



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTUDIO SOBRE EL CONDICIONAMIENTO DE LA RESPUESTA PRIMARIA
DE ANTICUERPOS Y LA AVERSION AL SABOR UTILIZANDO
INTERLEUCINA 1 COMO ESTIMULO INCONDICIONADO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

GEORGINA SOLEDAD PEREZ GARCIA

DIRECTOR DE TESIS: M. EN B. DIRECTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA





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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recopional.

NOMBRE: Georgina Soledad Pérez García

FECHA: 08 - Enero - 2004

FIRMA: _____

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:

"Estudio sobre el condicionamiento de la respuesta primaria de anticuerpos y la aversión al sabor utilizando Interleucina 1 como estímulo incondicionado"

realizado por Georgina Soledad Pérez García con número de cuenta 9429723-2

quién cubrió los créditos de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Enrique Espinosa Arciniega

Director de Tesis
Propietario

Mtro. en Bt. ~~Héctor~~ Enrique Espinosa Arciniega

Propietario

Dr. Federico Bermúdez Rattoni

Propietario

Dr. Silvestre de Jesús Alavez Espino

Suplente

Dra. María Isabel Miranda Saucedo

Suplente

Psic. Leticia Ramírez Lugo

Consejo Departamental de Biología.

Juan Manuel Rodríguez Chávez
Mtro. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

Dedico esta tesis

A mi madre Enriqueta y a mi padre Luis por toda la
paciencia, apoyo y amor que me dan siempre.

RECONOCIMIENTOS Y AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su apoyo incondicional y constante en mi formación universitaria, gracias a ellos he concluido esta etapa tan importante.

Un reconocimiento y agradecimiento especial al M. en Bt. Héctor Enrique Espinosa A. por haberme guiado en mi formación académica, por las valiosas enseñanzas, apoyo y paciencia, cuya influencia será duradera y significativa, así como por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo.

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por darme la oportunidad de desarrollarme en la ciencia, así como por sus apreciables comentarios a este trabajo.

Al Dr. Silvestre de Jesús Alavés E., la Dra. María Isabel Miranda S. y a la Psic. Leticia Ramírez Lugo por su tiempo, dedicación, comentarios y propuestas para esta tesis.

A los grandes amigos, confidentes, brothers del alma, casi hermanos: Dina E. Hernández U., Julio I. López Valverde, Erika M. Lozano G., Rayzuli Andrade, Claudia Cortés, Leonardo Gaona O. y Yenni Nava P. Porque cada uno forma parte importante de mi vida.

Un especial agradecimiento a mis compañeros, amigos del laboratorio y personas que colaboraron para el buen término de esta tesis (en orden alfabético): Alondra, Ana Cecilia, Carlos, Eduardo, Ezrel, Israela, Israel, Jimena, Lety, Luis Núñez, Luis Royero, Maribel, Marisela, Miriam, Oscar, Paco, Paola, Ranier, Sandra, Sergio, Tania, Vanesa y Víctor. Porque cada uno sabe lo importe que fue su compañía, apoyo, consejos y amistad.

A Yolanda Díaz y Oreste Carvajal por el apoyo técnico.

A los profesores de la Facultad de Ciencias, Dr. Francisco Sour T, Dr. Guillermo Salgado, Dr. Manuel Uribe A., Dr. Silvestre de Jesús Alavés E., y M. en Bt. Héctor Enrique Espinosa A. por haber influido tan positivamente en mi formación académica.

A mis hermanas, tías, abuelas, primos y a toda la familia en general que siempre esta conmigo.

Gracias a todos!!!

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN.....	1
--------------	---

INTRODUCCIÓN

I. Condicionamiento clásico.....	3
II. Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS).....	5
III. Condicionamiento inmune.....	7
IV. Condicionamiento de la respuesta de anticuerpos.....	8
V. Interleucina 1 (IL-1 β).....	12

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	15
--	-----------

HIPOTESIS.....	18
-----------------------	-----------

Objetivo.....	19
---------------	----

METODOLOGÍA

I. Primer experimento

Procedimiento conductual.....	20
-------------------------------	----

Sesión de Condicionamiento.....	21
---------------------------------	----

Prueba.....	22
-------------	----

II. Segundo experimento

Efecto de la IL-1 β en la respuesta de anticuerpos.....	24
---	----

III. Procedimiento general

Obtención de sangre.....	24
--------------------------	----

Prueba de ELISA.....	25
----------------------	----

IV. Análisis estadístico: Presentación de resultados.....	27
---	----

RESULTADOS

I. Primer experimento

CAS.....	28
----------	----

IgG totales.....	29
------------------	----

IgG2a.....	30
------------	----

Títulos.....	31
--------------	----

II. Segundo experimento

IgG totales e IgG2a.....	33
--------------------------	----

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	34
------------------------------------	-----------

REFERENCIAS.....	43
-------------------------	-----------

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
CAS	Condicionamiento aversivo a los sabores
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
GRC	(antígeno) Glóbulos rojos de camero
HEL	(antígeno) Lisozima de huevo de gallina
HHA	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
I.C.V.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
IgG	(anticuerpo) Inmunoglobulina G
IgG2a	(anticuerpo) Inmunoglobulina G subtipo 2a
IL-1 β	Interleucina 1beta
KLH	(antígeno) Keyhole Limpet Hemocyanin
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
N-C	No condicionadas
OVA	(antígeno) Ovoalbúmina
PBS	Buffer de fosfatos
SNC	Sistema nervioso central

RESUMEN

Desde hace varias décadas, algunas funciones del sistema inmune han sido modificadas por medio del condicionamiento clásico. Bajo este esquema se ha desarrollado el condicionamiento inmune en donde el apareamiento de un sabor novedoso, como estímulo condicionado (**EC**), asociado con un fármaco que altere la respuesta inmune, como el estímulo incondicionado (**EI**), induce el condicionamiento de la función inmune al exponer a los animales sólo al **EC**. Utilizando esta metodología, hace algunos años, el aumento de anticuerpos contra un antígeno pudo ser condicionado por medio de un sólo evento de asociación de estímulos.

En el presente trabajo, se intenta condicionar el aumento de la respuesta primaria de anticuerpos en un sólo evento utilizando una citocina (Interleucina IL-1 β) como **EI** y sacarina como **EC** en animales retados con antígeno. Simultáneamente, con este protocolo, se pretende además, inducir condicionamiento aversivo a los sabores (CAS). El CAS es un condicionamiento de conducta aversiva adquirida a los sabores como estrategia de supervivencia.

Se entrenaron ratas empleando sacarina como **EC** e IL-1 β como **EI** durante una sesión de condicionamiento. Días después, estas ratas fueron expuestas sólo al **EC** e inyectadas con un antígeno proteico como reto inmune. Se toma lectura de los consumos de los animales sometidos al condicionamiento para comprobar la aversión al sabor (CAS). Posteriormente, se determinaron y compararon los niveles de anticuerpos en sangre (IgG e IgG2a) contra el antígeno (del reto inmune).

Los resultados demuestran que no hay condicionamiento del aumento de la respuesta primaria de anticuerpos bajo las condiciones descritas. Adicionalmente, no se observó CAS.

Se discute la participación de la IL-1 β en el fenómeno del condicionamiento de la respuesta condicionada en un sólo evento de apareamiento de estímulos, evaluando el papel de esta citocina como mensajero entre el sistema inmune y el SNC durante el condicionamiento. Estos resultados son útiles para mostrar que la IL-1 podría no funcionar como **EI** en el condicionamiento de anticuerpos contra un antígeno y en el CAS.

INTRODUCCIÓN

Hasta hace poco tiempo, se creía que el sistema inmune era autónomo. Sin embargo, durante las 2 últimas décadas se ha acumulado evidencia de que distintos factores psicológicos como el estrés, la depresión, la conducta de enfermedad y los estados de ánimo, entre otros influyen en el desarrollo de la respuesta inmune, provocando deficiencias en el desarrollo de las funciones inmunes que predisponen o agravan las enfermedades (tales como alergias y asma) (Ader et al., 1987; Bermúdez-Rattoni, 2001). Al considerar estas observaciones, se desarrollaron experimentos que demostraron la existencia de una comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso central (SNC), la cual es estudiada por la *psiconeuroinmunología* (Ader, 2001; Ader y Cohen, 1991; Besedovsky et al., 1977; Felten, 2000b). La evidencia de estos estudios muestra que ésta comunicación se realiza por medio de moléculas producidas por ambos sistemas, como neurotransmisores, hormonas, neuropéptidos y citocinas, los cuales interactúan con receptores ubicados en las células de ambos sistemas (revisado en Felten, 2000a; Goehler et al., 2000).

Una de las herramientas que se utilizan para esta investigación es el modelo de condicionamiento clásico, con el cual se ha encontrado que algunas funciones del sistema inmune han sido modificadas mediante condicionamiento, demostrando la influencia conductual en la inmunidad (revisado en Ader, 2001; Ader et al., 1987; Ader y Cohen, 1991).

CONDICIONAMIENTO CLÁSICO

Este modelo es una forma de aprendizaje que se fundamenta en la asociación de estímulos para proporcionar una respuesta que está sujeta a esta misma asociación. Este aprendizaje es la adquisición de una nueva conducta.

Éste condicionamiento fue descubierto por Pavlov en 1927 (Bermúdez-Rattoni, 2001) y esta formado de los siguientes elementos:

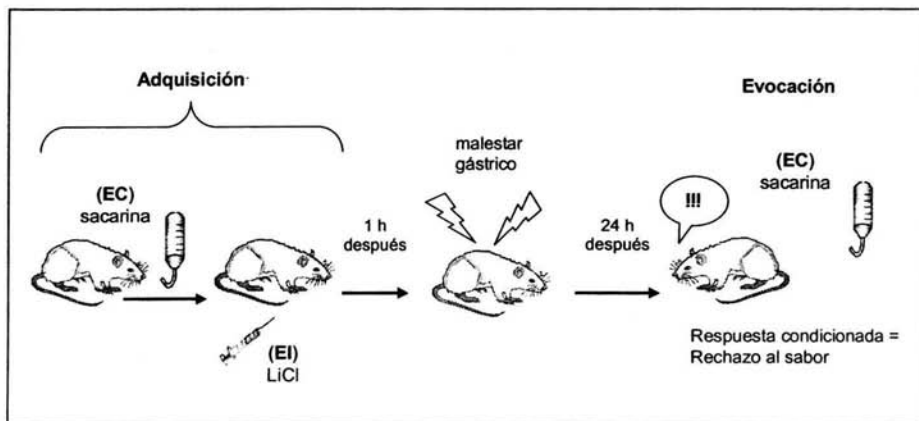
- *Estímulo condicionado (EC) e incondicionado (EI)*, el primero es neutro y no produce respuesta por si sólo, el segundo desencadena la respuesta por si mismo.
- *Apareamiento o sesión de condicionamiento*, es cuando al organismo se le presentan los estímulos mencionados al mismo tiempo o de manera sucesiva (puede realizarse también varios apareamientos).
- *Evocación o prueba*, se realiza tiempo después de la sesión de condicionamiento y consiste en exponer al organismo sólo al **EC**.
- *Respuesta condicionada* es el resultado del apareamiento de estímulos, donde el **EC** es capaz de evocar la respuesta por si mismo, esta es la *respuesta condicionada* (Domjan, 1998; Kehoe y Macrae, 2003).

El condicionamiento inmune y el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) se basan en los principios del condicionamiento clásico, en donde se asocia un sabor novedoso (como **EC**) con un fármaco (**EI**) para obtener la respuesta condicionada con la presentación del **EC** durante la prueba (revisado en Ader, 2003; Domjan, 1998).

CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS SABORES

El Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS) es un paradigma de aprendizaje que estudia la conducta adquirida aversiva o de rechazo a los alimentos previamente asociados con malestar o intoxicación, que muestran la mayoría de los organismos (por ejemplo aves, mamíferos e insectos) a ciertas sustancias tóxicas que se encuentran en el ambiente, demostrando un mecanismo de adaptación biológica para su supervivencia (Bures, 1998).

En el CAS se asocia un sabor novedoso (el estímulo condicionado, **EC**) con un fármaco (el estímulo incondicionado, **EI**) que induce un malestar (por ejemplo, irritación gástrica). Durante la evocación o prueba, la sola presentación del **EC** inducirá la respuesta condicionada, es decir, el rechazo al sabor como producto de la asociación previa entre estímulos (**ver esquema 1**) (Ader y Peck, 1977).



Esquema 1. Eventos que inducen el CAS. En este condicionamiento se asocia un sabor novedoso con un compuesto químico (como el LiCl) que induce malestar en el animal. Durante la evocación, el organismo rechaza el sabor como producto de la asociación entre estímulos (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2001). Los tiempos señalados en la ilustración son relativos, varían de un laboratorio a otro.

