupos en los niveles de IgG durante la muestra pre-evocación (día 43) y las muestras post evocación (días 50, 54, 58, 62).



Gráfica 7. Niveles de anticuerpos IgG en la dilución 1/50 usando absorbancias normalizadas en los días previos y posteriores a la evocación (Promedio \pm Error Estándar). No existen diferencias entre grupos en ninguno de los días comparados (43, 50, 54, 58 y 62).

El análisis de varianzas de la titulación de absorbancias crudas, tampoco muestra diferencias en los niveles de IgG entre grupos (días 43, 50, 54, 58 y 62) (Gráfica 8), lo mismo ocurre al analizar la titulación de absorbancias normalizadas.

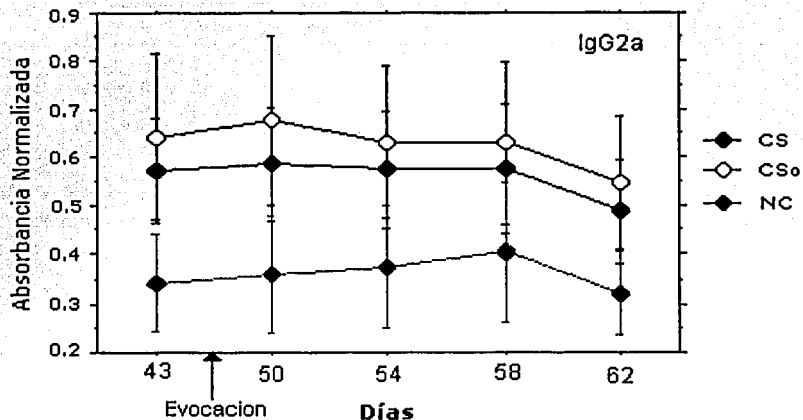


Gráfica 8. Titulación de absorbancias crudas para IgG en los días 43 y posteriores a la evocación (Promedio \pm Error Estándar). No existen diferencias estadísticas entre grupos en ninguno de los días comparados (43, 50, 54, 58 y 62).

IgG2a.

El análisis estadístico (ANOVA) de las absorbancias normalizadas muestra que no existen diferencias en los niveles de IgG2a ente los grupos experimentales (CS, CS₀ y NC) en la dilución 1/50 de las muestras en ninguno de los días experimentales comparados (días 43, 50, 54, 58 y 62). (Gráfica 9)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 9. Absorbancias normalizadas de los niveles de IgG2a en la dilución 1/50 de los días 43 y posteriores a la evocación (Promedio \pm Error Estándar). No existen diferencias estadísticas entre grupos experimentales en ninguno de los días comparados (43, 50, 54, 58 y 62).

Al igual que para la dilución 1/50, en las siguientes 7 diluciones tampoco observamos diferencias en los niveles de IgG2a entre los grupos experimentales en ninguno de los cinco días comparados. Al comparar los grupos experimentales usando titulación de absorbancias crudas y titulación de absorbancias normalizadas, tampoco se observan diferencias estadísticas entre grupos en los niveles de IgG2a en ninguno de los días comparados (43, 50, 54, 58 y 62).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

7. Discusión.

La Psiconeuroinmunología es un área prácticamente reciente, donde la mayor parte de los estudios y trabajos realizados, datan de hace aproximadamente 25 años (Solomon, 1987; Ader, 1992), por ende algunos de los fenómenos descritos aún están poco estudiados y se conoce realmente poco de ellos. Tal es el caso del aumento de anticuerpos usando un paradigma de condicionamiento pavloviano clásico.

Son pocos los trabajos en la literatura que han demostrado un aumento condicionado de anticuerpos, de hecho sólo se ha demostrado éste tipo de aumento de anticuerpos para dos antígenos, uno la hemocianina (Ader et al., 1993) y el otro la lisozima de huevo de gallina (Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001). Aunque hay algunos otros trabajos que lograron una activación condicionada de anticuerpos (Jenkins et al., 1983; Husband, A.J. et al., 1993), estos trabajos dejan muchas dudas debido a la ausencia de algunos grupos control que demuestren que el aumento en los niveles de anticuerpos fue debido a un proceso de condicionamiento.