El CAS presenta varias características importantes. La primera de ellas es la de un condicionamiento rápido (un apareamiento de estímulos es suficiente para obtener la respuesta condicionada).

Otra característica es que pueden existir largos intervalos de tiempo entre estímulos, los cuales pueden ser de varias horas (revisado en Schafe et al., 1995). La última, es la utilización de un estímulo aversivo como **EI** (Domjan, 1998) ya que la inducción de malestar o enfermedad es la forma más común de provocar CAS y éste puede ser producido más fácilmente por un **EI** aversivo (Ader y Peck, 1977). Respecto a esto, algunos autores concuerdan con la idea de que un estímulo aversivo evidencia mejor su capacidad de provocar una respuesta (en comparación con otro estímulo) (Lysle et al., 1992). Los estímulos aversivos más utilizados en el CAS son compuestos químicos inyectados en el peritoneo; como cloruro de Litio (LiCl) (Domjan y Gillan, 1976), drogas quimioterapéuticas (Ader y Cohen, 1975), lipopolisacáridos (LPS) (Exton et al., 1995c), e IL-1 β (Dyck et al., 1990; Tazi et al., 1988) entre otras.

CONDICIONAMIENTO INMUNE

Ader y Cohen (1975) utilizaron sacarina como **EC** apareada con ciclofosfamida (sustancia inmunosupresora) como **EI** para inducir CAS. Durante la prueba se expuso a los animales sólo al **EC** y además de la aversión a la sacarina, encontraron una disminución de la respuesta inmune (Ader y Cohen, 1975). El modelo de inmunosupresión condicionada consiste en la presentación de un sabor novedoso (**EC**) apareado varias veces con un fármaco que altera la respuesta inmune (**EI**), provocando la obtención del efecto condicionado (la disminución de la respuesta inmune) sólo al exponerse al **EC** (Ader, 2001; Ader et al., 1987; Ader y Cohen, 1991). La relevancia de este descubrimiento fue el condicionamiento de una función fisiológica compleja: la respuesta inmune. Esta se define como la capacidad de organizar una respuesta defensiva contra sustancias ajenas (tóxicas y microorganismos del medio ambiente) a través de diversos mecanismos que poseen la mayoría de los animales. La respuesta inmune puede ser innata (ocurre sin exposición previa a la sustancia o microorganismo) y adquirida (requiere exposición previa al material ajeno). Desde entonces, se han desarrollado protocolos de investigación para intentar condicionar las funciones del sistema inmune (innatas o adquiridas) (Ader y Cohen, 1991), algunos ejemplos de condicionamiento conductual que han modificado la respuesta inmune se muestran en **tabla 1**:

Ejemplos de condicionamiento inmune

CONDICIONAMIENTO DE INMUNIDAD INNATA		CONDICIONAMIENTO DE INMUNIDAD ADQUIRIDA	
<i>Inmunosupresión</i>	<i>Inmunoestimulación</i>	<i>Inmunosupresión</i>	<i>Inmunoestimulación</i>
Disminución condicionada de las reacciones inflamatorias, actividad de NK entre otras (Coussons et al., 1994; Lysle et al., 1992).	Aumento condicionado de la actividad de NK (Demissie et al., 1996; Hiramoto et al., 1997; Longo et al., 1999).	Disminución condicionada de anticuerpos (Ader et al, 1975; Gorczynski et al, 1982).	Aumento condicionado de anticuerpos (inmunidad humoral) (Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001).

Tabla 1. Ejemplifica la existencia de algunos de los distintos protocolos para el condicionamiento inmune.

CONDICIONAMIENTO DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS

La inmunidad adquirida se basa en la actividad de 2 elementos inmunes: humoral y celular. La inmunidad humoral está mediada por proteínas solubles llamadas anticuerpos o inmunoglobulinas. La síntesis y liberación de anticuerpos es inducida por la exposición a antígenos (entre otras sustancias). Los anticuerpos se unen específicamente al antígeno que generó su producción, eliminándolo por alguno de los siguientes procedimientos: inactivación directa, por opsonización (recubrimiento del antígeno para facilitar la fagocitosis de éste) y debilitando la membrana del microorganismo haciéndola vulnerable a la destrucción por medio de lisis celular (por medio de un grupo de proteínas denominado complemento). La importancia de la inmunidad humoral radica en la capacidad de generar una gran diversidad y especificidad de anticuerpos (es capaz de producir anticuerpos que identifican una gran cantidad de moléculas distintas con una gran especificidad) (revisado en Roitt et al., 1998).

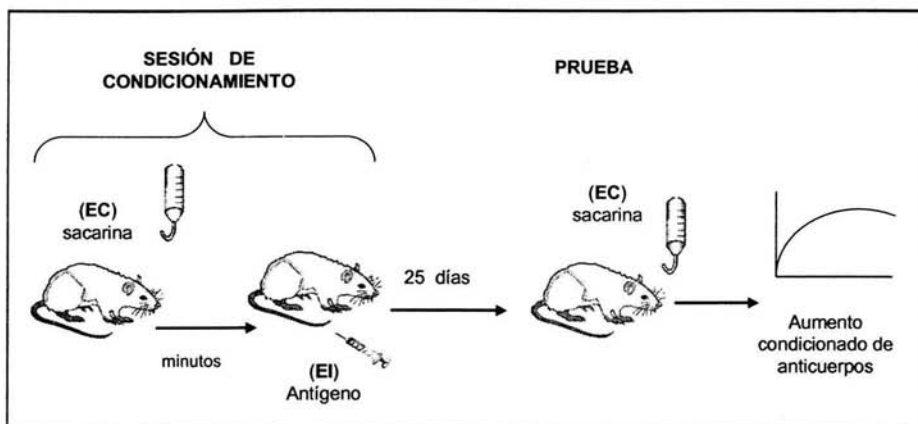
El desarrollo de la inmunidad adquirida está sujeto a un control riguroso, el mismo sistema segrega moléculas que aumentan o inhiben la activación de la respuesta inmunitaria (por ejemplo, citocinas). Dada la complejidad del desarrollo de la inmunidad adquirida, ésta ha sido objeto de escasos experimentos de condicionamiento (Álvarez-Borda et al., 1995).

Hasta hace pocos años se desarrolló un modelo para obtener un aumento condicionado de anticuerpos al exponer a los animales al **EC** (mediante previo apareamiento de estímulos; un sabor novedoso como **EC** y un antígeno como **EI**). Hasta el momento, existen 4 trabajos que demuestran condicionamiento de la respuesta de anticuerpos (Ader et al., 1993; Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001; Espinosa et al., 2003).

En el primero de ellos, se pudo condicionar la respuesta secundaria de anticuerpos utilizando un antígeno proteico KLH (keyhole Limpet Hemocyanin) como **EI** (100 ng/0.2 ml) y leche con chocolate como **EC**. Durante la sesión de condicionamiento, se expuso a los animales al **EC** y al **EI**. Se hicieron 5 apareamientos de estímulos separados por 4 semanas cada uno. Durante la prueba, algunos grupos (entre ellos el CS) fueron reexpuestos al **EC**, además, todos los grupos (excepto los grupos controles) recibieron una inyección del mismo antígeno (KLH) en dosis subinmunogénicas (cantidad incapaz de inducir una respuesta inmune) con o refuerzo. Los resultados del grupo CS muestran un aumento condicionado de anticuerpos comparado con los grupos que no recibieron la inyección de antígeno en dosis subinmunogénica (Ader et al., 1993). Esto sugiere, que la respuesta condicionada (el aumento de la respuesta secundaria de anticuerpos) debe estar dada por la asociación previa de estímulos (el **EC** y **EI**), la cual se manifestó por la reexposición del **EC** y muy posible por la inyección del mismo antígeno (KLH) en dosis subinmunogénicas durante la prueba. Por otro lado, este trabajo demostró que un antígeno puede ser utilizado como **EI** en un experimento de condicionamiento inmune.

En el segundo trabajo se observó un aumento condicionado de la respuesta de anticuerpos contra un antígeno proteico (Lisozima del huevo de gallina: HEL), el cual fue utilizado como **EI** apareado con un sabor novedoso como **EC**. El modelo describe que durante la sesión de prueba, ambos estímulos son apareados (sacarina al 0.1 % como **EC** e inyección i.p. de antígeno HEL 500 µg/ml como **EI**). Veinticinco días después se realiza la prueba, donde los animales son expuestos sólo al **EC** (**ver esquema 2**). Los resultados demuestran un aumento condicionado de la respuesta primaria de anticuerpos (IgM e IgG) similar en magnitud a la respuesta secundaria de anticuerpos normal (la de reinyección de antígeno) (Álvarez-Borda et al., 1995). La relevancia de este trabajo es el de 2 hallazgos importantes: se logró modificar el número de sesiones de condicionamiento

inmune a un sólo apareamiento de estímulos para obtener la respuesta condicionada y se logró condicionar la elevación de la respuesta primaria de anticuerpos sin necesidad de utilizar refuerzos en dosis subinmunogénicas. Por otro lado, este trabajo confirmó lo que demostró Ader y colaboradores (1993): un antígeno puede ser utilizado exitosamente como EI en un experimento de condicionamiento inmune.



Esquema 2. Metodología del aumento condicionado de la respuesta primaria de anticuerpos desarrollada por Álvarez-Borda (modificado de Espinosa, 2001). Este modelo demostró la posibilidad de condicionar la respuesta de anticuerpos en un solo evento de apareamiento de estímulos.

En el tercer trabajo, se replicó el trabajo de Álvarez-Borda (1995) modificando su modelo al realizar la sesión de prueba 45 días después de la sesión de condicionamiento. Los resultados muestran un aumento en el nivel de IgG, menor al reportado por Álvarez-Borda (Madden et al., 2001).

Por otro lado, en el cuarto trabajo, se encuentra también un efecto modesto (aumento de anticuerpos IgG contra antígeno) comparado que el trabajo de Álvarez-Borda (1995) similar en magnitud al encontrado por Madden (2001) (Espinosa et al., 2003).

Se utilizó HEL como **EI** (500 µg/ml) y sacarina como **EC** durante la sesión de condicionamiento, 37 días después se realizó la prueba, reexponiendo a los animales al **EC** se encontró aumento de anticuerpos IgG contra antígeno. Comparando el efecto condicionado del trabajo de Espinosa (2003) con los 2 anteriores, cabe señalar que la prueba se realizó 12 días después que el experimento de Álvarez-Borda (1995) y 8 días antes que el experimento de Madden (2001). Esto sugiere que el aumento condicionado de la respuesta de anticuerpos refleja un proceso general de aprendizaje (Espinosa et al., 2003).

INTERLEUCINA 1 (IL-1)

IL-1 es una molécula sintetizada y secretada principalmente por macrófagos (Guthridge et al., 1997). Existen 2 isoformas: IL-1 α e IL-1 β , ambas pueden unirse al mismo receptor, induciendo efectos similares (Plata-Salaman, 1991; Dinarello, 1993.) En términos generales, IL-1 α actúa a nivel intracelular y no se detecta en suero mientras que IL-1 β es un pirógeno endógeno que circula por sangre induciendo una amplia variedad de efectos a 2 niveles:

- *Fisiológicos*: regula la comunicación entre células del sistema inmune participando en la activación de linfocitos (efecto adyuvante (Boraschi et al., 1991), en la presentación de antígeno (Aiello et al., 1990), en procesos inflamatorios y de fiebre como respuesta en fase aguda (Avitsur et al., 1994; Conrad et al., 1997; Dantzer et al., 1999a; Elmquist et al., 1997; Kent et al., 1992; Luheshi et al., 1997; Rothwell y Hopkins, 1995). Activa el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) (Besedovsky et al., 1986; Besedovsky et al., 1991), participa en cambios metabólicos, e hematológicos (Dinarello, 1991; Dinarello et al., 1993; Dinarello y Wolff, 1993), participa en los procesos de anorexia (Kent et al., 1994; Plata-Salaman, 1998; Plata-Salaman y Ffrench, 1992) y provoca incremento en los niveles de noradrenalina en bazo (Shimizu et al., 1994).
- *Conductuales*: modifica la ingesta de alimentos (Kent et al., 1996; Weingarten, 1996), provoca alteraciones en el sueño (Brown et al., 1992), induce conducta de enfermedad (disminución de la conducta de exploración, reducción de la actividad sexual, hipofagia, decremento en el consumo de agua entre otros) (Dantzer et al., 1999a; Dantzer, 2001) y participa en el CAS (Tazi et al., 1988).

Algunos de estos efectos han sido condicionados apareando en la sesión de condicionamiento un sabor novedoso (sacarina como **EC**) con inyección i.p. de LPS como **EI** (como se sabe, LPS induce la secreción de IL-1 y otras citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF α), observando el efecto condicionado como consecuencia de la exposición del **EC** en la prueba.

Utilizando este modelo se ha podido condicionar el aumento de la temperatura corporal y aumento de ondas lentas de sueño (Bull et al., 1994), hipotermia (Bull et al., 1994), hiperalgesia (Wiertelak et al., 1994), alteraciones en la concentración de metales en la sangre (Exton et al., 1995b; Exton et al., 1995d), anorexia (Exton et al., 1995a), además de la supresión y liberación de corticosterona y norepinefrina (NE) (Janz et al., 1996).

Estos resultados demostraron que algunos de los efectos de la IL-1 habían sido condicionados, lo que abrió la posibilidad de utilizar la IL-1 específicamente como **EI** (i.p.), apareándola con un sabor novedoso (sacarina como **EC**) durante la sesión de condicionamiento y exponer a los animales solo al **EC** durante la prueba. Bajo este esquema se encontró CAS (Janz et al., 1991; Tazi et al., 1988) y además un incremento condicionado en el nivel de glucocorticoides (Dyck et al., 1990).

Como se ha descrito, la IL-1 induce una variedad de efectos según la dosis administrada periféricamente: Dosis de 1 a 100 ng induce fiebre, neutrofilia, descenso de hierro, incremento de síntesis de proteína en fase aguda, anorexia, sueño y liberación de hormona adrenocorticotrópica (ACTH), entre otras. Dosis de 5 μ g induce hipotensión, leucopenia, supresión en el consumo de alimento y pérdida de peso entre otros. Dosis superiores a 5 μ g se reportan como tóxicas (Dinareello, 1991; Plata-Salaman, 1991).

Una línea de investigación reciente explora la posibilidad de que citocinas presentes sistémicamente puedan generar señales asociables con estímulos sensoriales que pudieran convertir a las citocinas en **EI** (Espinosa y Bermúdez, 2001).

Existen varios experimentos que demuestran que el SNC responde a la IL-1 β sistémica, la cual induce una variedad de efectos mediante estimulación periférica aferente que activa el SNC. En uno de ellos, encontraron que la inyección i.p. de IL-1 β (100 ng/kg) facilita la liberación de noradrenalina en bazo a través de la activación del nervio simpático (Shimizu et al., 1994), esta dosis no induce fiebre. Utilizando dosis de 25 μ g/kg de IL-1 β i.p. se induce fiebre y conducta de depresión a través del nervio vago (que activa estructuras límbicas para inducir la conducta de depresión, y que es alterada por vagotomía, a diferencia de la fiebre) (Konsman et al., 2000). Utilizando dosis de 1 μ g/kg y 10 μ g/kg i.p. se activa el eje HHA (induciendo un incremento de corticosterona) por estimulación del nervio vago (Fleshner et al., 1995). Existen algunos reportes que demuestran la activación del SNC por infección, inflamación sistémica o administración directa (i.v. o i.p.) de IL-1 estimulando la activación del nervio vago del eje HHA, induciendo fiebre y conducta de depresión entre otras (Elmquist et al., 1997; Konsman et al., 2000; Rivest et al., 2000). En concordancia a estos trabajos, se ha encontrado que la reducción de los efectos de la IL-1 por vagotomía ocurre solamente cuando la citocina es administrada o inducida intraperitonealmente (Bluthe et al., 1996a; Bluthe et al., 1996b).

Se ha propuesto que el SNC podría detectar la IL-1 sistémica, por medio de vías anatómicas como la hematógona (Watkins, et al., 1995), cruzando la barrera hematoencefálica (Banks et al., 1995), uniéndose al endotelio vascular para inducir otras moléculas mediadoras en el SNC (Dantzer et al., 1999b; Dantzer et al., 2000; Goehler et al., 1999; Plata-Salaman, 1991; Vitkovic et al., 2000) produciendo así los efectos descritos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Determinados estudios sugieren que algunas funciones del sistema inmune pueden ser modificadas por medio del condicionamiento clásico. Así mismo, existen razones para proponer la utilidad de IL-1 β como **EI**:

- El hecho de que algunos efectos de la IL-1 β han sido condicionadas apareando LPS (como **EI**) y sacarina (como **EC**) (Bull et al., 1991; Bull et al., 1994; Janz et al., 1996; Wiertelak et al., 1994) apoya la posibilidad de que citocinas de origen sistémico actúen como **EI**.
- Adicionalmente, existen fuentes que proponen a la IL-1 como molécula mensajera entre el sistema inmune y el SNC. Se sugiere que esta molécula está involucrada en el condicionamiento inmune como mensajero principal o como molécula de relevo que induce la producción de otras moléculas (como prostaglandinas y otras citocinas) que deben ser detectadas por el SNC (Demissie et al., 1996; Elmquist et al., 1997; Fleshner et al., 1995; Konsman et al., 1999; Konsman et al., 2000; Luheshi et al., 1997; Rivest et al., 2000).
- Se sabe que la IL-1 β participa en eventos de inducción de la respuesta inmune, por ejemplo en la activación de anticuerpos por medio de antígenos como los utilizados por Álvarez-Borda (1995) y Madden (2001) por lo que se pensó en condicionar esta propiedad adyuvante (se refiere a la capacidad para estimular o intensificar la respuesta de anticuerpos contra un antígeno, las moléculas adyuvantes no activan la respuesta inmune por sí misma).

- Si la IL-1 β fuera la señal aferente en el condicionamiento descrito por Álvarez-Borda (1995), debería ser posible lograr un condicionamiento de la respuesta de anticuerpos utilizando IL-1 β en dosis que no generen CAS.
- Asimismo, existe evidencia de condicionamiento de la respuesta inmune innata utilizando citocinas como **EI** y sacarina como **EC** donde se observa aumento condicionado de la actividad de células NK (Demissie et al., 1996) y de macrófagos (Longo et al., 1999) al exponer los individuos al **EC**.
- Por último, se ha observado CAS y condicionamiento de algunas funciones inmunes utilizando agentes que inducen la IL-1 β o la misma IL-1 β como **EI** (Janz et al., 1991; Tazi et al., 1988).

De esta manera, se desea saber si es posible condicionar el efecto adyuvante de la IL-1 (aumento de la respuesta de anticuerpos contra un antígeno) y al mismo tiempo determinar si la misma dosis (5 μ g/kg) es capaz de inducir CAS (dosis cercana a la que induce CAS según Tazi y colaboradores), ya que se ha propuesto que dosis superiores podrían ser tóxicas (revisado en Dinarello, 1991).

Para el **EC**, se pensó en utilizar sacarina debido a que se utiliza desde hace varios años en la investigación del condicionamiento inmune por la novedad del sabor y porque estudios previos de condicionamiento inmune no reportan propiedades inmunogénicas de la sacarina por sí sola (Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001). Asimismo, se aumentó la saliencia de este estímulo (a una concentración de 0.25 %) comparado con la concentración utilizada en los antecedentes (concentración de 0.1 %) (Álvarez-Borda et al., 1995; Dyck et al., 1990; Janz et al., 1991; Madden et al., 2001; Tazi et al., 1988).

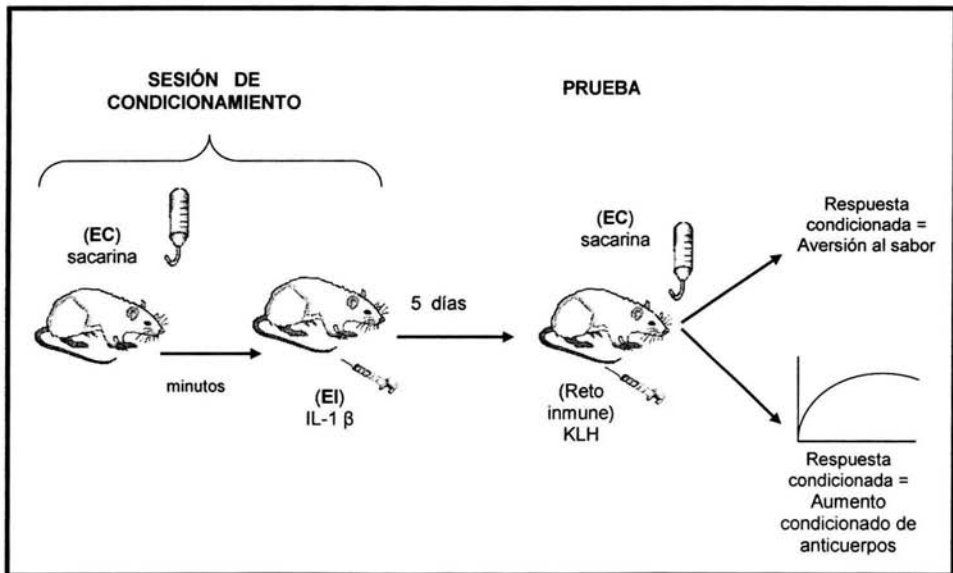
Desde hace años se han utilizado los antígenos como **EI** en experimentos de aumento condicionado de la función inmune. De entre los antígenos más utilizados destacan el GRC (glóbulos rojos de carnero) (Gorczynski, et al., 1982) en el aumento condicionado de precursores de linfocitos citotóxicos en respuesta al **EC**. Se ha utilizado HEL en el aumento de la respuesta de anticuerpos en respuesta al **EC** (Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001) y KLH en el aumento condicionado de la respuesta secundaria de anticuerpos en respuesta al **EC** e inyecciones subinmunogénicas del mismo antígeno (Ader, et al., 1993).

El antígeno proteico KLH es el pigmento transportador de oxígeno en los nemátodos, moluscos y crustáceos (Orlova et al., 1997). Esta proteína se utiliza para obtener activación y síntesis de anticuerpos en animales vertebrados (Cruse, 1995). Se eligió utilizar el KLH porque es un antígeno proteico como el utilizado en los experimentos de aumento condicionado de la respuesta primaria de anticuerpos (Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001). Por otro lado, si el condicionamiento de la respuesta primaria de anticuerpos contra un antígeno (HEL) es tan sólido, será posible observarlo al utilizar otra proteína inmunogénica (Espinosa et al., 2003). En el presente experimento se utilizó como reto inmune (activación de anticuerpos) en lugar de **EI**. La dosis que se empleada es de 50 µg/ml suficientes para activar la respuesta de anticuerpos (Espinosa et al., 2002).

HIPÓTESIS

En consideración con lo mencionado en el planteamiento del problema:

- Dadas las propiedades potencialmente condicionables de la IL-1 β (algunos de sus efectos han sido condicionados, induce CAS, participa en eventos de inducción de la respuesta inmune como la activación de anticuerpos por medio de antígenos y porque se sugiere que la IL-1 podría ser la molécula mensajera entre el sistema inmune y el SNC) es posible proponerla como **EI**. Por lo anterior, se esperaría observar condicionamiento simultáneo de 2 respuestas independientes: aumento de la respuesta primaria de anticuerpos y CAS utilizando IL-1 β como **EI** (ver **esquema 3**).



Esquema 3. Hipótesis del presente trabajo. Se espera observar condicionamiento de 2 respuestas independientes en un sólo evento de apareamiento de estímulos: aumento condicionado de la respuesta primaria de anticuerpo y CAS utilizando IL-1 β como EI, sacarina como EC, y KLH como reto inmune.

OBJETIVO

Se evaluará la posibilidad de condicionar el efecto adyuvante de la IL-1 β (aumento de la respuesta de anticuerpos contra un antígeno) y al mismo tiempo determinar si la misma dosis (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) es capaz de inducir CAS.

Con este fin, se desarrollaron 2 experimentos:

a) En un primer experimento se determinará la utilidad de la IL-1 β como **El** en el condicionamiento del aumento de la respuesta primaria de anticuerpos y CAS (en un mismo evento) en animales retados inmunológicamente con antígeno KLH.

b) Se realizará un segundo experimento en el cual se determinará el efecto de la IL-1 β y del KLH en la respuesta de anticuerpos. Este experimento es un control del anterior.

METODOLOGÍA

PRIMER EXPERIMENTO

PROCEDIMIENTO CONDUCTUAL

Se utilizaron 50 ratas Wistar machos jóvenes de 250 g., colocadas individualmente en cajas con alimento y agua todo el tiempo durante 15 días antes de iniciar el entrenamiento (tiempo en que se estima se aclimatan los animales a las condiciones del bioterio). Con un ciclo de luz y oscuridad normal (luces de 8:00 a 20:00 hrs.). Las ratas fueron manipuladas los 15 días para acostumbrarlas a la manipulación propia del tratamiento.