En el presente trabajo estudiamos el fenómeno de activación condicionada de la respuesta de anticuerpos originalmente descrito para la lisozima (Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001) usando hemocianina como EI (Ader et al., 1993). Nuestros resultados posteriores a la evocación muestran que no existe diferencia estadística entre los animales de nuestro grupo experimental (CS) con los grupos control (CS0 y NC), esto es perceptible a lo largo de las ocho diluciones sucesivas de la muestra que realizamos en

éste trabajo. El uso de éstas ocho diluciones es de gran importancia para disminuir los posibles errores que ofrece la prueba de ELISA y que se ubican principalmente en los extremos del rango de diluciones (Butler, 1994), por lo que al ser constantes los resultados en todas o en la mayoría de las diluciones, esto nos proporciona un mayor grado de confianza en los datos.

Los resultados sin diferencia estadística entre el grupo CS, comparado con los grupos CS0 y NC, también están presentes cuando los datos obtenidos de los niveles de anticuerpos son presentados en titulación de absorbancias crudas y titulación de absorbancias normalizadas. Uno de los principales inconvenientes de la prueba de ELISA cuando se realiza un rango de diluciones es que las diluciones que se encuentran en los extremos de dicho rango normalmente dan señales por encima de los controles de la prueba, o bien señales que llegan al límite de detección del sistema; la importancia del uso de una curva de titulación de absorbancias radica en que únicamente considera para el análisis los datos que caen dentro de una "región de titulación", la cual omite el uso de datos por debajo del control negativo y las diluciones que llegan al límite de detección, disminuyendo con ello errores como el proporcionado por las uniones inespecíficas (Butler, 1994).

Nuestros datos sugieren la imposibilidad de lograr condicionar los efectos de la hemodanina, lo que puede atribuirse a diversas situaciones. Primero, se podría pensar que nuestro EC fue disminuido durante la evocación al no ser expuestos los animales a una inyección; se ha demostrado que el

ambiente⁵ dentro del cual se lleva a cabo el procedimiento de condicionamiento, puede fungir por sí solo como EC (Gorczynski et al., 1982), por lo que, al no administrar durante la evocación una inyección intraperitoneal, eliminamos un elemento de todos los que en teoría componen el EC (dentro del que se incluyen además la solución de sacarina como estímulo principal, así como el ambiente que rodea al procedimiento) y por lo tanto, la respuesta condicionada se vio disminuida (Brandon et al., 2000). Cabe destacar que dicha posibilidad queda descartada para éste trabajo, ya que en el estudio llevado a cabo por Álvarez-Borda y sus colegas (Álvarez-Borda et al., 1995) para la lisozima, replicado por Madden (Madden et al., 2001), no se reporta una exposición de los animales experimentales a una inyección durante la evocación y sin embargo sí reportan un aumento condicionado en los niveles de anticuerpos; no obstante dicha posibilidad no puede ser descartada al momento de intentar explicar las diferencias de ambos experimentos en los niveles de anticuerpos logrados a partir de un condicionamiento comparados con los niveles de una respuesta secundaria normal.

Un punto que debe ser tomado en cuenta es el hecho de que en éste trabajo fue necesario excluir a todo un grupo control (el grupo UCS) del análisis estadístico comparativo, por la diferencias existentes entre éste grupo con respecto a los demás en los niveles basales de anticuerpos contra hemocianina (antes del inicio del tratamiento); esto sugiere ampliamente la posibilidad de que algunos de nuestros animales ya hubieran estado expuestos

⁵ En el trabajo de Gorczynski en 1982 consideraron como ambiente el cuarto donde se llevo a cabo el procedimiento de condicionamiento, el procedimiento per se, el personal, etc.

con anterioridad al antígeno hemocianina, lo que pondría en duda a la hemocianina como buen modelo de respuesta primaria de anticuerpos. Cabe recordar que una de las diferencias existentes entre los trabajos de condicionamiento de la Ilosozima (Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001) con respecto al trabajo presentado para la hemocianina (Ader et al., 1993) es que los primeros lograron condicionar una respuesta primaria de anticuerpos, mientras que Ader condicionó una respuesta secundaria. Por lo tanto, existe la posibilidad de que el fenómeno de activación condicionada de anticuerpos usando un solo entrenamiento asociativo se pueda replicar únicamente para respuestas primarias de anticuerpos, lo cual excluiría a antígenos como la hemocianina que no son buenos modelos de ésta respuesta primaria.

Las dificultades para condicionar los efectos de un antígeno proteico como la hemocianina, no son nuevas; cabe recordar que Ader y sus colegas (Ader et al., 1993) tuvieron que realizar cinco entrenamientos asociativos entre el estímulo condicionado y el incondicionado para poder observar en su grupo experimental un aumento condicionado de la respuesta de anticuerpos, además de que necesitaron de una inyección "refuerzo" (en una dosis de hemocianina sub Inmunogénica) aplicada a los animales del grupo experimental durante la evocación, ya que sin éste "refuerzo" el fenómeno de aumento condicionado de anticuerpos era imperceptible.

También es prudente tomar en cuenta el hecho de que en el trabajo de Álvarez-Borda (Álvarez-Borda et al., 1995) replicado por Madden (Madden et al., 2001) la dosis del EI usada es mucho mayor (500 µg/ml) a la dosis

utilizada en el presente trabajo (50 µg/ml). Lo anterior sugiere la posibilidad de que al ser mayor la dosis de EI recibida durante el entrenamiento asociativo (adquisición), la señal emitida por éste estímulo también sería mayor, lo que facilitaría su asociación con el EC, es decir, que los efectos del condicionamiento estarían afectados por la dosis de EI usado durante la adquisición. Si bien esta posibilidad no puede ser descartada, también cabe destacar que trabajos de nuestro laboratorio previos a éste estudio (datos no publicados) mostraron que usando una dosis de KLH igual a la usada por Álvarez-Borda (Álvarez-Borda et al., 1995) y Madden (Madden et al., 2001) (500 µg/ml) no es posible condicionar los efectos inmunológicos de la hemocianina, además dejaron abierta la posibilidad de poder condicionar los efectos inmunológicos del KLH usando una dosis de 50 µg/ml. Cabe destacar también que la dosis de 50 µg/ml puede proporcionar una respuesta de anticuerpos perceptible (Espinosa et al., 2002). Por otro lado en el trabajo de Ader (Ader et al., 1993) usan una dosis mucho menor (500 ng/ml) a la usada para la lisozima, y no obstante lograron condicionar sus efectos.

Los puntos analizados en el presente trabajo sugieren la posibilidad de que el fenómeno de aumento condicionado de la respuesta de anticuerpos usando un sólo ensayo de entrenamiento asociativo entre los estímulos condicionado e incondicionado, no sea generalizable a todos los antígenos de origen proteico, además de sugerir la posibilidad de que el fenómeno descrito inicialmente por Álvarez-Borda y sus colegas (Álvarez-Borda et al., 1995) para la lisozima de huevo de gallina se trate, como lo menciona Madden en su trabajo (Madden et al., 2001), de un fenómeno más modesto de lo descrito

inicialmente pero significativo, esto debido a que solamente ha sido demostrado completamente para la lisozima de huevo de gallina.

Por otro lado, es necesario para los fines de condicionamiento que el estímulo condicionado, el cual se va a asociar con el estímulo incondicionado, cumpla con ciertas características, entre ellas, que se considere novedoso, además de que dicho estímulo debe ser neutro (Ader y Cohen, 2001), en otras palabras que dicho estímulo por sí solo, no tenga efectos que alteren directa o indirectamente la respuesta a condicionar.

El presente trabajo arroja datos que sugieren fuertemente la posibilidad de que la sacarina, la cual ha sido usada en varios trabajos como estímulo condicionado (Gorczynski, 1991; Husband, A.J. et al., 1993; Álvarez-Borda et al., 1995), no cumpla con el requisito de neutralidad que requiere el estímulo condicionado. El análisis de nuestros resultados antes de la evocación y después de la inoculación con hemocianina, muestran diferencias estadísticas, es decir mayores niveles de anticuerpos entre los animales que fueron preexpuestos a la sacarina antes del entrenamiento de adquisición en comparación con los animales que fueron expuestos a la sacarina únicamente durante la adquisición y los que no habían recibido sacarina hasta ese momento. Dichas diferencias sólo pueden ser atribuibles a la preexposición a la sacarina, esto debido a que la única diferencia que delimitaba a los animales experimentales antes de la evocación era precisamente el número de exposiciones a la sacarina, ya que en todas las demás variables eran iguales para los tres grupos hasta ese momento.