GRUPOS

Las ratas fueron distribuidas en 5 grupos al azar: el grupo experimental (**CS**) es expuesto al *EC* y al *EI* durante la sesión de condicionamiento y reexpuesto al *EC* durante la prueba, el grupo (**CS₀**) con el mismo tratamiento en la sesión de condicionamiento que el anterior, no es reexpuesto al *EC* durante la prueba, el grupo (**N-C**) es expuesto al *EI* pero no al *EC* durante la sesión de condicionamiento, durante la prueba si se expone al *EC*, el grupo (**PRE CS**) tiene el mismo tratamiento que el grupo **CS** (durante la sesión de condicionamiento y la prueba) pero se expone al *EC* antes de iniciar la sesión de condicionamiento (durante el entrenamiento) y un grupo (**VEHÍCULO**) que se expone sólo al *EC* durante la sesión de condicionamiento y la prueba. Todos los grupos reciben una inyección del antígeno KLH como reto inmune durante la prueba (ver **tabla 2**).

GRUPO	n	ENTRENAMIENTO (Día -4)	SESIÓN DE CONDICIONAMIENTO (Día 0)	PRUEBA (Día 5)	OBSERVACIÓN (QUE SE DEMUESTRA)
CS	10	Agua	SAC + IL-1 β	SAC + KLH (50 μ g)	- Principal grupo experimental que explorará el efecto condicionado.
CSo	9	Agua	SAC + IL-1 β	Agua+ KLH (50 μ g)	-Demostrará el efecto de la sesión de condicionamiento sin la exposición del EC en el día de prueba.
N-C	9	Agua	Agua + IL-1 β	SAC + KLH (50 μ g)	- Demostrará el efecto de un tratamiento no asociativo (estímulos no apareados).
PRE CS	9	SACARINA	SAC + IL-1 β	SAC + KLH (50 μ g)	- Demostrará el efecto de la preexposición del EC antes de la sesión de condicionamiento. -Inhibición latente.
VEHÍCULO	9	Agua	SAC + SSI	SAC + KLH (50 μ g)	- Demostrará los efectos residuales de la sacarina dentro del condicionamiento.

Tabla 2. Grupos y tratamientos aplicados durante el experimento (entrenamiento, sesión de condicionamiento y prueba) y perspectiva de cada uno de los tratamientos.

Dos semanas después, se inicia el **entrenamiento**. Se privan a los animales de agua por lapsos de 12 horas, proporcionándoles bebederos con agua sólo durante 15 minutos durante la mañana y la noche (8:00 y 20:00 horas). Transcurridos los 15 minutos se retira el bebedero y se toma lectura del consumo del animal. La lectura de los consumos se realiza durante 4 días, tiempo en que se entrena a los animales a beber cuando se les coloca el bebedero. El grupo de **PRE CS** como ya se menciona, recibe sacarina (al 0.25 %) por la mañana.

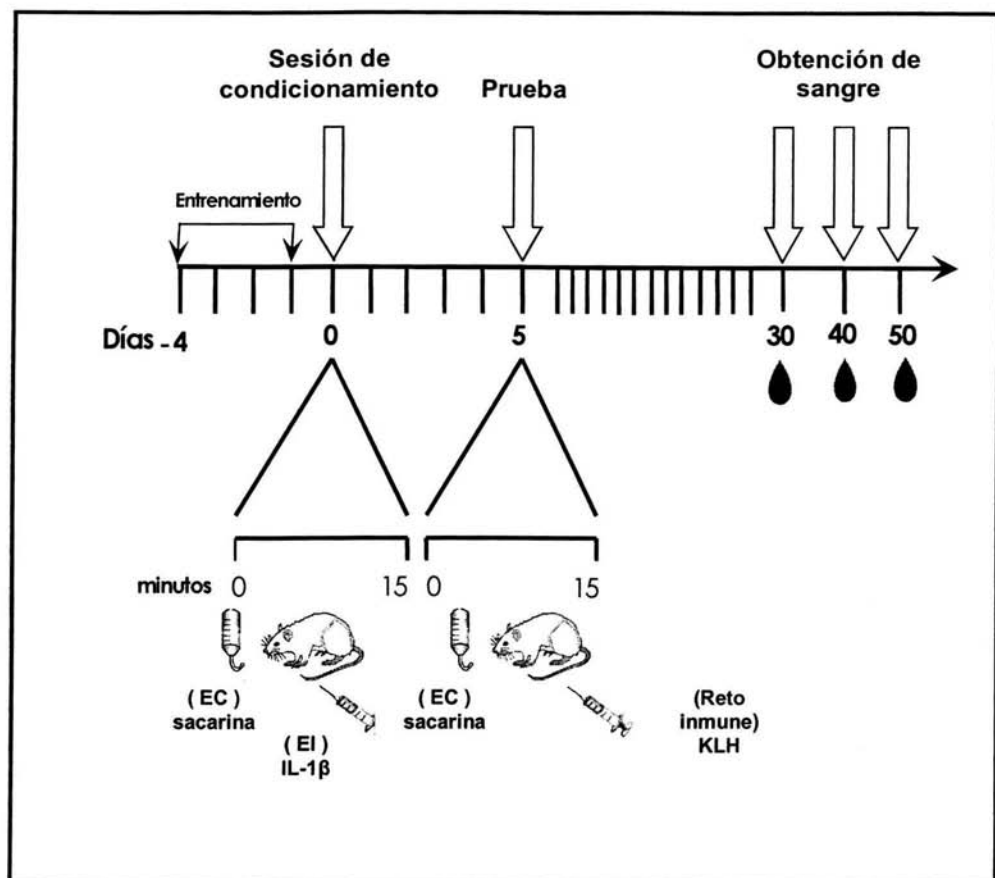
SESIÓN DE CONDICIONAMIENTO

El día 0 del experimento, los animales reciben el EC: sacarina (Sigma) al 0.25 % (w/v) durante los mismos 15 minutos con los que se les ha entrenado. El grupo N-C recibe agua.

Al terminar, se expone a los animales al EI: se les inyectó i.p. IL-1 β 50 μ g/Kg (Pierce Endogen, EUA) en 500 μ l de SSI (solución salina isotónica, de Laboratorios Abbot, S.A.). El grupo VEHÍCULO recibió 500 μ l de SSI en lugar de IL-1 β . Los animales se siguen entrenando por 4 días más, con sus respectivos consumos cada 12 horas.

PRUEBA

El día 5 del experimento se llevó a cabo la prueba, que consistió en exponer a todos los grupos al EC (sacarina al 0.25% w/v) durante 15 minutos, excepto al grupo CSo (el cual recibe agua). Todos los animales reciben una inyección i.p. de KLH (50 μ g/ml Pierce Chemical, EUA) en 500 μ l de SSI (Laboratorios Abbot, S.A.). Se registra el consumo que tuvieron los animales (ver **esquema 4**).



Esquema 4. Describe los eventos del experimento, los días en los que se aplica el tratamiento y los días de la obtención de sangre.

SEGUNDO EXPERIMENTO

EFFECTO DE LA IL-1 EN LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS

Este experimento sirvió para determinar el efecto adyuvante de la IL-1 β en la producción de anticuerpos. Se hicieron 2 grupos con distinto tratamiento (**tabla 3**).

GRUPO	N	TRATAMIENTO	RESULTADO
A	8	KLH + SSI	-Determina la efectividad del KLH como antígeno
B	8	KLH + IL-1	-Determina los efectos adyuvantes de IL-1

Tabla 3. Grupos y tratamientos de los animales controles

Los animales de los 2 grupos reciben una inyección en i.p. de KLH (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en 300 μl de SSI. Posteriormente, al grupo **A** reciben 300 μl de SSI i.p. y el grupo **B** recibe IL-1 β 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en 300 μl de SSI i.p.

PROCEDIMIENTO GENERAL (para ambos experimentos)

OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE

Se calendarizó la obtención de sangre de las ratas, 5 días antes de la sesión de condicionamiento (para obtener los valores basales o pre-inmunes), el día 30, 40, y finalmente 50 días después de la sesión de prueba. Por otro lado, en los animales del experimento independiente se toman muestras de sangre días antes del reto inmune (valores basales), los días 21 y 30. Se procede a sangrar a cada una de las ratas por medio de capilares estériles, en la región infra orbital del ojo de la rata anestesiada previamente en una cámara saturada por éter.

De cada animal, se extrae 0.5 ml de sangre para posterior centrifugación (15 minutos a 3500 g) y obtener así los glóbulos rojos en plasma. Se colectan 50 µl del plasma los cuales se almacenan a -81°C .

PRUEBA DE ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Una vez obtenidas todas las muestras de sangre, se procedió a analizarlas bajo las mismas condiciones por medio de pruebas de ELISA. El ensayo de enlace de enzimas inmunosorbente es un método utilizado para detectar antígenos y anticuerpos en fluidos o extractos de tejido. El anticuerpo está marcado con una enzima que procesa un sustrato con un reactivo determinado para producir un color en el medio de la prueba. El producto soluble coloreado de la reacción es medido espectrofotométricamente para comparar niveles de anticuerpos en todas las muestras obtenidas (Coligan, 1991; Roitt et al., 1998). La prueba que se realiza en este trabajo es un ELISA indirecto (se detectan niveles de IgG totales e IgG2a en respuesta al KLH). Se analizaron las muestras de ratas (valores basales, día 30, 40 y 50) en 5 placas diarias. La dilución inicial (1/50) con su duplicado se coloca en el primer pozo y se realiza las 9 diluciones siguientes de manera horizontal. Los controles positivos (es suero o muestra de animales inmunizados con antígeno KLH), negativos (es suero o muestra de animales inmunizados con otro antígeno como HEL) y el blanco (no se coloca muestra) se colocan en las 2 últimas columnas. En la **tabla 4** se describe el procedimiento del ELISA.

PROCEDIMIENTO	IgG	IgG2a
SENSIBILIZACIÓN	50 µl de KLH (Pierce, EUA) en 100 ml de solución de buffer de carbonatos con pH 9.6. Se depositan 100 µl de esta mezcla en cada pozo de cada placa. Se deja reposar las placas sensibilizadas a temperatura ambiente toda la noche (un mínimo de 8 horas).	
BLOQUEO	<ul style="list-style-type: none"> -Se realizan 3 lavados a todas las placas. -Se le agregan 250 µl a cada pozo de la solución de bloqueo: 5% caseína en 250 ml de buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4). - Incubación por 1 hora a 37° C. 	<ul style="list-style-type: none"> - Se realizan 3 lavados a todas las placas. -Se le agregan 250 µl a cada pozo de la solución de bloqueo: 625 mg de Albúmina de Suero Bovino (Sigma) y 125 µl de Tween (Sigma) en 250 ml de buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4). - Incubación por 1 hora a 37° C.
MUESTRA	<ul style="list-style-type: none"> - Se realizan 3 lavados a todas las placas. - Se coloca en cada pozo las diluciones de la muestra de cada animal por día (y su duplicado), para posterior dilución. Las últimas 2 columnas se utilizan como control negativo y control positivo. La dilución inicial es de 1/50 y se realizarán 9 diluciones sucesivas a partir de los pozos con muestras en cada placa. -Terminando la última placa se incuban por 2 horas a 37° C. 	
1° CONJUGADO	<ul style="list-style-type: none"> - Se realizan 3 lavados a todas las placas. - Se agregan 100 µl a cada pozo de la solución con el conjugado (Pierce Chemical, en 40 ml de solución de bloqueo). -Las placas se incuban por 2 horas a 37° C. 	<ul style="list-style-type: none"> - Se realizan 3 lavados a todas las placas. -Se agregan 100 µl a cada pozo la solución con el conjugado (Zymed, en 40 ml de solución de bloqueo). -Las placas se incuban por 2 horas a 37° C.
2° CONJUGADO	No requiere segundo conjugado.	<ul style="list-style-type: none"> - Se realizan 3 lavados a todas las placas. -se agrega 100 µl a cada pozo de la solución del conjugado de estreptavidina peroxidasa HRP (Zymed) diluido en solución de bloqueo. -Las placas se incuban por 2 horas a 37° C.
REVELADO	<ul style="list-style-type: none"> - Se realizan 3 lavados a todas las placas. -Se les agregan 100 µl de solución reveladora: 40 mg de ABTS (Sigma) en 40 ml de buffer de citratos pH 4.2 más 40 µl de agua oxigenada (H₂O₂). - Se incuban todas las placas por 20 minutos a 37° C. Al transcurrir ese tiempo, se coloca las placas en un espectrofotómetro para medir la absorbancia a 405 nm de longitud de onda. 	

Tabla 4. Descripción de los eventos para la realización de la prueba de ELISA (Álvarez-Borda et al., 1995; Coligan, 1991). Todos los lavados de las placas se realizan con agua desionizada.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

El paquete estadístico utilizado para realizar todas las pruebas es Statview. En el CAS los valores del consumo del EC (sacarina) son expresados como porcentaje de su consumo basal de agua.