Ésta posibilidad de alteraciones en la respuesta inmune a causa de la sacarina no es nueva. Existe un trabajo que reporta influencias de la administración de sacarina en la respuesta inmune, específicamente en la respuesta de anticuerpos (Luini et al., 1981). En éste trabajo reportan una disminución en los niveles de anticuerpos en ratas ante un reto inmunológico (eritrocitos de carnero) después de ser expuestas a una dieta con sacarina en diferentes concentraciones por 54 días (grupos con dieta de sacarina al 0, 1, 2.5 y 5 %).

A diferencia del trabajo presentado por Luini y sus colegas (Luini et al., 1981), nuestros datos no muestran una supresión de la respuesta de anticuerpos, por el contrario, los animales preexpuestos a la sacarina presentan mayores niveles de anticuerpos después de un reto inmunológico. Lo que aún no queda claro, es si el efecto de la sacarina sobre la respuesta de anticuerpos, es un efecto farmacológico directo, o bien, sus efectos estarían asociados a algún proceso aun desconocido que involucraría la familiaridad del organismo con la sacarina, esto debido a que sólo se observan efectos en animales pre-expuestos a la sacarina antes de un reto inmunológico. Lo que si queda claro, es que existe la posibilidad de que el tipo de efecto de la sacarina (supresor o activador) sobre la respuesta inmune, pueden ser atribuibles a las concentraciones de sacarina a las que son expuestos los animales experimentales, esto debido a que Luini y sus colegas (Luini et al., 1981) reportan supresión de la respuesta de anticuerpos, pero usando dosis de sacarina mucho mayores (1, 2.5 y 5%) a las usadas en el presente trabajo

(dosis de 0.15%) donde encontramos un aumento en los niveles de anticuerpos como consecuencia del consumo periódico de la sacarina.

Aunque cabe destacar el hecho de que a pesar de tener en su experimento un grupo preexpuesto a la sacarina, Madden y su equipo de trabajo (Madden et al., 2001) no reportan diferencias entre los animales del grupo preexpuesto comparados con los otros grupos experimentales en los niveles de anticuerpos previos a la evocación. Sin embargo la concentración de sacarina usada en ese trabajo (0.1%), es menor en comparación con el trabajo de Luini (Luini et al., 1981) y con el nuestro (0.15 %). Ésta ausencia de diferencias pre-evocación en los grupos experimentales del trabajo presentado por Madden (Madden et al., 2001), sugiere también la posibilidad de que los efectos ya mencionados de la sacarina sobre la respuesta de anticuerpos, no sean generalizables para todo tipo de antígenos que activan la respuesta de anticuerpos, es decir, que la sacarina sólo favorezca la respuesta de anticuerpos contra algunos, y no todos, los antígenos activadores de ésta respuesta.

Cabe mencionar que existe la posibilidad de que las diferencias encontradas entre grupos en los niveles de anticuerpos contra hemocianina después de la inoculación sea a causa de que algunos animales como se mencionó anteriormente, ya hubieran estado en contacto con la hemocianina antes de dicha inoculación y que como consecuencia de esto hubiesen tenido una respuesta mayor al antígeno. Aunque el análisis de las muestras basales no refleja diferencias en los niveles de anticuerpos entre los grupos comparados, dicha posibilidad no puede ser descartada definitivamente.

8. Conclusiones.

1. El presente trabajo muestra evidencias que sugieren que el fenómeno de activación condicionada de anticuerpos no es generalizable para todo tipo de antígenos proteicos, toda vez que no fue posible condicionar los efectos inmunológicos de la hemocianina, por lo que el fenómeno sólo ha sido demostrado completamente para la lisozima de huevo de gallina.

2. El presente trabajo abre la posibilidad de que los efectos del condicionamiento de la respuesta de anticuerpos puedan estar influenciados por variables como la dosis utilizada para el estímulo incondicionado y el tipo de estímulos (condicionado e incondicionado) utilizados.

4. A pesar de que el objetivo del presente trabajo no estuvo enfocado a comprobar la neutralidad de la sacarina, se muestra evidencia que sugiere la posibilidad de que la sacarina no cumpla completamente con ésta característica para condicionamientos de la respuesta de anticuerpos, ya que por sí sola favoreció la respuesta de anticuerpos contra hemocianina.