Todas las muestras de la rata fueron analizadas en la misma placa para ELISA. Los resultados de la respuesta de anticuerpos se expresaron de 2 modos. El primero como aumento neto en niveles de absorbancia normalizada contra KLH. Esta descripción muestra presencia y cantidad de anticuerpos. El segundo modo es como título de anticuerpos. El título de anticuerpo se define como el valor de la dilución de la muestra que da una señal o valor igual a 2.5 veces el fondo (control negativo) (Cruse, 1995).

Se manejaron valores normalizados con el propósito de disminuir los posibles errores inter-ensayo. Estos valores se obtienen del promedio de la absorbancia de cada muestra y su duplicado. Éste resultado se divide entre la absorbancia de los controles positivos para obtener la absorbancia normalizada. El título de las absorbancias normalizadas se obtuvo utilizando los valores de cada dilución de la muestra. Utilizando estos valores se realiza una regresión que se acercará a la dilución que contenga 2.5 veces el valor del control negativo, ese es el valor del título.

Varios estudios expresan sus resultados de prueba de la respuesta inmune en título de anticuerpos porque lo consideran un método más confiable (Ader et al., 1993; Husband, 1993; Vljaković et al., 1992); otros estudios prefieren mostrar cantidades absolutas del anticuerpo (Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001). La presentación de resultados que se desea mostrar es la absorbancia normalizada y la titulación de la absorbancia normalizada para demostrar verdadera evidencia del comportamiento del aumento de anticuerpos durante el experimento.

Se realizó Análisis de Varianza (ANOVA), del nivel de anticuerpos con los valores de las muestras basales, día 30, 40 y 50 a lo largo de las 10 diluciones de prueba.

RESULTADOS

I. PRIMER EXPERIMENTO

CAS

No se observó CAS utilizando 5 µg/Kg de IL-1 como EI. El consumo de sacarina no fue reducido en la prueba como consecuencia de la asociación con la inyección i.p. de IL-1 en la sesión de condicionamiento.

La ANOVA de los valores de consumo durante la prueba no mostró diferencias significativas en los niveles de consumo (sacarina) entre los grupos ($F_{3,33}=0.712$; $p < 0.551$); el grupo CSo no fue incluido en el análisis porque no fue expuesto a la sacarina (**figura1**).

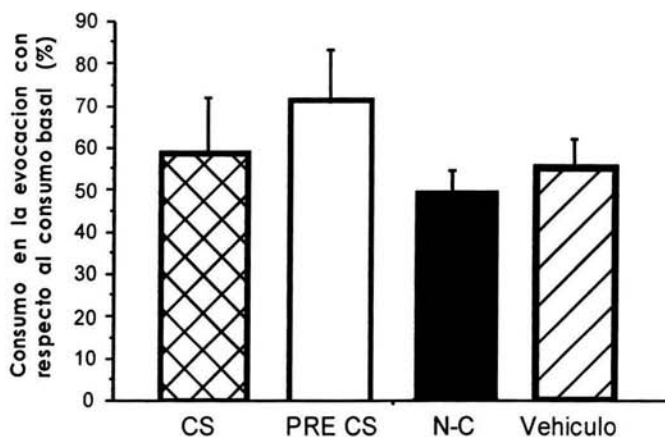


Figura 1. Consumo de sacarina durante la prueba expresado como porcentaje de consumo con respecto al consumo basal. La ANOVA entre los grupos experimentales no mostró diferencias significativas ($F_{3,33}=0.712$; $p < 0.551$). Los resultados se expresan como promedio más el error estándar.

ANTICUERPOS

IgG TOTALES

La ANOVA con los valores de las absorbancia normalizadas de anticuerpos IgG totales basales ($F_{4,41} = 0.601$; $p < 0.663$), del día 30 ($F_{4,41} = 1.892$; $p < 0.130$), 40 ($F_{4,41} = 1.613$; $p < 1.894$) y 50 ($F_{4,41} = 1.342$; $p < 0.270$) no mostró diferencias significativas en el nivel de anticuerpos contra KLH (ver **Figura 2**). Este efecto se mantiene en las 9 diluciones subsecuentes (se muestra la ANOVA del día 30 de las 9 diluciones restantes), 1/100 ($F_{4,41} = 1.172$; $p < 0.337$), 1/200 ($F_{4,41} = 1.539$; $p < 0.210$), 1/400 ($F_{4,41} = 0.78$; $p < 0.544$), 1/800 ($F_{4,41} = 0.892$; $p < 0.477$), 1/1600 ($F_{4,41} = 0.862$; $p < 0.495$), 1/3200 ($F_{4,41} = 0.781$; $p < 0.543$), 1/6400 ($F_{4,41} = 0.946$; $p < 0.447$), 1/12800 ($F_{4,41} = 1.183$; $p < 0.332$), 1/25600 ($F_{4,41} = 1.299$; $p < 0.286$).

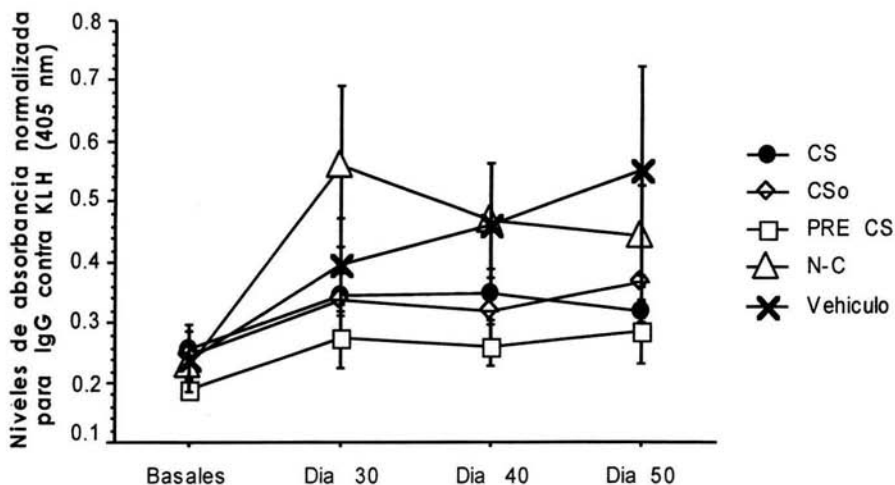


Figura 2. Absorbancias normalizadas de IgG contra KLH (dilución graficada 1/50) de los grupos experimentales. La prueba de ANOVA no mostró diferencias significativas. Los resultados se expresan como promedio más el error estándar.

IgG2a

La ANOVA aplicada a las absorbancia normalizadas de anticuerpos IgG2a basales ($F_{4,41}=0.416$; $p<0.795$), día 30 ($F_{4,41}=0.764$; $p<0.555$), 40 ($F_{4,41}=0.993$; $p<0.422$) y 50 ($F_{4,41}=0.442$; $p<0.777$) no muestra diferencias significativas entre grupos (ver **Figura 3**).

Este efecto se mantiene en las 9 diluciones subsiguientes (se muestra la ANOVA del día 30 de las 9 diluciones restantes), 1/100 ($F_{4,41}=0.553$; $p<0.698$), 1/200 ($F_{4,41}=0.681$; $p<0.609$), 1/400 ($F_{4,41}=0.411$; $p<0.800$), 1/800 ($F_{4,41}=0.453$; $p<0.769$), 1/1600 ($F_{4,41}=0.465$; $p<0.760$), 1/3200 ($F_{4,41}=0.604$; $p<0.661$), 1/6400 ($F_{4,41}=0.533$; $p<0.711$), 1/12800 ($F_{4,41}=0.413$; $p<0.798$) y 1/25600 ($F_{4,41}=0.518$; $p<0.723$).

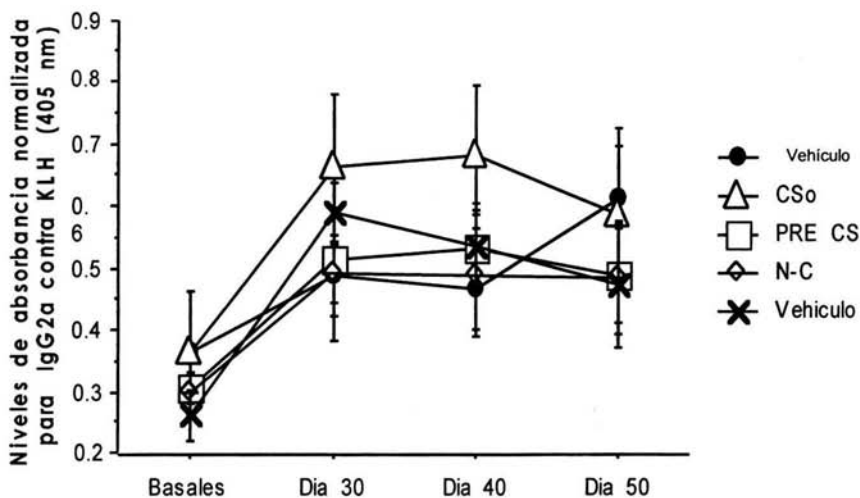


Figura 3. Absorbancias normalizadas de IgG2a contra KLH (dilución graficada 1/50). La ANOVA no mostró diferencias entre los grupos experimentales en las 9 diluciones subsiguientes. Los resultados se expresan como promedio más el error estándar.

TITULOS

La ANOVA de la titulación de las absorbancias normalizadas de anticuerpos IgG totales basales ($F_{4,44}=0.908$; $p<0.468$), día 30 ($F_{4,44}=0.688$; $p<0.604$), 40 ($F_{4,44}=0.506$; $p<0.731$) y 50 ($F_{4,44}=2.206$; $p<0.085$) no muestran diferencias significativas (**Figura 4**).

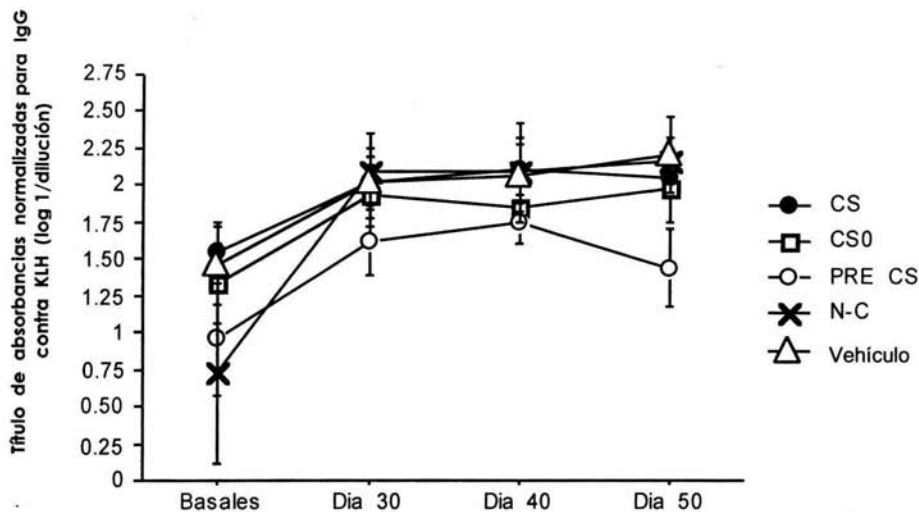


Figura 4. Títulos de las absorbancias normalizadas de IgG. La ANOVA no mostró diferencias significativas entre grupos. Los resultados se expresan como promedio más el error estándar.

La ANOVA aplicada a los valores titulados de las absorbancias normalizadas de anticuerpos IgG2a basales ($F_{4,41}=0.709$; $p<0.590$), el día 30 ($F_{4,41}=0.701$; $p<0.569$), 40 ($F_{4,41}=0.567$; $p<0.687$) y 50 ($F_{4,41}=0.479$; $p<0.751$) no muestra diferencias significativas entre los grupos (ver **Figura 5**).

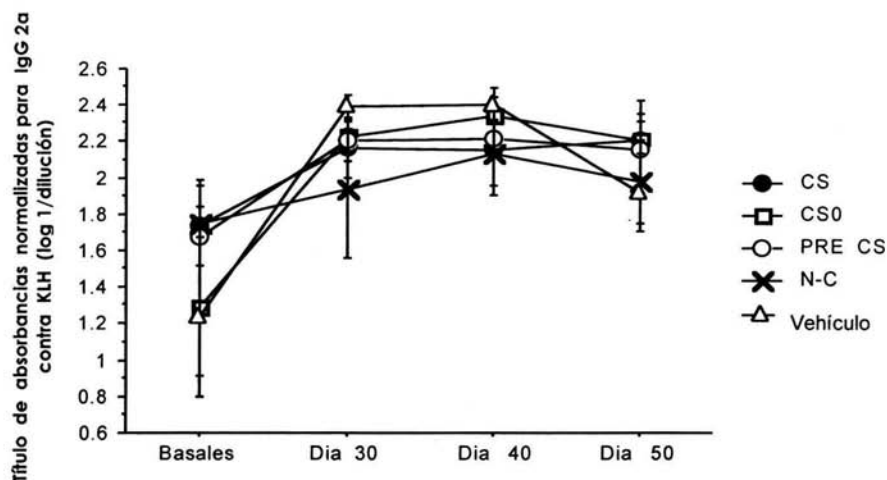


Figura 5. Titulación de las absorbancias normalizadas de anticuerpos IgG2a. La ANOVA no mostró diferencias significativas en los valores basales, del día 30, 40 y 50 entre los grupos. Los resultados se expresan como promedio más el error estándar.