5. Es posible también de que los efectos de la sacarina (supresores o activadores) sean dependientes de concentración y que estos efectos no sean generalizables para todos los antígenos Inmunes, es decir, que solo sean perceptibles para cierto tipo de antígenos, aun no determinados.

9. Bibliografía.

Ader, R. (2003) **Conditioned immunomodulation: Research needs and directions.** Brain Behav Immun 17: 51-57.

Ader, R. (1992) **On the clinical relevance of psychoneuroimmunology.** Clin Immunol Immunopathol 64: 6-8.

Ader, R. (2000) **On the development of psychoneuroimmunology.** Eur J Pharmacol 405: 167-176.

Ader, R.; Cohen, N. (1975). **Behaviorally conditioned immunosuppression.** Psychosom Med 37: 333-340.

Ader, R.; Kelly, K.; Moynihan, J.A.; Grotta, L.J.; Cohen, N. (1993) **Conditioned enhancement of antibody production using antigen as the unconditioned stimulus.** Brain Behav Immun 7: 334-343.

Ader, R.; Cohen, N. (2001) **Conditioning and Immunity.** In: Psychoneuroimmunology (Robert Ader, Nicholas Cohen, David L.Felten, eds), pp 3-34. Estados Unidos: Academic Press.

Álvarez-Borda, B.; Ramírez-Amaya, V.; Perez, M., Bermúdez-Rattoni, F. (1995) **Enhancement of antibody production by a learning paradigm.** Neurobiol Learn Mem 64: 103-105.

Anderson, J.R. (2001) **Perspectivas sobre aprendizaje y memoria.** In: Aprendizaje y Memoria: Un enfoque integral. (Anderson JR, ed), pp 7-45. México: Mc Graw Hill.

Berczi, I.; Chow, D.A.; Sabbadini, E.R. (1998) **Neuroimmunoregulation and natural immunity.** Domest Anim Endocrinol 15: 273-281.

Bermúdez-Rattoni, F.; Prado-Alcalá, R.A. (2001) **Memoria. Dónde reside y cómo se forma.** México, D.F.: Trillas.

Brandon, S.E.; Vogel, E.H.; Wagner, A.R. (2000) **A componential view of configural cues in generalization and discrimination in Pavlovian conditioning.** Behav Brain Res 110: 67-72.

Butler, J.E. (1994) **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.** In: Immunochemistry (van Oss CJ, M.H.V.van Regenmortel, eds), pp 759-803. New York, E. U. A.: Marcel Dekker, Inc.

Cremaschi, G.A.; Gorelik, G.; Klecha, A.J.; Lysionek, A.E.; Genaro, A.M. (2000) **Chronic stress influences the immune system through the thyroid axis.** Life Sci 67: 3171-3179.

Dantzer, R.; Bluthé, R.M.; Kent, S.; Kelley, K.W. (1993) **Cytokines and sickness behavior.** In: Psycholimmunology. CNS-Immune Interactions (Alan J H, ed), pp 1-16. Florida: CRC Press.

Dhabar, F.S.; Miller, A.H.; McEwen, B.S.; Spencer, R.L. (1995) **Effects of stress on Immune Cell Distribution. Dynamics and Hormonal Mechanisms.** J Immunol 154: 5511-5527.

Espinosa, E.; Bermúdez-Rattoni, F. (2001). **Behavior-immunity relationship: the role of cytokines.** Rev Invest Clin 53: 240-253.

Espinosa, E., Flores-Muciño, O., Pérez-García, G. S., Vázquez-Camacho, A. C., Bermúdez-Rattoni, F. **Enhancement of IgG2A Response Associated with Interleukin-1b-Induced Conditioned Taste Aversion.** Brain Behav Immun 16, 182. 2002. Ref Type: Abstract

Extón, M.S.; von A.; Buske, K.; Stockhorst, U.; Gobel, U.; Schedlowski, M. (2000) **Pavlovian conditioning of immune function: animal investigation and the challenge of human application.** Behav Brain Res 110: 129-141.

Farrar, W.L.; Kilian, P.L.; Ruff, M.R.; Hill, J.M.; Pert, C.B. (1987) **Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain.** J Immunol 139: 459-463.

Gorczyński, R.M. (1991) **Toward an understanding of the mechanisms of classical conditioning of antibody responses.** J Gerontol 46: 152-156.