II. SEGUNDO EXPERIMENTO

(DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA IL-1 EN LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS)

Se realizó un análisis estadístico de la prueba de t student con los valores de la absorbancia normalizada de los grupos A y B. La prueba muestra diferencias significativas en el nivel de IgG contra KLH entre el grupo que recibió KLH e IL-1 y el grupo que recibió sólo el KLH (ver tabla 3).

La **figura 6 a)** muestra que existe un aumento significativo en el grupo B (KLH+IL-1) con respecto al grupo A (KLH + SSI) del nivel de anticuerpos IgG en respuesta al KLH en el día 21 ($t_{14} = -2.287$; $p < 0.05$) y 30 ($t_{14} = -2.218$; $p < 0.05$) después del resto inmune.

La **figura 6 b)** muestra la respuesta de IgG2a, donde se observa diferencias significativas en el grupo B con respecto al grupo A en el día 30 después del reto inmune ($t_{14} = -2.218$; $p < 0.05$).

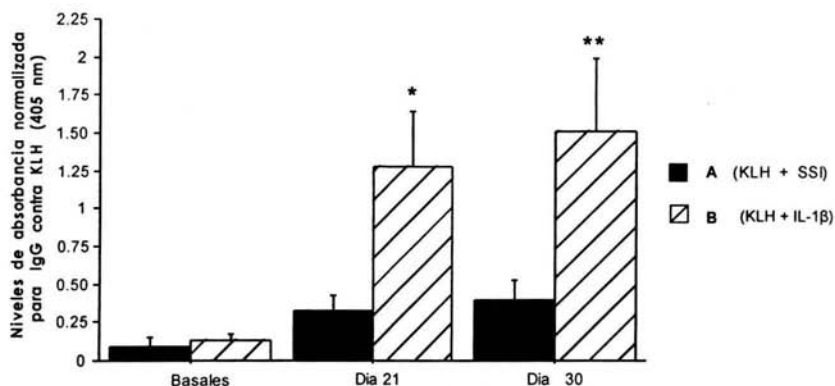


Figura 6 a) Efecto de la IL-1 en la respuesta de anticuerpos IgG al KLH (50 μg). El grupo A (KLH + SSI) difiere en los niveles de anticuerpos con el grupo B (KLH + IL-1) en el día 21 ($t_{14} = -2.287$; $p < 0.05$) y 30 ($t_{14} = -2.218$; $p < 0.05$) después del reto inmune (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Los resultados se expresan como promedio más el error estándar.

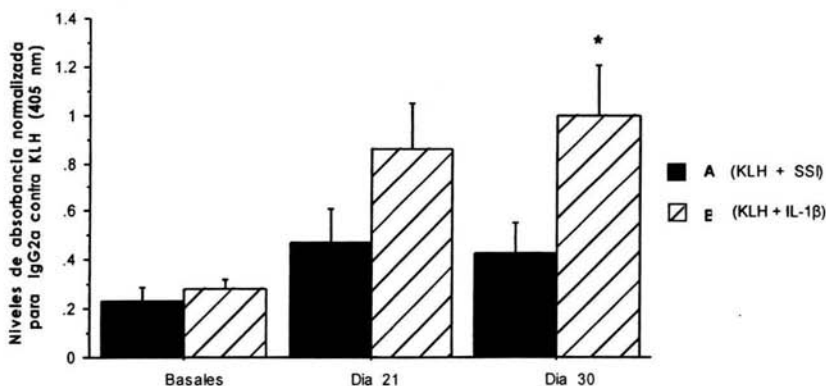


Figura 6 b) Efecto de la IL-1 en la respuesta de anticuerpos IgG2a al KLH (50 μg). El grupo A (KLH + SSI) difiere en los niveles de anticuerpos con el grupo B (KLH + IL-1) en el día 30 ($t_{14} = -2.218$; $p < 0.05$) después del reto inmune (* $p < 0.05$). Los resultados se expresan como promedio más el error estándar.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En este experimento se esperaba observar 2 condicionamientos con respuestas condicionadas independientes entre si (aumento de la respuesta primaria de anticuerpos y el CAS). En función a la ausencia de CAS y dada la naturaleza del fenómeno se sugieren las siguientes consideraciones como posibles explicaciones:

CAS

Se revisó las características del **EC** y del **EI** que pudieron contribuir a la ausencia del CAS. Existen varias características del **EC** (Intensidad, duración de la exposición, entre otras) que influyen en el desarrollo del condicionamiento para obtener la respuesta condicionada. Se eligió una de estas características para argumentar la concentración del **EC** en el tratamiento del presente trabajo: aumentar la saliencia (Dess, 1992; Kalat, 1974). Esta saliencia podría estar dada por 2 particularidades: concentración del sabor y/o novedad del sabor (Dess, 1993).

Se creyó que al aumentar la saliencia del **EC** (incrementando la concentración de sacarina) se podría inducir el CAS porque entre más concentrada es la solución, más se aleja del la familiaridad del sabor del agua (es decir; el sabor es más novedoso) y se sabe que las ratas forman un mejor CAS con soluciones nuevas en comparación con soluciones familiares (Kalat, 1974). El no obtener un CAS en este experimento, permite especular que el efecto de la concentración (de 0.25%) inhibió el CAS porque la solución debió ser tan concentrada y aversiva, que provoco neofobia desde la primera exposición, siendo atenuada esta neofobia, en las siguientes exposiciones.

Desde hace varios años, se ha observado CAS en experimentos de condicionamiento de algunas funciones inmunes, en los cuales se utilizan distintas sustancias como **EI** (LPS, LiCl, e IL-1) (Bull et al., 1994; Exton et al., 1995b; Exton et al., 1995d;

Wiertelak et al., 1994) apareado con sacarina como **EC**. Al revisar estos antecedentes se observa también una notable variación en la concentración de sacarina para inducir CAS y obtener respuesta inmune condicionada.

En experimentos de condicionamiento inmune se ha utilizado sacarina del 0.10 % al 0.15 % como **EC** apareado con LPS i.p. (100 µg), obteniendo CAS (Bull et al., 1991; Bull et al., 1994; Janz et al., 1996; Wiertelak et al., 1994). Utilizando concentraciones mayores de sacarina (0.10% hasta 0.35%) como **EC** en la sesión de condicionamiento, apareado con un elemento del sistema inmune (IL-1 dosis desde 5 ng hasta 10 µg) como **EI** se ha observado CAS (Dyck et al., 1990; Janz et al., 1991; Tazi et al., 1988).

Sin embargo, existen trabajos donde las altas concentraciones de sacarina inducen CAS además del condicionamiento de la función inmune, bajo condiciones idénticas (sacarina 1 % apareada con 100 µg de LPS i.p.). En 2 trabajos se observó CAS (modificación condicionada de la temperatura corporal, sueño y condicionamiento de la alteración de cobre en plasma) (Bull et al., 1994; Exton et al., 1995c) mientras que en el tercero (condicionamiento de la alteración de hierro en plasma) fue negativo para el CAS (Exton et al., 1995a). Cabe destacar, que los 3 trabajos anteriores proceden de un mismo laboratorio, ante esto, podemos suponer que las ratas desarrollan aversión específica a una concentración en particular por el cúmulo de eventos que acompaña el tratamiento (manipulación de los animales, elementos del ambiente, escenarios no controlados y el tratamiento mismo, así como la calidad del estímulo incondicionado). Estos eventos pueden contribuir con la asociación de estímulos para aumentar o inhibir la respuesta condicionada (Dess, 1992; Dess, 1993; Rozin and Kalat, 1971).

Al revisar las características del **EI** encontramos que desde hace varios años se demostró que las citocinas eran capaces de inducir CAS (Watkins et al., 1995). En un trabajo pionero de Tazi y colaboradores (1988), se hicieron 2 eventos de apareamientos de estímulos, a diferencia del modelo clásico de CAS estándar. Por otro lado, ese experimento carece de grupos control como el CS₀, el CS preexpuesto y el vehículo, que impide determinar la verdadera naturaleza del CAS, el cual se aprecia a concentraciones (10 µg y de 1.0 µg) que podrían resultar tóxicas (Dinarelo, 1991). En adición, la dosis más baja que induce CAS en ese experimento es cercana a la dosis utilizada en este trabajo (5 µg/kg).

Por último, en el presente trabajo, puede asumirse que las ratas no desarrollaron el CAS por 2 posibles causas: no se apareo la señal de malestar con el **EC** impidiendo que se desarrollará la respuesta condicionada (la aversión al sabor) al reexponer a los animales al **EC** durante la prueba. La otra causa podría haber sido la inducción y liberación de niveles insuficientes de IL-1 o de más citocinas en sangre. En ambos casos, es posible que la IL-1 β no fuera detectada por el SNC, sugiriendo que se debió aumentar la saliencia (concentración) del **EI** (la IL-1 β) (Dess, 1993) a pesar del riesgo que implica utilizar una dosis mayor. La IL-1 no debió ser aversiva como **EI** para inducir CAS en la dosis utilizada, por lo que se puede sugerir que no funcionó como **EI** en el CAS. Por otro lado, es bien sabido que es más fácil asociar algunos estímulos entre sí, en comparación con otros (Domjan, 1998). Quizás el tipo de malestar que provocó la IL-1 β fue más difícil de asociar que el malestar que induce por ejemplo, el LiCl.

Finalmente, este experimento propone considerar la idea de que no es factible inducir CAS en experimentos de condicionamiento de anticuerpos en un sólo apareo de estímulos, donde además, no se ha reportado el CAS (Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001).

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

Los resultados obtenidos en el primer experimento del presente trabajo (absorbancia y titulación) muestran que no existe diferencias estadísticas entre el grupo CS y los grupos CS₀ y N-C en las muestras del día 30, 40 y 50, a lo largo de las 10 diluciones de la prueba de ELISA, demostrando que no hubo aumento condicionado de la respuesta primaria de anticuerpos (para IgG e IgG2a) contra KLH, por lo tanto, no se observó condicionamiento de los efectos adyuvantes de la IL-1 β en el aumento de anticuerpos en un sólo apareo de estímulos. Los resultados del segundo experimento confirman que la IL-1 β aumenta la respuesta primaria de anticuerpos contra un antígeno, así mismo, también se confirma que el KLH es eficaz para inducir la respuesta de anticuerpos. La interpretación de los resultados de ambos experimentos sugieren que la IL1 β ha sido poco eficiente como **EI** y como posible mensajero entre el sistema inmune y el SNC durante el condicionamiento, así como su incierta participación en eventos tempranos de la inducción de la respuesta inmune de anticuerpos contra antígeno durante el condicionamiento.

Apoyándonos en las evidencias que sugieren que el condicionamiento de algunas funciones inmunes debieran ser mediadas por la liberación, acción y detección (por el SNC) de la IL-1 β , se decidió utilizarla como **EI** (Demissie et al., 1996; Elmquist et al., 1997; Janz et al., 1991; Janz et al., 1996; Kongsman et al., 2000; Longo et al., 1999; Rivest et al., 2000; Shimizu et al., 1994; Tazi et al., 1988; Vitkovic et al., 2000). Nuestros resultados del presente experimento, podrían reflejar una mezcla de propiedades del **EI**, el antígeno (como reto inmune) y la dificultad de la asociación entre estímulos que contribuyeran a no obtener la respuesta condicionada de anticuerpos.