Gorczyński, R.M.; Macrae, S.; Kennedy, M. (1982) **Conditioned immune response associated with allogeneic skin grafts in mice.** J Immunol 129: 704-709.

Grossman, Z.; Herberman, R.B.; Livnat, S. (1992) **Neural modulation of immunity: conditioning phenomena and the adaptability of lymphoid cells.** Int J Neurosci 64: 275-290.

Harris, J.R.; Markl, J. (1999) **Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review.** Micron 30: 597-623.

Hermann, G.; Beck, F.M.; Tovar, C.A.; Malarkey, W.B.; Allen, C.; Sheridan, J.F. (1994) **Stress-induced changes attributable to the sympathetic nervous system during experimental influenza viral infection in DBA/2 inbred mouse strain.** J Neuroimmunol 53: 173-180.

Husband, A.J.; Lin, W.; Madsen, G.; King, M.G. (1993) **A conditioning model for immunostimulation: Enhancement of the antibody response to ovalbumin by behavioral conditioning in rats.** In: Psychoimmunology. CNS-Immune Interactions (Alan J H, ed), pp 139-147. Florida.

Irwin, M.; Vale, W.; Rivier, C. (1990) **Central corticotropin-releasing factor mediates the suppressive effect of stress on natural killer cytotoxicity.** *Endocrinology* 126: 2837-2844.

Jain, R.; Zwickler, D.; Hollander, C.S.; Brand, H.; Saperstein, A.; Hutchinson, B.; Brown, C.; Audhya, T. (1991) **Corticotropin-releasing factor modulates the immune response to stress in the rat.** *Endocrinology* 128: 1329-1336.

Jenkins, P., Chadwick, R.A.; Nevin, J.A. **Classically conditioned enhancement of antibody production.** *Bulletin of the Psychonomic Society.* 21[6], 485-487. 1983. Ref Type: Abstract

Laudenslager, M.L.; Fleshner, M.; Hofstadter, P.; Held, P.E.; Simons, L.; Maier, S.F. (1988) **Suppression of specific antibody production by inescapable shock: stability under varying conditions.** *Brain Behav Immun* 2: 92-101.

Luini, W.; Mantovani, A.; Garattini, S. (1981) **Effects of saccharin on primary humoral antibody production in rats.** *Toxicol Lett* 8: 1-6.

MacQueen, G.; Marshall, J.; Perdue, M.; Siegel, S.; Bienenstock, J. (1989) **Pavlovian conditioning of rat mucosal mast cells to secrete rat mast cell protease II.** *Science* 243: 83-85.

Madden, K.S.; Boehm, G.W.; Lee, S.C.; Grota, L.J.; Cohen, N.; Ader, R. (2001) **One-trial conditioning of the antibody response to hen egg lysozyme in rats.** *J Neuroimmunol* 113: 236-239.

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

Pacheco-López, G.; Espinosa, E.; Zamorano-Rojas, H.M.; Ramírez-Amaya, V.; Bermúdez-Rattoni, F. (2002) **Peripheral protein immunization induces rapid activation of the CNS, as measured by c-Fos expression.** *J Neuroimmunol* 131: 50-59.

Perez, L.; Lysle, D.T. (1995) **Corticotropin-releasing hormone is involved in conditioned stimulus-induced reduction of natural killer cell activity but not in conditioned alterations in cytokine production or proliferation responses.** *J Neuroimmunol* 63: 1-8.

Randall, D.; Burggren, W.; French, K. (1997) **Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations.** New York, U. S. A.: Freeman.

Russell, M.; Dark, K.A.; Cummins, R.W.; Ellman, G.; Callaway, E.; Peeke, H.V. (1984) **Learned histamine release.** *Science* 225: 733-734.

Scaccianoce, S.; Lombardo, K.; Nicolai, R.; Affricano, D.; Angelucci, L. (2000) **Studies on the involvement of histamine in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation induced by nerve growth factor.** *Life Sci* 67: 3143-3152.

Smith, C.A.; Wood, E.J. (1997) **La respuesta inmunitaria.** In: Biología Celular pp 286-322. Delaware, E. U. A..

Solomon, G.F. (1987) **Psychoneuroimmunology: interactions between central nervous system and immune system.** J Neurosci Res 18: 1-9.

Straub, R.H.; Westermann, J.; Scholmerich, J.; Falk, W. (1998) **Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs.** Immunol Today 19: 409-413.