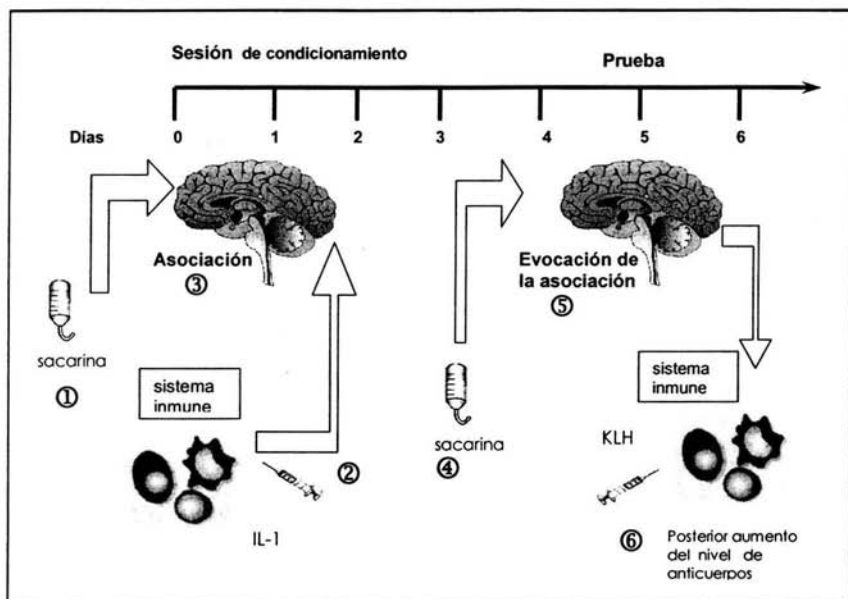
Para la primera condición se propone que la IL-1 β no participa en eventos ni induciendo moléculas inmunes que participen en la comunicación neuroinmune involucrada en el condicionamiento de la respuesta primaria de anticuerpos a un antígeno nuevo.

Para la segunda condición, se debe mencionar que el condicionamiento de anticuerpos ha sido confirmado en sólo 4 laboratorios (Ader et al., 1993; Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001), en 3 de estos se ha demostrado condicionamiento de anticuerpos en un sólo evento de apareamiento de estímulos utilizando el antígeno HEL (500 µg/ml) como **EI** (Álvarez-Borda et al., 1995; Madden et al., 2001). En adición, el efecto encontrado es modesto (ha excepción del primer laboratorio que lo reportó) y por otro lado, no se ha podido condicionar el aumento de anticuerpos con otra proteína inmunogénica en un sólo apareo de estímulos. Al respecto, Espinosa (2003) evaluó la posibilidad de utilizar otro antígeno como **EI**. Realizó varios experimentos utilizando el mismo protocolo de un sólo apareamiento entre estímulos como en Álvarez-Borda (1995) empleando como **EC** sacarina (0.15 %) y KLH como **EI**. En estos experimentos se manejó 3 intervalos de tiempo distintos entre la sesión de condicionamiento y la prueba (45, 92 y 94 días), 2 dosis diferentes de **EI** (50 µg/ml y 500 µg/ml) y el uso refuerzo (inyección del mismo antígeno 0.021 µg, dosis subinmunogénica) durante la prueba en uno de los experimentos. La sesión de condicionamiento consistió en exponer a los animales al **EC** y al **EI** según el tratamiento. La prueba se realizó 45 ó 92 ó 94 días después según el experimento y consistió en reexponer a los animales al **EC**, (en un experimento, todos los animales fueron sometidos al refuerzo). No se encontró efecto condicionado bajo ninguna de las condiciones antes descritas.

El presente trabajo, el segundo experimento demuestra que el antígeno (KLH) y la dosis (50 µg/ml) utilizada es inmunogénica en concordancia con un reportes previo (Espinosa et al., 2002), sin embargo, el efecto no es condicionado. A pesar de que el KLH posee características que pudieran otorgarle ventajas sobre otro antígeno (es una proteína estable, de gran tamaño y compleja estructura tridimensional, con menos variación entre individuos y se conserva mejor) (Orlova, 1997; Callahan, 2002), es posible que

estas características pudieron contribuir a que los efectos (la respuesta de anticuerpos) no fueran condicionados. Podría considerarse además, que la respuesta de anticuerpos al KLH sea tan fuerte que no se aprecie diferencias entre grupos.

Por otro lado, el haber utilizado el KLH como reto inmune y no como **EI** podría haber ocasionado un obstáculo en el desarrollo del condicionamiento. Álvarez-Borda y colaboradores (1995) utilizaron un tratamiento de condicionamiento clásico (sacarina apareada con HEL durante la sesión de condicionamiento y reexposición a la sacarina durante la prueba). En el presente trabajo se realizó un tratamiento más complejo con respecto al anterior (sacarina apareada con IL-1 β en la sesión de condicionamiento y exposición a la sacarina e inyección de KLH como reto inmune durante la prueba). Partiendo del concepto de que el condicionamiento clásico es una forma de aprendizaje que implica la asociación de ambos estímulos (el **EC** y el **EI**) en alguna estructura del SNC (durante la sesión de condicionamiento), teóricamente se esperaba que la exposición al **EC** (durante la prueba) fuera detectado por el SNC induciendo la respuesta condicionada (Espinosa y Bermúdez 2001). De este modo, posiblemente no se pudo adquirir el condicionamiento porque los animales respondieron a un estímulo nuevo (en la prueba) que no apareció en la sesión de condicionamiento: la inyección de antígeno para el reto inmune (ver **esquema 5**).



Esquema 5. Posibles eventos que ocurren durante el experimento, entre el sistema inmune y el SNC. La complejidad del tratamiento pudo haber evitado que se desarrollara el condicionamiento. (1) El EC se parea con el (2) EI. Bajo la tradición de asociación (3) se pretende que los animales adquieran la respuesta en la sesión de condicionamiento. Durante la prueba se expone a los animales al EC (4) donde se espera que se evoque (5) la asociación de estímulos que se llevó a cabo en la sesión de condicionamiento. Se suponía que esta evocación induciría el aumento de anticuerpos contra el KLH (6) (elementos tomados de Schedlowski, 1999; Kehoe, 2003). Compárese con el tratamiento del experimento de Alvarez-Borda, 1995 (Esquema 2).

Además de que los experimentos de condicionamiento inmune son escasos, poco se ha hablado de la dificultad para comparar los resultados de distintos experimentos de condicionamiento inmune. La utilización de diferentes especies (variación sistemática), sexo y uso parcial de grupos control, dificultan el análisis del fenómeno de condicionamiento inmune (Ader, 2003; Avitsur et al., 1997). Por otra parte, no se han investigado los factores que modifican el condicionamiento (intervalo entre estímulos, tiempo de exposición de cada estímulo, orden de exposición de los estímulos, número de

apareamientos, entre otros) y las características de los estímulos (saliencia, novedad, aversividad, entre otros) durante un condicionamiento inmune. Es necesario ahondar en la investigación de las cualidades de los estímulos bajo un condicionamiento inmune (Demissie et al., 1996; Kehoe y Macrae, 2003; Plata-Salaman, 1991). Parece importante guiar estudios para dilucidar cómo varía la respuesta de anticuerpos frente a distintas concentraciones de antígeno, la discriminación de antígenos, la utilización de distintas vías de administración y estudios de cinética del antígeno como **EI** durante el condicionamiento (Ader, 2003).

Muy probablemente, a pesar que el condicionamiento inmune comparte varias características y factores con el condicionamiento clásico, estas no modifican de igual manera el desarrollo del condicionamiento inmune. Deben existir elementos que no influyen de la misma manera en un condicionamiento clásico como en el condicionamiento inmune.

Finalmente, existen 2 aproximaciones para explicar el resultado de este experimento de condicionamiento de la respuesta de anticuerpos. Hasta ahora no se tiene certeza de que toda función inmune pueda condicionarse o que este sujeta a condicionarse bajo las mismas circunstancias experimentales que los antecedentes (un sólo apareo de estímulos)(Ader, 2003). Por ejemplo, estudios tan diversos de condicionamiento inmune como el aumento de niveles de histamina, transplante de piel, secreción de proteasas y la actividad de células NK, utilizan de 3 a 5 eventos de apareamientos entre estímulos para obtener la respuesta condicionada (Buske-Kirschbaum et al., 1982; Gorczynski et al., 1982; MacQueen et al., 1989; Russell et al., 1984).

También cabe la posibilidad de que el condicionamiento de la respuesta primaria de anticuerpos sea poco robusto porque depende de varias circunstancias que lo hacen poco general, difícil de replicar y por lo mismo, poco relevante.

Se necesita quizás controlar variables como el escenario, la manipulación de los animales, las inyecciones de los fármacos, entre otros; variables que podrían formar parte del complejo de estímulos, interfiriendo así, en el desarrollo o inhibición de la respuesta inmune condicionada. En suma, los resultados del presente trabajo sugieren la posibilidad de investigar más a fondo los factores y las características de los estímulos que pudieran modificar el condicionamiento inmune, cuales podrían ser los componentes y contextos que determinan la naturaleza y existencia de este modelo, estableciendo así la relevancia biológica y potencial aplicación clínica. Respecto a este último punto, existe la posibilidad de modificar las alteraciones de la respuesta inmune mediante condicionamiento inmune, asociando los estímulos (**EC** y **EI**) en un entorno apropiado, para inmunosuprimir (en casos de trasplante de órganos) ó para inmunoestimular (y reducir la cantidad de fármaco requerido, minimizando la toxicidad, los efectos secundarios y costo de los tratamientos clínicos) intentando así, desarrollar estrategias para uso terapéutico del condicionamiento inmune (Buske-Kirschbaum et al., 1982; Gorczynski et al., 1982; Longo et al., 1999; Olness and Ader, 1992).

REFERENCIAS

1. Ader R CN (2001) *Conditioning and immunity*. In: Psychoneuroimmunology (Ader R FDCN, ed), pp 3-34. San Diego: Academic Press.
2. Ader R (2003) *Conditioned immunomodulation: research needs and directions*. Brain Behav Immun 17 Suppl 1: S51-S57.
3. Ader R, Cohen N (1975) *Behaviorally conditioned immunosuppression*. Psychosom Med 37: 333-340.
4. Ader R, Cohen N (1991) *Conditioning of the immune response*. Neth J Med 39: 263-273.
5. Ader R, Grotta LJ, Cohen N (1987) *Conditioning phenomena and immune function*. Ann N Y Acad Sci 496: 532-544.
6. Ader R, Kelly K, Moynihan JA, Grotta LJ, Cohen N (1993) *Conditioned enhancement of antibody production using antigen as the unconditioned stimulus*. Brain Behav Immun 7: 334-343.
7. Ader R, Peck JH (1977) *Early learning and retention of a conditioned taste aversion*. Dev Psychobiol 10: 213-218.
8. Aiello FB, Longo DL, Overton R, Takacs L, Durum SK (1990) *A role for cytokines in antigen presentation: IL-1 and IL-4 induce accessory functions of antigen-presenting cells*. J Immunol 144: 2572-2581.
9. Álvarez-Borda, Ramírez-Amaya, Pérez-Montfort, Bermúdez-Rattoni (1995) *Enhancement of antibody production by a learning paradigm*. Neurobiol Learn Mem 64: 103-105.
10. Avitsur R, Pollak Y, Yirmiya R (1994) *Administration of interleukin-1 into the hypothalamic paraventricular nucleus induces febrile and behavioral effects*. Neuroimmunomodulation 4: 258-265.
11. Avitsur R, Pollak Y, Yirmiya R (1997) *Different receptor mechanisms mediate the effects of endotoxin and interleukin-1 on female sexual behavior*. Brain Res 773: 149-161.
12. Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD (1995) *Passage of cytokines across the blood-brain barrier*. Neuroimmunomodulation 2: 241-248.
13. Bermúdez-Rattoni F (2001) *Memoria: Donde se forma y donde reside*. México: Trillas.

14. Besedovsky H, del R, Sorkin E, Dinarello CA (1986) *Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones*. Science 233: 652-654.
15. Besedovsky H, Sorkin E, Felix D, Haas H (1977) *Hypothalamic changes during the immune response*. Eur J Immunol 7: 323-325.
16. Besedovsky HO, del R, Klusman I, Furukawa H, Monge A, Kabiersch A (1991) *Cytokines as modulators of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis*. J Steroid Biochem Mol Biol 40: 613-618.
17. Bluthé RM, Michaud B, Kelley KW, Dantzer R (1996a) *Vagotomy attenuates behavioural effects of interleukin-1 injected peripherally but not centrally*. Neuroreport 7: 1485-1488.
18. Bluthé RM, Michaud B, Kelley KW, Dantzer R (1996b) *Vagotomy blocks behavioural effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes*. Neuroreport 7: 2823-2827.
19. Boraschi D, Villa L, Ghiara P, Presentini R, Bossu P, Censini S, Nucci D, Massone A, Rossi R, Flad HD (1991) *Differential inhibition of IL-1 beta activities and receptor binding by monoclonal antibodies mapping within a discrete region of the protein*. Lymphokine Cytokine Res 10: 377-384.
20. Brown R, King MG, Husband AJ (1992) *Sleep deprivation-induced hyperthermia following antigen challenge due to opioid but not interleukin-1 involvement*. Physiol Behav 51: 767-770.
21. Bull DF, Brown R, King MG, Husband AJ (1991) *Modulation of body temperature through taste aversion conditioning*. Physiol Behav 49: 1229-1233.
22. Bull DF, Exton MS, Husband AJ (1994) *Acute-phase immune response: lipopolysaccharide-induced fever and sleep alterations are not simultaneously conditionable in the rat during the inactive (light) phase*. Physiol Behav 56: 143-149.
23. Bures J B-RFYT (1998) *Conditioned taste aversion: memory of a special kind*. Oxford, New York, Tokio : Oxford University.
24. Buske-Kirschbaum, Kirschbaum C, Stierle H, Lehnert H, Hellhammer D (1982) *Conditioned increase of natural killer cell activity (NKCA) in humans*. Psychosom Med 54: 123-132.
25. Coligan JE (1991) *Current protocols in immunology*. New York: J. Wiley.: J. Wiley.
26. Conrad A, Bull DF, King MG, Husband AJ (1997) *The effects of lipopolysaccharide (LPS) on the fever response in rats at different ambient temperatures*. Physiol Behav 62: 1197-1201.

27. Coussons R, Dykstra LA, Lysle DT (1994) *Pavlovian conditioning of morphine-induced alterations of immune status: evidence for opioid receptor involvement*. *J Neuroimmunol* 55: 135-142.
28. Cruse JM LREC (1995) *Illustrated dictionary of immunology*. Boca Raton, Florida : CRC.
29. Dantzer R (2001) *Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications*. *Ann N Y Acad Sci* 933: 222-234.
30. Dantzer R, Aubert A, Bluthé RM, Gheusi G, Cremona S, Laye S, Konsman JP, Parnet P, Kelley KW (1999a) *Mechanisms of the behavioural effects of cytokines*. *Adv Exp Med Biol* 461: 83-105.
31. Dantzer R, Konsman JP, Bluthé RM, Kelley KW (2000) *Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent?* *Auton Neurosci* 85: 60-65.
32. Dantzer R, Wollman EE, Vitkovic L, Yirmiya R (1999b) *Cytokines, stress, and depression. Conclusions and perspectives*. *Adv Exp Med Biol* 461: 317-329.
33. Demissie S, Rogers CF, Hiramoto NS, Ghanta VK, Hiramoto RN (1996) *Lipopolysaccharide and IL-1 alpha activate CNS pathways as measured by NK cell activity*. *Physiol Behav* 59: 499-504.
34. Dess NK (1992) *Divergent responses to saccharin vs. sucrose availability after stress in rats*. *Physiol Behav* 52: 115-125.
35. Dess NK (1993) *Saccharin's aversive taste in rats: evidence and implications*. *Neurosci Biobehav Rev* 17: 359-372.
36. Dinarello CA (1991) *Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism*. *Blood* 77: 1627-1652.
37. Dinarello CA, Clark BD, Ikejima T, Puren AJ, Savage N, Rosoff PM (1993) *Interleukin 1 receptors and biological responses*. *Yale J Biol Med* 63: 87-93.
38. Dinarello CA, Wolff SM (1993) *The role of interleukin-1 in disease*. *N Engl J Med* 328: 106-113.
39. Domjan M (1998) *Principles of learning and behavior*. New York: Wadsworth Publishing.
40. Domjan M, Gillan D (1976) *Role of novelty in the aversion for increasingly concentrated saccharin solutions*. *Physiol Behav* 16: 537-542.
41. Dyck DG, Janz L, Osachuk TA, Falk J, Labinsky J, Greenberg AH (1990). *The Pavlovian conditioning of IL-1-induced glucocorticoid secretion*. *Brain Behav Immun* 4: 93-104.

42. Elmquist JK, Scammell TE, Saper CB (1997) *Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response*. Trends Neurosci 20: 565-570.
43. Espinosa E, Bermudez R (2001) [*Behavior-immunity relationship: the role of cytokines*]. Rev Invest Clin 53: 240-253.
44. Espinosa E, Calderas T, Flores-Muciño O, Pérez-García G, Vázquez-Camacho AC (2003) *Enhancement of antibody response by one-trial conditioning: Contrasting result using different antigens*. Brain Behav Immun.
45. Espinosa, E., Flores-Muciño, O, Pérez-García, G., and Vázquez-Camacho, A. C. *Enhancement of IgG2a Response Associated with Interleukin 1beta-induced Conditioned Taste Aversion*. Brain Behav Immun 16[182]. 2002.

Ref Type: Abstract

46. Exton MS, Bull DF, King MG (1995a) *Behavioral conditioning of lipopolysaccharide-induced anorexia*. Physiol Behav 57: 401-405.
47. Exton MS, Bull DF, King MG, Husband AJ (1995b) *Behavioral conditioning of endotoxin-induced plasma iron alterations*. Pharmacol Biochem Behav 50: 675-679.
48. Exton MS, Bull DF, King MG, Husband AJ (1995c) *Modification of body temperature and sleep state using behavioral conditioning*. Physiol Behav 57: 723-729.
49. Exton MS, Bull DF, King MG, Husband AJ (1995d) *Paradoxical conditioning of the plasma copper and corticosterone responses to bacterial endotoxin*. Pharmacol Biochem Behav 52: 347-354.
50. Felten DL (2000a) *Neural influence on immune responses: underlying suppositions and basic principles of neural-immune signaling*. Prog Brain Res 122: 381-389.
51. Felten DL (2000b) *Neural influence on immune responses: underlying suppositions and basic principles of neural-immune signaling*. Prog Brain Res 122: 381-389.
52. Fleshner M, Goehler LE, Hermann J, Relton JK, Maier SF, Watkins LR (1995) *Interleukin-1 beta induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated*. Brain Res Bull 37: 605-610.
53. Goehler LE, Gaykema RP, Hansen MK, Anderson K, Maier SF, Watkins LR (2000) *Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway*. Auton Neurosci 85: 49-59.
54. Goehler LE, Gaykema RP, Nguyen KT, Lee JE, Tilders FJ, Maier SF, Watkins LR (1999) *Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems?* J Neurosci 19: 2799-2806.
55. Gorczynski R, Macrae S, Kennedy M (1982) *Conditioned immune response associated with allogeneic skin grafts in mice*. J Immunol 129: 704-709.

56. Guthridge CJ, Eidlén D, Arend WP, Gutierrez H, Smith MF (1997) *Lipopolysaccharide and Raf-1 kinase regulate secretory interleukin-1 receptor antagonist gene expression by mutually antagonistic mechanisms*. Mol Cell Biol 17: 1118-1128.
57. Hiramoto RN, Rogers CF, Demissie S, Hsueh CM, Hiramoto NS, Lorden JF, Ghanta VK (1997) *Psychoneuroendocrine immunology: site of recognition, learning and memory in the immune system and the brain*. Int J Neurosci 92: 259-285.
58. Husband AJ (1993) *Role of central nervous system and behaviour in the immune response*. Vaccine 11: 805-816.
59. Janz LJ, Brown R, Zuo L, Falk J, Greenberg AH, Dyck DG (1991) *Conditioned taste aversion but not adrenal activity develops to ICV administration of interleukin-1 in rats*. Physiol Behav 49: 691-694.
60. Janz LJ, Green J, Murray L, Vriend CY, Nance DM, Greenberg AH, Dyck DG (1996) *Pavlovian conditioning of LPS-induced responses: effects on corticosterone, splenic NE, and IL-2 production*. Physiol Behav 59: 1103-1109.
61. Kalat JW (1974) *Taste salience depends on novelty, not concentration, in taste-aversion learning in the rat*. J Comp Physiol Psychol 86: 47-50.
62. Kehoe JM, Macrae M (2003) *Fundamental Behavioral Methods and Findings in Classical Conditioning*. pp 171-231.
63. Kent S, Bluthé RM, Dantzer R, Hardwick AJ, Kelley KW, Rothwell NJ, Vannice JL (1992) *Different receptor mechanisms mediate the pyrogenic and behavioral effects of interleukin 1*. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 9117-9120.
64. Kent S, Bret D, Kelley KW, Dantzer R (1996) *Mechanisms of sickness-induced decreases in food-motivated behavior*. Neurosci Biobehav Rev 20: 171-175.
65. Kent S, Rodriguez F, Kelley KW, Dantzer R (1994) *Reduction in food and water intake induced by microinjection of interleukin-1 beta in the ventromedial hypothalamus of the rat*. Physiol Behav 56: 1031-1036.
66. Konsman JP, Blond D, Vignes S (2000) *Neurobiology of interleukin-1 receptors: getting the message*. Eur Cytokine Netw 11: 699-702.
67. Konsman JP, Kelley K, Dantzer R (1999) *Temporal and spatial relationships between lipopolysaccharide-induced expression of Fos, interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in rat brain*. Neuroscience 89: 535-548.
68. Longo DL, Duffey PL, Kopp WC, Heyes MP, Alvord WG, Sharfman WH, Schmidt PJ, Rubinow DR, Rosenstein DL (1999) *Conditioned immune response to interferon-gamma in humans*. Clin Immunol 90: 173-181.

69. Luheshi GN, Stefferl A, Turnbull AV, Dascombe MJ, Brouwer S, Hopkins SJ, Rothwell NJ (1997) *Febrile response to tissue inflammation involves both peripheral and brain IL-1 and TNF-alpha in the rat*. Am J Physiol 272: R862-R868.
70. Lysle DT, Luecken LJ, Maslonek KA (1992) *Modulation of immune status by a conditioned aversive stimulus: evidence for the involvement of endogenous opioids*. Brain Behav Immun 6: 179-188.
71. 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.
72. Madden KS, Boehm GW, Lee SC, Grota LJ, Cohen N, Ader R (2001) *One-trial conditioning of the antibody response to hen egg lysozyme in rats*. J Neuroimmunol 113: 236-239.
73. Olness K, Ader R (1992) *Conditioning as an adjunct in the pharmacotherapy of lupus erythematosus*. J Dev Behav Pediatr 13: 124-125.
74. Orlova EV, Dube P, Harris JR, Beckman E, Zemlin F, Markl J, van H (1997) *Structure of keyhole limpet hemocyanin type 1 (KLH1) at 15 Å resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution*. J Mol Biol 271: 417-437.
75. Plata-Salaman (1991) *Immunoregulators in the nervous system*. Neurosci Biobehav Rev 15: 185-215.
76. Plata-Salaman (1998) *Cytokine-induced anorexia. Behavioral, cellular, and molecular mechanisms*. Ann N Y Acad Sci 856: 160-170.
77. Plata-Salaman, French M (1992) *Intracerebroventricular administration of a specific IL-1 receptor antagonist blocks food and water intake suppression induced by interleukin-1 beta*. Physiol Behav 51: 1277-1279.
78. Rivest S, Lacroix S, Vallieres L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N (2000) *How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli*. Proc Soc Exp Biol Med 223: 22-38.
79. Roitt IM, Brostoff J, Male D (1998) *Immunology*. London: Mosby-Year.
80. Rothwell NJ, Hopkins SJ (1995) *Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action*. Trends Neurosci 18: 130-136.
81. Rozin P, Kalat JW (1971) *Specific hungers and poison avoidance as adaptive specializations of learning*. Psychol Rev 78: 459-486.
82. Russell M, Dark KA, Cummins RW, Ellman G, Callaway E, Peeke HV (1984) *Learned histamine release*. Science 225: 733-734.

83. Schafe GE, Sollars SI, Bernstein IL (1995) *The CS-US interval and taste aversion learning: a brief look*. Behav Neurosci 109: 799-802.
84. Shimizu N, Hori T, Nakane H (1994) *An interleukin-1 beta-induced noradrenaline release in the spleen is mediated by brain corticotropin-releasing factor: an in vivo microdialysis study in conscious rats*. Brain Behav Immun 8: 14-23.
85. Tazi A, Dantzer R, Crestani F, Le M (1988) *Interleukin-1 induces conditioned taste aversion in rats: a possible explanation for its pituitary-adrenal stimulating activity*. Brain Res 473: 369-371.
86. Vitkovic L, Konsman JP, Bockaert J, Dantzer R, Homburger V, Jacque C (2000) *Cytokine signals propagate through the brain*. Mol Psychiatry 5: 604-615.
87. Vlajković S, Dugandžija N, Milanović S, Janković BD (1992) *Brain self-stimulation and immunity: effect on humoral and cell-mediated immune responses*. Int J Neurosci 69: 235-250.
88. Watkins LR, Maier SF, Goehler LE (1995) *Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms*. Life Sci 57: 1011-1026.
89. Weingarten HP (1996) *Cytokines and food intake: the relevance of the immune system to the student of ingestive behavior*. Neurosci Biobehav Rev 20: 163-170.
90. Wiertelak EP, Smith KP, Furness L, Mooney H, Mayr T, Maier SF, Watkins LR (1994) *Acute and conditioned hyperalgesic responses to illness*. Pain 56: 227-234.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA