

03081 10
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

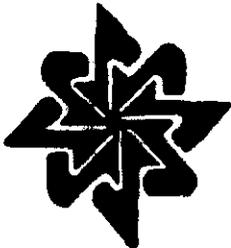


UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

EL CONDICIONAMIENTO INMUNOACTIVADOR:
UN MODELO PARA ENTENDER LAS
COMUNICACIONES NEUROINMUNE

T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A :
VICTOR RAMIREZ AMAYA

DIRECTOR DE TESIS: DR. FEDERICO BERMUDEZ RATTONI



MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE DE [REDACTED]

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1999

273256 1



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A Erminda
Por todo ese impulso que le haz dado a nuestras vidas

Agradecimientos

A Federico Bermúdez Rattoni. Convertirme en un Hombre de ciencia fue una elección mía, pero poder lograrlo es algo que tendré que agradecerle el resto de mi vida. Gracias

A mis sinodales: Dr Luis Llorente Peters, Dr Vianney Ortiz Navarrete, Dr Roberto Prado Alcalá, Dr Ranulfo Romo Trujillo, Dr. Leopoldo Santos Argumedo, y Dr Ricardo Tapia Ibargiengoytia. Por sus apreciables comentarios y sugerencias que sin duda contribuyeron a presentar un mejor trabajo.

En particular a los investigadores Dr. Ricardo tapia Ibargiengoytia, Dr. Ruy Pérez Montfort y Dr. Federico Bermúdez Rattoni quienes como tutores durante mis estudios doctorales contribuyeron de manera importante a mi formación.

Un muy especial agradecimiento a Benjamin Alvarez Borda, con quien emprendimos juntos esta aventura del condicionamiento inmunoactivador y es sin dudad responsable de que este trabajo se haya logrado. Gracias también por ser mi amigo.

A Enrique Espinosa y Gustavo Pacheco quienes con entusiasmo han seguido esta linea de investigación.

A Maribel Miranda por compartir conmigo una amistad y por lo mucho que nos aguantamos. Aprovechando también a Jana y Jimena por su entusiasmo.

Un muy especial agradecimiento a mi Padre el Ing. Victor Ramírez Izquierdo. El apoyo más sólido, el más grande ejemplo y mi más fiel amigo.

A mi Madre y Hermana por que me han enseñado el valor de una Familia.

Finalmente a mis Amigos: Jorge Escandon, Oscar Galicia, Carlos Lang, Roberto Matiella, Enrique Reyna, Juan y Neto. Gracias por estar conmigo.

Indice

Resúmen.....	5
Abstract.....	6
Introducción a la neuroinmunología.....	7
El término psiconeuroinmunología.....	7
Interacciones inmuno'endócrinas.....	7
El sistema nervioso autónomo y el sistema inmune.....	9
Las interleucinas como sistema de retroalimentación.....	10
El condicionamiento de la respuesta inmune.....	14
El condicionamiento inmunosupresor.....	14
El condicionamiento inmunoactivador.....	16
Trabajo 1 Enhancement of Antibody Production by a Learning Paradigm B. Alvarez-Borda, V. Ramírez-Amaya, R. Pérez-Montfort y F Bermúdez-Rattoni.....	20
Comentario al trabajo 1.....	24
Estructuras involucradas en el condicionamiento inmune.....	25
La corteza insular y el CAS.....	25
La corteza insular, la amígdala y el CIS.....	27
Trabajo 2 Conditioned Enhancement of Antibody Production is Disrupted by Insular Cortex and Amygdala but not Hippocampal Lesions V. Ramírez-Amaya and F. Bermúdez-Rattoni.....	29
Comentarios al trabajo 2.....	45
Trabajo 3 Las señales inmunes que informan al sistema nervioso V. Ramírez Amaya, G. Pacheco López y F. Bermúdez Rattoni.....	46
La estrategia del intervalo óptimo.....	46
Método.....	48
Resultados.....	49
Discusión.....	51
Conclusiones Generales.....	54
Referencias.....	61
Abreviaturas.....	67

Resumen:

El término *psiconeuroinmunología* describe a la disciplina encargada de estudiar las interacciones entre el sistema nervioso central y el sistema inmune. Para el estudio científico de estas interacciones se requiere de un modelo de comunicación neuroinmune. En la actualidad se utilizan diversos modelos que han permitido entender algunos detalles de esta interacción, sin embargo, hasta el momento estos modelos no han sido capaces de proveernos de una imagen completa de lo que es la neuroinmunomodulación. En la presente tesis se plantea la utilidad del modelo de condicionamiento inmune en el estudio de las relaciones neuroinmunes. El condicionamiento de la respuesta inmune se realiza mediante un procedimiento de condicionamiento clásico, en el cual el apareamiento de un sabor con un estímulo inmunológicamente relevante, permite que el sabor se convierta en un estímulo capaz de inducir un efecto en el sistema inmune semejante al estímulo inmunológico. En la presente tesis se presenta la elaboración del modelo de condicionamiento inmune que se realiza mediante el apareamiento de un sabor con un antígeno capaz de inducir un incremento en la producción de anticuerpos específicos para este. Después del apareamiento se reexpone a los animales al sabor, y se toman muestras de sangre en donde se observa un incremento en la producción de anticuerpos semejante al que se observa cuando se reexpone a los animales al antígeno. Los datos que demuestran la posibilidad de obtener este condicionamiento inmunoactivador son presentados como el primer trabajo publicado de la tesis. Para demostrar la utilidad de este modelo en el estudio de las relaciones neuroinmunes se realizó un trabajo en el que mediante el uso de lesiones en el sistema nervioso se demuestra la participación de dos estructuras neurales en el condicionamiento inmunoactivador. Adicionalmente se presentan los datos de un experimento en el cual mediante una estrategia conductual se encuentra evidencia de la posible participación de factores liberados por células inmunitarias en la señalización inmune al sistema nervioso. Finalmente se discuten los datos como evidencia de la utilidad del modelo de condicionamiento inmunoactivador para el estudio de las relaciones funcionales entre el sistema nervioso y el sistema inmunológico.

Abstract:

Psiconeuroimmunology is the discipline that studies the interaction between the brain and the immune system. A proper model of neural immune communication is necessary for the study of such interactions. Several models of communication has been used. However, those models have not been powerful enough to give us a full picture of neuroimmunomodulation. This dissertation proposes the usefulness of the conditioned immunoenhancement paradigm as an important model for understanding the whole picture of neural immune interactions. Conditioned immunoenhancement is obtained by the pairing of a sensory stimulus, in this case saccharine with an antigen (in the case studied Hen Egg Lisozyme). Twenty five days after pairing, the animals are reexposed to the saccharine flavour and blood samples collected 4, 8, 12 and 16 days after reexposure. An increase in antibody production against lisozyme is observed in conditioned animals reexposed to the saccharine flavour. Data demonstrating conditioned immunoenhancement represent the first work in the tesis. To demonstrate the usefulness of conditioning in neural immune interactions, the second work used lesions in the central nervous system which affect the acquisition of conditioning immunoenhancement, and suggest the participation of cortical and lymbic system structures in the mechanisms underlying conditioning immunity. Additionally we present preliminary data from an experiment in which the use of a behavioural strategy provide evidence suggesting the involvement of interleukins as signals from immune cell to the central nervous system. Finally, in the discussion the data is used to support the idea that conditioned immunoenhancement is the best model for understanding the neural immune interactions.

Introducción a la neuroinmunología

El término psiconeuroinmunología

En la actualidad es reconocida la existencia de una importante interacción funcional entre el sistema nervioso y el sistema inmunológico. Esta relación funcional permite que la actividad del sistema inmune sea modulada a través del sistema nervioso central. Los detalles de cómo se lleva a cabo ésta son de interés para las ciencias biológicas y las ciencias de la salud, estas últimas evidentemente atraídas por la potencial riqueza clínica que representa este tema. La psiconeuroinmunología, como se le ha llamado a esta rama del conocimiento, está encargada de entender como funcionan las redes de comunicación neuroinmune estudiando la manera en como interactúan los procesos conductuales, neurales, endócrinos e inmunológicos.

El término psiconeuroinmunología comenzó a utilizarse hace no más de 2 décadas, y existe ahora un abundante grupo de datos que documentan los vínculos neuroanatómicos, neuroendócrinos y neuroquímicos al sistema inmune. Esto ha permitido que se modifique el concepto de autonomía funcional del sistema inmunológico. A pesar de que se han hecho importantes avances que han modificado la forma en como se ve al sistema inmune y se ha reconocido la importancia que para la función inmune representa el sistema nervioso, aún no se conoce la naturaleza de todos los canales de comunicación neuroinmune, ni el significado funcional de las interacciones que se establecen.

Se sabe que existen principalmente dos vías de comunicación que vinculan al sistema nervioso con el sistema inmune. La primera está representada por el eje hipotálamo hipofisiario y la segunda por el sistema nervioso autónomo. Históricamente la vía hipotalámica ha recibido mucha atención, en virtud de que los factores hormonales se reconocieron tempranamente como importantes agentes moduladores de la respuesta inmune, de ahí el surgimiento de la inmuno-endocrinología.

Interacciones inmuno-endócrinas

El ejemplo clásico de modulación neuroendócrina sobre la respuesta inmune lo representa el estrés. Cuando las condiciones ambientales son percibidas por un individuo como amenazantes y le resulta difícil adaptarse a ellas, se considera éste un evento estresante, ante el cual se presentará una gran variedad de cambios fisiológicos que se sabe

contribuyen al desarrollo de enfermedades, sobre todo cuando se está expuesto a agentes patógenos (Weiner, 1977). En modelos animales se ha podido demostrar que las situaciones estresantes incrementan la susceptibilidad a desarrollar cáncer inducido experimentalmente y se hacen más sensibles a infecciones virales (Keller, Schleifer & Demetrikopoulos, 1991).

El estrés produce un incremento en la liberación del factor liberador de corticotropinas por el hipotálamo, la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) por la pituitaria anterior y finalmente la liberación de glucocorticoides por la corteza adrenal (Basedovsky, Del-Rey & Sorkin, 1985). Los efectos inmunológicos de los glucocorticoides se conocen desde mediados del siglo XIX (Munck & Guyre, 1991), los cuales son inmunosupresores y anti-inflamatorios.

Son muchas las hormonas que juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune. Por ejemplo, la hormona de crecimiento incrementa el tamaño de los tejidos linfoides, particularmente del timo y también se ha sugerido que esta hormona puede afectar la actividad de linfocitos y macrófagos cuando se encuentran en tejido linfático (Kelley, 1991). La prolactina parece estar involucrada en la activación de linfocitos B para la formación de anticuerpos, en la expresión de respuestas de hipersensibilidad de tipo retrasada y parece mediar la activación de linfocitos T cuando ésta depende de macrófagos (Nagy, Berczy, Wren, Asa & Kovacs, 1983). La tirotropina también se ha asociado a la modulación de la respuesta inmune, llevando a cabo una acción potenciadora de la respuesta (Fabris, Mocchegiani & Provinciali, 1995), el hipotiroidismo por ejemplo, induce involución en el timo, el bazo y en nodos linfáticos, en contraste, el hipertiroidismo incrementa la actividad de las células del timo y de otras regiones de tejido linfoide (Fabris et al., 1995).

Debido a que las hormonas son factores importantes en la modulación de la respuesta inmunitaria, y teniendo en cuenta que el hipotálamo a través de la hipófisis controla la mayor parte de los procesos endócrinos, no es sorprendente que los primeros estudios dirigidos a localizar una región neural implicada en la neuroinmunomodulación se enfocaran al estudio del papel que el hipotálamo juega en las interacciones neuroinmunes. En experimentos en donde se utilizaron lesiones electrolíticas del hipotálamo para determinar su efecto sobre la respuesta inmune, observaron cambios en la actividad de diversos grupos de células linfáticas; por ejemplo, Cross, Markesberry, Brooks y Roszman, (1980) demostraron que las lesiones del hipotálamo anterior, produce un decremento en la respuesta de las células de bazo. Baciú (1992) propuso que la parte posterior del hipotálamo

se involucrada en la regulación e integración de la respuesta inmune, considerándose como una función homeostática en conexión con el hipotálamo anterior; donde los núcleos laterales y el área preóptica cumplen una función receptiva ante diversos cambios en el estatus de la respuesta inmune.

El sistema nervioso autónomo y el sistema inmune

La otra vía mediante la cual el sistema nervioso modula la respuesta inmune es a través del sistema nervioso autónomo. Los órganos linfoides primarios y secundarios son inervados por fibras noradrenérgicas simpáticas postganglionares (Felten & Felten, 1991). También se pueden encontrar fibras peptidérgicas inervando la médula osea, el timo, el bazo, ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado a las mucosas (Felten & Felten, 1991). Dichas fibras nerviosas forman uniones neuroefectoras cercanas a linfocitos y macrófagos, que regulan la función de estas células de una forma más directa. Los neurotransmisores liberados de estas terminales nerviosas pueden difundirse para actuar en sitios lejanos, lo cual extiende el potencial interactivo entre el sistema nervioso autónomo y el sistema inmune. Así también, las células linfáticas expresan receptores para una gran variedad de neuropéptidos y para adrenalina y noradrenalina (Husband, 1993).

En la literatura se puede encontrar una gran variedad de evidencia acerca de la inervación simpática al tejido linfoide. Con técnicas histoquímicas, se ha demostrado la presencia de inervación simpática en regiones específicas de tejido linfoide primario y secundario (Felten, Felten, Carlson, Olschowka & Livnat, 1985). Estas inervaciones son predominantemente noradrenérgicas (Madden, Ackerman, Livnat, Felten & Felten, 1989). Por ejemplo, al bazo arriban fibras noradrenérgicas provenientes del ganglio mesentérico (Felten et al., 1985) entrando junto a la arteria del bazo y distribuyéndose en el sistema capsular. Se ha demostrado que la destrucción de las eferencias simpáticas afectan una gran variedad de funciones inmunes como la distribución de los linfocitos en el bazo y el establecimiento de la respuesta inmune (Reder, Karaszewsk & Arnason, 1989). La simpatectomía también altera la función de las células asesinas naturales (NK) y agudiza los problemas asociados a algunos tipos de daños autoinmunes (Reder et al., 1989).

Con el recurso experimental de las lesiones en el sistema nervioso se ha obtenido evidencia de la participación de estructuras centrales en la regulación de la respuesta inmune. Lesiones de diversas estructuras del tallo cerebral producen cambios en la actividad inmunitaria. Al lesionarse la parte caudal de la formación reticular, se observa

una inhibición de respuestas anafiláticas, mientras que si se lesiona la parte rostral de la formación reticular, incluyendo los núcleos del rafe, se presenta un incremento en la sensibilidad de este tipo de respuestas (Isakovic & Jankovic, 1973). Se ha encontrado también que lesiones de los núcleos parabraquiales del puente, particularmente los ventrales y mediales, producen un decremento en la respuesta proliferativa de timocitos (Kadlecova, Masek, Seifert & Petrovicky, 1987). Estos núcleos están integrados dentro de las conexiones entre el tallo cerebral y los núcleos autonómicos, tal como el núcleo del tracto solitario, el hipotálamo y la circuiteria de la amígdala, y pueden estar involucrados en el procesamiento de información proveniente del sistema inmune (Felten et al., 1991). Lo anterior explica el por qué estructuras del sistema límbico se han vinculado a la comunicación neuroinmune. Se sabe que lesiones efectuadas con excitotoxinas en el area septal incrementan la actividad de células NK, disminuyen el número de células formadoras de plaquetas y suprimen la secreción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) por macrófagos (Wetmore, Green-Johnson, Gartner, Sanders & Nance, 1994). Se ha visto también que lesiones del hipocampo afectan la respuesta de producción de anticuerpos dependiendo del lugar en donde se localice la lesión (Pan & Long, 1993).

Neveu (1992) ha sugerido la participación de la corteza cerebral en la modulación de la respuesta inmune, proponiendo la existencia de un sistema lateralizado. Este autor encontró que lesiones de la neocorteza izquierda de ratón (incluyendo todo tipo de cortezas), producen un decremento en el número de células T y disminución de su actividad mitogénica, y lo mismo en células NK. Las lesiones de la neocorteza derecha producen efectos opuestos. Estos resultados los explica en términos de una función lateralizada en donde la modulación que ejerce el sistema nervioso sobre el sistema inmune es asimétrica.

Las interleucinas como sistema de retroalimentación

Tenemos entonces que el sistema nervioso tiene la capacidad de ejercer una importante influencia sobre la respuesta inmune. Sin embargo, para que un sistema pueda funcionar adecuadamente como un modulador debe contar con información apropiada acerca de la variable o variables que esta modulando. Es decir, el sistema nervioso central requiere de información proveniente del sistema inmune para que pueda darse una interacción reguladora entre ellos.

Las citocinas son un grupo de moléculas polipeptídicas que se asocian generalmente con la activación del sistema inmune y la estimulación de respuestas inflamatorias. En los

últimos años se ha acumulado evidencia que señala que estas moléculas pueden tener efectos sobre tejido nervioso, probablemente sirviendo como un sistema de retroalimentación de información entre el sistema inmune y el sistema nervioso central.

Se ha encontrado que diferentes interleucinas como la IL-1, IL-2, IL-3, IL-6 y TNF- α pueden servir como señales para el sistema nervioso en virtud de que diversos grupos de células neurales y células gliales expresan receptores para dichas moléculas (Hopkins & Rothwell, 1995). Con técnicas de hibridación e inmunohistoquímica, se ha encontrado evidencia de la existencia de receptores a diversos tipos de interleucinas en diferentes regiones de tejido neural. Estructuras neurales como el hipocampo, la amígdala, el hipotálamo, la corteza cerebral, regiones del tallo como el núcleo del tracto solitario (NTS) y el núcleo parabraquial del puente (NPP), y en especial las células del sistema nervioso autónomo, expresan receptores para diversos tipos de interleucinas (Hopkins & Rothwell, 1995).

Diversas son las funciones que tienen las interleucinas en el sistema nervioso. A la IL-1 se le ha asociado con inducción de fiebre (Hori et al., 1991), estimulación de la liberación de corticotropinas (Bernardini, Calogero, Mauceri & Chrousos, 1990) y modificación de la ingesta de alimentos (Saito, Akiyoshi & Shimizu, 1991) entre otras cosas. A otras interleucinas como la IL-2, IL-6 y el TNF- α se les atribuyen papeles funcionales en el sistema nervioso. Tanto el TNF- α como la IL-6 se han asociado con las respuestas hiperalérgicas (Rothwell & Hopkins, 1995). La IL-2 y la IL-6 activan el eje hipotálamo-hipofisiario, estimulando la liberación de ACTH. También se han implicado a las citocinas en cambios plásticos a nivel sináptico, por ejemplo, la IL-1 β , la IL-2, y el TNF- α , entre otros, se ha visto que inhiben la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo, aunque cabe señalar que no puede generalizarse el mecanismo de acción de estas citocinas en la LTP, en virtud de que cada una de ellas produce efectos que varían en términos del curso temporal y la magnitud de la respuesta (Patterson & Nawa, 1993).

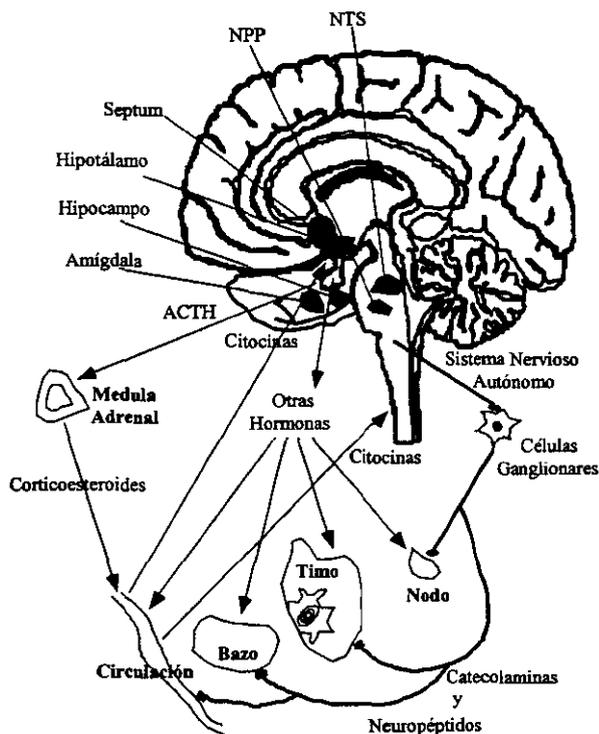
La expresión de receptores a interleucinas en células nerviosas y la evidencia de que estas moléculas pueden tener un papel funcional en el sistema nervioso, plantean el problema de cómo las citocinas secretadas a nivel periférico por células linfoides logran atravesar la barrera hematoencefálica y acceder al sistema nervioso central para llevar a cabo su función mensajera. El transporte pasivo a través de la barrera hematoencefálica es poco probable debido al tamaño y estructura de las interleucinas. En contraste se ha descrito un sistema de transporte activo para la IL-1 y el TNF- α (Gutierrez, Banks & Kastin, 1993)

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

Si bien es posible que las interleucinas liberadas periféricamente puedan llegar a regiones de sistema nervioso central, no existe evidencia que permita concluir que directamente los productos liberados por células linfoides, al llegar a regiones de sistema nervioso central, fungan como mensajeros de información inmunitaria importante para los mecanismos de neuroinmunomodulación. En contraste, existe la propuesta de que la innervación de fibras autonómicas a tejido linfoide constituye la principal fuente de información inmune del sistema nervioso central (Luheshi, Hammond & Dam, 1996). Dichas innervaciones presentan una amplia gama de receptores para interleucinas en las terminales simpáticas que innervan órganos linfoides como el timo y el bazo (Hart, Liu, Shadiack, McCormack & Jonakait, 1993; Marz et al., 1998). En este caso no existe el problema de cómo las moléculas liberadas por las células inmunes llegan a donde están los receptores, ni tampoco la confusión que puede generarse por la procedencia del mensaje, como en el caso de los receptores que se encuentran en sistema nervioso central en donde la pregunta es: ¿cómo distingue la célula si la citocina fue liberada por la microglía o proviene de una célula linfoide en la periferia?.

En este sentido, recientemente se ha obtenido evidencia de la posibilidad de que el nervio vago sea la principal ruta de acceso de información inmune al sistema nervioso, en donde las citocinas liberadas por células linfoides en órganos linfáticos constituyen los estímulos para el sistema nervioso (Luheshi et al., 1996), y los núcleos de tallo que integran información visceral, como el NTS y el NPP, representan los principales centros de relevo que han de llevar la información hasta regiones del sistema límbico como la amígdala y el hipotálamo o también probablemente a la corteza (Luheshi et al., 1996).

A continuación se presenta un esquema en donde se resumen las vías de comunicación neuroinmune, con lo que se pretende sintetizar lo hasta ahora visto (ver esquema 1).



Esquema 1. Se muestran las principales vías de comunicación entre el sistema nervioso central y el sistema inmune. NPP: núcleo parabraquial del puente; NTS: núcleo del tracto solitario; ACTH: hormona adeno cortico trópica.

El condicionamiento de la respuesta inmune

El condicionamiento inmunosupresor

Como se menciona en la sección anterior, el sistema nervioso recibe información proveniente del sistema inmune y es capaz de afectar considerablemente diferentes parámetros de la respuesta inmune, por lo cual se puede considerar que el sistema nervioso funciona como un regulador del sistema inmunológico, lo cual hace posible que los mecanismos plásticos que ocurren en el sistema nervioso afecten al sistema inmune. De hecho, se ha demostrado que se puede modular el sistema inmune a través de un mecanismo de plasticidad nerviosa como lo es el aprendizaje, específicamente por medio de procedimientos de condicionamiento clásico.

Desde principios de siglo y a raíz del descubrimiento del reflejo condicionado por Ivan Pavlov, gran parte de la escuela de fisiología Rusa se dedicó a buscar la manera de condicionar una gran variedad de respuestas autónomas. El experimento clásico de Pavlov consistía en utilizar un estímulo (el sonido de una campana) que normalmente no fuese capaz por sí solo de inducir la respuesta en estudio (en su caso la salivación). El estímulo condicionado se aparea contingentemente (presentación contigua y predictiva) en repetidas ocasiones con un estímulo que sí sea capaz de inducir la respuesta de interés (estímulo incondicionado, en este caso comida). Después de varios ensayos de apareamiento el animal adquiere la capacidad de producir la respuesta condicionada (salivación) ante la presentación aislada del estímulo condicionado (sonido de la campana).

Metal'nikov y Chorine en 1926 (citados por Ader & Cohen, 1985) buscaron condicionar el incremento de leucocitos polimorfonucleares evocado por la inyección de un antígeno (*Bacillus anthracis*) como estímulo incondicionado (EI), apareándola con un estímulo inmunológicamente neutro como el calentamiento o el rascado rítmico de un área específica de la piel. Como parte de la respuesta incondicionada, se observó un rápido incremento del 90% de células polimorfonucleares en 5 hrs que perdura por 1 o 2 días. La respuesta condicionada que se generó, también se daba de manera rápida aún cuando representaba solo un 60% de incremento en la población de células polimorfonucleares y perduró solo por algunas horas. El hecho de que no se hayan podido replicar dichos resultados dio lugar a que algunos teóricos propusieran que el fenómeno podía ser producto de un artificio metodológico, y evidenciaron la falta de controles para demostrar que los resultados obtenidos fueran producto de un condicionamiento clásico (Ader & Cohen,

1985). Otro factor que resta relevancia a las investigaciones rusas fue el hecho de que se desconocía completamente la existencia de comunicación neuroinmune, considerándose en ese entonces al sistema inmune como un sistema completamente autónomo.

En 1975, dos investigadores de la universidad de Rochester (Ader & Cohen, 1975), encontraron azarosamente la posibilidad de obtener un condicionamiento de la respuesta inmune a través del uso de un modelo de condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), descrito originalmente por John García en 1955. En este modelo se aparea un estímulo gustativo con algún otro cuyo efecto sea el de producir la sensación de malestar en el animal, para ello se puede utilizar cloruro de litio, el cual provoca irritación gástrica. En la siguiente presentación del sabor, el animal presenta una marcada aversión al sabor asociado al malestar. Ahora bien, al utilizar como estímulo productor de malestar a la ciclofosfamida, la cual se conoce por su capacidad inmunosupresora, observaron que al reexponer en repetidas ocasiones a los animales con el fin de observar la curva de extinción del condicionamiento, los animales morían. Al investigar las causas de la mortandad encontraron que los animales se encontraban inmunosuprimidos. De esta manera con experimentos más controlados se abocaron a la tarea de demostrar que los animales habían sido entrenados a responder deprimiendo su respuesta inmune ante un estímulo gustativo.

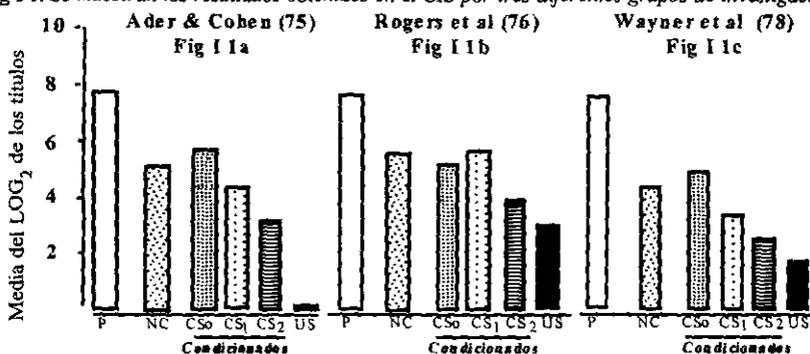
Para demostrar que el fenómeno observado se trataba de un condicionamiento utilizaron 5 grupos de animales 3 de los cuales recibieron el apareamiento de sacarina y ciclofosfamida (CS1, CS2 y CS0). El grupo CS1 y CS0 recibieron el apareamiento durante una ocasión, mientras que el CS2 lo recibió en dos ocasiones. Los grupos CS1 y CS2 fueron reexpuestos al estímulo condicionado (sacarina) mientras que el grupo CS0 el día de la reexposición fue expuesto a agua. Un cuarto grupo de animales fue utilizado como placebo (P), el cual el día del apareamiento fue expuesto solo a la sacarina y el día de la reexposición la sacarina se le presentó nuevamente. Finalmente el quinto grupo recibió el apareamiento de agua con ciclofosfamida y el día de la reexposición fue expuesto a la sacarina por primera ocasión. El uso de los diferentes grupos nos permite saber si el efecto es producido exclusivamente por el estímulo condicionado (CS0) y solo cuando este estímulo ha sido condicionado (P y NC).

Los resultados del experimento se presentan en la figura 11, en donde se muestra la producción de anticuerpos para eritrocitos de camero, como la forma de evaluar el estatus inmunológico de los diferentes grupos de animales. Se puede observar que los grupos que

presentan la menor producción de anticuerpos son los grupos condicionados reexpuestos a la sacarina.

Estos datos fueron replicados por otros dos grupos de investigadores más adelante (Rogers, Reich, Strom & Carpenter, 1976; Wayner, Flannery & Singer, 1978). A este fenómeno se le denominó entonces condicionamiento inmunosupresor (CIS), el cual se demostró más adelante, produce también efectos depresores de la actividad de células NK (O'Reilly & Exon, 1986) y decremента la capacidad proliferativa de linfocitos ante la estimulación por mitógeno (Ader, Cohen & Bovbjerg, 1982).

Fig 1. Se muestran los resultados obtenidos en el CIS por tres diferentes grupos de investigación. En el eje



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

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

El condicionamiento immunoactivador

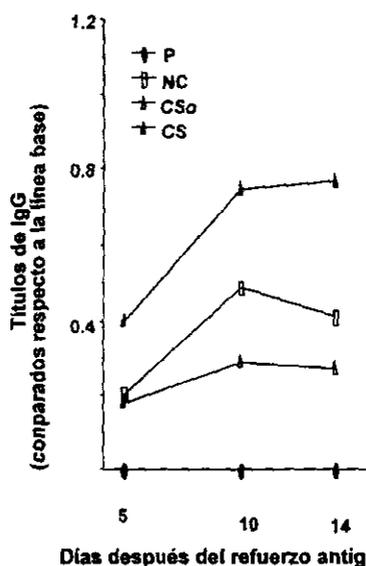
Sin embargo la idea original de los investigadores rusos de condicionar una respuesta inmune a través del apareamiento de un estímulo con un antígeno había tenido poco éxito. En 1982, Gorczynski, Macrae y Kennedy, transplantaron tejidos alogénicos en ratones bajo condiciones ambientales constantes. Cuando se realizaron ensayos quirúrgicos como los realizados durante los trasplantes pero sin la implantación de tejido, los ratones

presentaron un incremento en las células precursoras de linfocitos T citotóxicos, lo cual manejaron como evidencia de condicionamiento. Sin embargo, los datos no fueron muy consistentes y los controles del procedimiento no son del todo acertados. Más tarde, Jenkins, Chadwick y Nevin (1983) al utilizar un procedimiento de CAS como estímulo condicionado y la inyección de eritrocitos de carnero como estímulo incondicionado, observaron un incremento en los títulos de anticuerpos para eritrocitos de carnero en los animales condicionados, presentando diferencias estadísticas con los animales controles. Sin embargo, las muestras de sangre fueron tomadas cuando todavía la respuesta primaria al antígeno no había cesado y en la muestra más lejana a la exposición al antígeno (día 20) las diferencias no son significativas. Los datos son sugerentes de un condicionamiento, sin embargo el trabajo presenta muchos problemas, como la falta de controles apropiados y un análisis estadístico que parece sesgado, por lo que pocos consideran al trabajo como una demostración de un condicionamiento activador de la respuesta inmune.

Otros grupos de investigación lograron exitosamente una liberación condicionada de histamina en respuesta al estímulo condicionado previamente asociado a albúmina sérica bovina (Russell et al., 1984). Así también se ha podido condicionar la producción de proteasa II de células mastoides de rata ante una respuesta anafiláctica (MacQueen, Marshall, Perdue, Siegel & Bienenstock, 1989), utilizando como estímulo condicionado una señal audiovisual y como estímulo incondicionado la administración de albúmina de huevo. Estos trabajos han dado lugar a una hipótesis que propone que las respuestas anafilácticas pueden ocurrir en la ausencia del antígeno lo cual sugiere que estas pueden ser producto de un proceso de condicionamiento. De hecho Ader y Cohen (1985) mencionan en una revisión acerca del condicionamiento inmune, que gran parte de los problemas alérgicos pueden tener su origen en un condicionamiento inmune.

A pesar de estos ejemplos de condicionamiento inmune con el uso de antígenos, no se había descrito todavía un condicionamiento inmune en el que se viera incrementado la producción de anticuerpos. A finales del 1993 Ader y colaboradores (Ader, Kelly, Moynihan, Grotta & Cohen, 1993) publicaron un trabajo en el que de una manera más cuidadosa demuestran la posibilidad de obtener un incremento en la producción de inmunoglobulina G (IgG) contra un antígeno, que en este caso fue una proteína llamada *key hole lymph hemocyanine* (KLH). Durante tres sesiones, 5 grupos de ratones recibieron el apareamiento de leche con chocolate y una inyección intraperitoneal de 100 ng de KLH. Esta pequeña cantidad de antígeno sirve para sensibilizar al ratón y permite que la segunda y tercera inmunización evoquen una respuesta inmune secundaria y terciaria que regresa a

niveles basales relativamente bajos después de 3 a 4 semanas. Esto lo hicieron para evitar una fuerte elevación de los niveles de anticuerpos para el antígeno cuya persistencia fuera tal que se sobreimpusiera al efecto del estímulo condicionado. El día de la reexposición los animales recibieron una pequeña dosis del antígeno (2.5 ng) incapaz por sí misma de inducir un incremento en la producción de anticuerpos, a la cual se le puede considerar como un refuerzo (boost). Se observó así (Ver Fig 12) que los animales condicionados reexpuestos al estímulo gustativo presentaron los títulos de IgG más altos seguido por otro grupo que recibió el apareamiento de manera no contingente, después los condicionados pero no reexpuestos al estímulo gustativo y finalmente el grupo placebo, el cual no fué condicionado aún cuando si recibió la exposición al antígeno durante las sesiones de condicionamiento.



Tomado de Ader, Kelly, Moynihan, Gro (1993) *Brain Behav. Immun.* 7: 334-343

Fig 12. Se muestran los títulos de IgG para KLH en animales condicionados reexpuestos al estímulo gustativo y a una baja dosis de antígeno. P: placebo; NC: condicionado no contingente; CS0: condicionado no reexpuesto; CS: condicionado reexpuesto.

Como se observa en la literatura, existe evidencia de la posibilidad de condicionar la producción de anticuerpos a través de un procedimiento de condicionamiento clásico. Sin embargo, los procedimientos para obtener el condicionamiento requieren de diversos

ensayos y/o del uso de dosis no inmunogénicas que permitan observar el condicionamiento. Lo cual hacía difícil pensar en que este condicionamiento pudiera servir de modelo para el estudio de las relaciones neuroinmunes.

Trabajo 1

Con el propósito de obtener un condicionamiento a través de un procedimiento de un solo ensayo para poder utilizarlo como modelo de neuroinmunomodulación, nos concentramos en la tarea de establecer un condicionamiento mediante el apareamiento de un sabor y un antígeno, analizando la producción de inmunoglobulinas G y M varios días después de la reexposición al estímulo condicionado.

El primer problema con el que nos topamos fue la elección de un antígeno apropiado. Comenzamos utilizando como antígeno la albúmina de huevo (OVA) tal y como lo hicieron Husband y Cols (1993), pero los animales inmunizados con este antígeno no presentaban una respuesta inmune suficientemente robusta. Ader y Cols (1993) habían utilizado como antígeno KLH el cual es bastante inmunogénico, probablemente por esta razón decidieron dar pequeñas dosis que indujeran sólo una respuesta inmune tenue y transitoria y evitar así tener que esperar un largo período de tiempo a que pasara la respuesta primaria; además mencionan que la inducción de una respuesta primaria robusta hacía que los niveles de anticuerpos en la sangre se mantuvieran durante meses a niveles relativamente altos que podían impedir ver el efecto del condicionamiento. Por ello, comenzamos a utilizar lizosima de Gallina (HEL) la cual es una proteína inmunogénica para la rata y después de 3 semanas se puede observar que los títulos de anticuerpos disminuyen a niveles prácticamente no detectables. En general a los 20 días los animales no presentan títulos importantes de IgG anti-HEL, por lo cual se decidió hacer todo el experimento para demostrar la posibilidad de un condicionamiento inmuno-activador con el apareamiento de un sabor y un antígeno. Los primeros resultados obtenidos fueron alentadores, pues sin el uso de un refuerzo (boost) y 30 días después del apareamiento, fuimos capaces de inducir una respuesta condicionada suficientemente robusta. Nuestros controles eran un grupo NC condicionado con agua y un grupo CSo condicionado no reexpuesto. Todo parecía indicar que era posible obtener un condicionamiento con un sólo ensayo y sin el uso del refuerzo antigénico. Entusiasmados por esta posibilidad decidimos realizar el siguiente trabajo.

RAPID COMMUNICATION

Enhancement of Antibody Production by a Learning Paradigm

B. ALVAREZ-BORDA,* V. RAMÍREZ-AMAYA,* R. PÉREZ-MONTFORT,† AND F. BERMÚDEZ-RATTONI*¹**Departamento de Neurociencias and †Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, D.F., Mexico 04510*

The experiments described here show that production of serum antibody to a defined protein antigen (hen egg-white lysozyme) can be elicited by classical Pavlovian conditioning in Wistar rats. Reexposure of animals to a gustatory conditioned stimulus that had previously been paired with antigen induces a reliable increase in antibody production. This conditioned production of antibodies of IgM and IgG isotypes is similar to that found in secondary responses elicited by reinjection of antigen. These findings demonstrate that the immune system can be stimulated to produce apparently normal antibody responses by a simple behavioral paradigm. © 1995 Academic Press, Inc

Strong relationships between the brain and the immune system are now widely accepted (Ader, Felten, & Cohen, 1990). There is extensive evidence supporting the influence of immune function by the central nervous system (Husband, 1993) and data are accumulating that indicate the immune system exerts influence on the brain (Rothwell & Hopkins, 1995). Pavlovian conditioning has been used to demonstrate behavioral influences on immunity. It has been shown that cellular and humoral immunity can be modified through conditioning. In particular, conditioned immunosuppression can be readily obtained in animals by the association of a taste with an immunosuppressive drug. On subsequent exposure to the conditioned taste, the animals show an attenuated immune response (for review, see Ader & Cohen, 1993).

¹ This research was supported by Grant IN201993 from DGAPA and by Facultad de Psicología, UNAM. We thank Oreste Carbajal for technical assistance and Christopher Ormsby for editing our manuscript. Correspondence and reprint requests should be addressed to F. Bermúdez-Rattoni, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado postal 70-253, 04510 México, D.F., México. Fax: 525-6225607; E-mail: fbermaude@ifscsun1.ifisiol.unam.mx.

Surprisingly, little attention has been given to the enhancement of immune responses by conditioning. The first of such experiments, performed by Metalnikov and Chorine (1926), went largely unnoticed. Only recently has interest begun to grow in the study of humoral and cellular responses to conditioned immunoactivation. Some researchers have used antigen as the unconditioned stimulus (UCS) to produce conditioned secretion of mast cell mediators (MacQueen, Marshall, Perdue, Siegel, & Bienenstock, 1989). More recently, Husband, Lin, Madsen, and King (1993) paired ovalbumin and LiCl (which produces gastric malaise) as the UCS with the taste of saccharin as the conditioned stimulus (CS). Their results suggest that upon reexposure to a conditioned stimulus an immune response to ovalbumin can be enhanced. However, their study lacked some relevant controls. Ader, Kelly, Moynihan, Grota, and Cohen (1993) demonstrated that antibody production against a protein antigen can be elicited, after pairing antigen with a chocolate drink during several training sessions, by reexposure to the CS coupled to a nonimmunogenic dose of antigen.

Although several research groups have worked on conditioned immune responses, the conditioned enhancement of antibody production using an antigen as the UCS has not yet been characterized. In this experiment, we have tried to further analyze this phenomenon by evaluating the production of immunoglobulin M (IgM) and IgG through time and comparing it with a normal secondary immune response, using a single conditioning trial.

Male Wistar rats weighing 250–300 g were used in all experiments following an acclimation period of 1 week to laboratory conditions. The animals were caged individually and maintained under a 12-h light–dark schedule (dark, 7–19 h). Food and drinking water were provided *ad libitum*, except when

TABLE 1
Experimental Procedures

Experimental days:		0	9	39	43, 47, 51, 55
Group	Sample	Conditioning treatment	Test trial	Samples	
CS	BLs	Sac + HEL	Sac	4, 8, 12, 16*	
CSo	BLs	Sac - HEL	H2O	4, 8, 12, 16	
NC	BLs	H2O + HEL	Sac	4, 8, 12, 16	
UCS	BLs	H2O - HEL	H2O - HEL	4, 8, 12, 16	

* Number of days after the test trial in which blood samples were taken.

baseline water consumption was measured. All experiments were performed during the dark period. Four days before the conditioning treatment was started, rats were bled by an incision in the tail (Akana, Scribner, Bradbury, Strack, Walker, & Dallman, 1992) to obtain baseline levels of serum antibody (BIs).

Rats were divided into four groups (see Table 1). On the fourth day, all rats were deprived of water for 12 h. For the next 4 days baseline water consumption was measured by placing drinking water in graduated test tubes for 10 min twice a day (9:00 AM and 9:00 PM). On Day 9, the conditioning day, rats in groups CS ($n = 11$) and CSo ($n = 13$) were exposed to a 0.1% saccharin solution (SAC) for 10 min followed by an intraperitoneal (ip) injection of 0.5 mg of hen egg-white lysozyme (HEL) in 300 μ l of normal Abbot's saline. The rats in groups UCS ($n = 8$) and NC ($n = 7$) received the same ip injection of HEL paired with water. At 25 days after the immunization with HEL, when primary response anti-HEL antibodies were no longer detectable by our method (data not shown), rats were once again deprived of water and a new baseline water consumption was measured. On the test trial day (Day 39), rats from groups CS and NC were given SAC, while rats from groups CSo and UCS were given water. Additionally, rats from the UCS group were reimmunized with 0.5 mg of HEL to induce a normal secondary response. Blood samples were collected by tail incisions, 4, 8, 12, and 16 days after reexposure to SAC (on Experimental Days 43, 47, 51, and 55, respectively). Sera were obtained by centrifuging the blood samples at 3500 rpm for 15 min and stored at -70°C until determination of anti-HEL antibody by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Ninety six-well ELISA plates were coated overnight at 4°C with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of HEL in carbonate buffer, pH 9.6, and postcoated for 1 h at 37°C with PBS-1%BSA (blocking buffer). The test sera were diluted 1:50 in blocking buffer and incubated for 2 h at 37°C . Peroxidase-conjugated rabbit anti-rat IgG

and anti-rat IgM (Sigma) were diluted 1:10,000 in blocking buffer and incubated for 2 h at 37°C . The plates were then incubated for 20 min with ABTS substrate dissolved at a concentration of 50 mg/ml in 0.1 M citrate buffer, pH 4.2, and 3% H_2O_2 . Absorbance was read at 405 nm, using a reference wavelength of 490 nm, on an EL312e microplate reader (Bio-tek Instruments). Results of the absorbance values were analyzed by Group \times Sample days with repeated measures ANOVA. In addition, one-way ANOVA was used within sample days to assess group differences, with Duncan's post hoc test where appropriate.

Saccharin consumption on the test trial day did not vary significantly from the acquisition day. Figure 1 shows the production of IgM anti-HEL antibodies on 3 different days after the test trial day. The repeated measures ANOVA showed a significant effect of treatment ($F_{3,24} = 6.06, p < .01$) on IgM production; this analysis also revealed statistical differences among days ($F_{3,74} = 14.42, p < .01$) and Treatment \times Days interaction ($F_{9,74} = 2.907, p < .01$). We found no significant differences among groups on Day 4. On Day 8 a simple ANOVA yielded a significant group effect ($F_{3,30} = 6.84, p < .01$) and Duncan's post hoc analysis showed a significantly elevated antibody production of CS when compared to CSo or NC (p 's $< .05$) and of UCS when compared to CSo or NC (p 's $< .01$). No differences were found on Day 12.

The repeated measures ANOVA of IgG anti-HEL antibody production yielded a significant effect of treatment ($F_{3,26} = 14.45, p < .01$), throughout days ($F_{4,107} = 20.38, p < .01$), and Treatment \times Days interaction ($F_{12,107} = 4.08, p < .01$; Fig. 2). One-way ANOVA showed differences among groups on Days 4 ($F_{3,33} = 9.15, p < .01$), 8 ($F_{3,30} = 7.52, p < .01$), 12

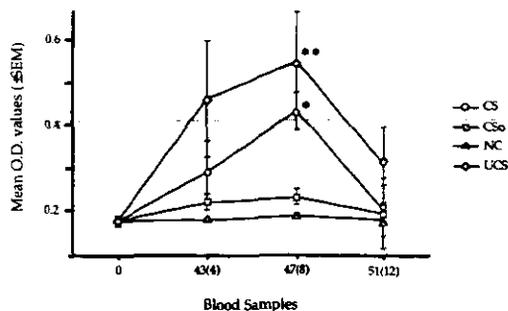


FIG. 1. Anti-HEL IgM production by groups CS, CSo, UCS, and NC. The ordinate axis shows the mean optical densities and the abscissa axis shows the experimental days (days after the test trial). ** $p < .01$; * $p < .05$ compared with the NC group.

($F_{3,32} = 8.3, p < .01$), and 16 ($F_{3,31} = 11.32, p < .01$) after the test trial. The post hoc Duncan analysis showed that the UCS group had a significantly greater production of IgG when compared to all groups on Day 4, but only with groups CSo and NC on Days 8, 12, and 16. We found that the CS group showed significantly elevated antibody production when compared with the CSo (Day 8, $p < .05$; Day 12, $p < .01$; Day 16, $p < .01$) and NC (Day 8, $p < .01$; Day 12, $p < .01$; Day 16, $p < .01$) groups in the last three samples. No statistical differences were found between CSo and NC for the duration of the experiment.

In these experiments we have demonstrated that an antibody response can be reliably elicited by a conditioning paradigm, without the use of an aversive related stimulus. This work directly supports previous findings that antigen can be used as the UCS (Husband et al., 1993; Ader et al., 1993) and further extends them by analyzing in more detail the antibody response elicited thereof. Our findings show that after reexposure to the CS, conditioned rats synthesize anti-HEL antibody of both IgM and IgG classes in a pattern similar to that of rats receiving a second injection with the same dose of HEL.

Ader et al. (1993) have described a model of conditioned immunoenhancement in mice which can only be obtained by giving the CS together with a minimally immunogenic booster dose of antigen on the test day. It has been suggested by Husband et al. (1993) that even when only reexposed to the CS, rats might develop an antibody response partly because of the presence of residual antigen. Although we cannot discard this possibility, our data show that the mechanism of activation of antibody production by the CS can be independent of an additional dose of antigen.

The mechanism by which conditioning is obtained is as yet unknown. The immune system responds to an antigenic challenge by activating multiple events (i.e., secretion of interleukins, cell proliferation, etc.), all of which contribute in creating the effector phase of the response. Thus, we cannot define the exact nature of the UCS, especially in light of Ader's finding that pairing antigen and a novel taste in a non-contingent manner proved to have a significant effect (Ader et al., 1993). The slight effect in our CSo group could indicate that there may be an association with other stimuli during the acquisition. Furthermore, reexposure to saccharin is enough for the immune system to respond by synthesizing antibody specific for HEL. However, we cannot dismiss the possibility that a broader repertoire of the immune system, that happens to include anti-HEL activity, is being activated.

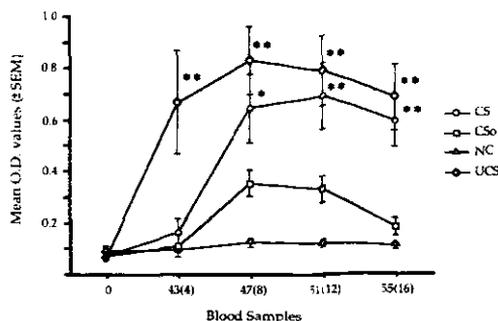


FIG. 2. Anti-HEL IgG production by groups CS, CSo, UCS, and NC. The ordinate axis shows the mean optical densities and the abscissa axis shows the experimental days (days after the test trial). ** $p < .01$; * $p < .05$ compared with the NC group.

In conclusion, we have found that a single trial conditioning training, pairing the novel taste of saccharin with an immunogenic protein antigen such as HEL, is capable of eliciting an antibody response that closely resembles a normal secondary response in both magnitude and temporal course.

REFERENCES

- Ader, R., & Cohen, N. (1993). Psychoneuroimmunology: Conditioning and stress. *Annual Review of Psychology*, 44, 53-85.
- Ader, R., Felten, D., & Cohen, N. (1990). Interactions between the brain and the immune system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 30, 561-602.
- Ader, R., Kelly, K., Moynihan, J. A., Grotta, L. J., & Cohen, N. (1993). Conditioned enhancement of antibody production using antigen as the unconditioned stimulus. *Brain, Behavior, and Immunity*, 7, 334-343.
- Akana, S. F., Scribner, K. A., Bradbury, M. J., Strack, A. M., Walker, C. D., & Dallman, M. F. (1992). Feedback sensitivity of the rat hypothalamus-pituitary-adrenal axis and its capacity to adjust to exogenous corticosterone. *Endocrinology*, 131, 585-594.
- 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 A. J. Husband (Ed.), *Psychoimmunology: CNS-Immune Interactions* (pp. 139-147). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Husband, A. J. (1993). Role of central nervous system and behavior in the immune response. *Vaccine*, 11, 805-816.
- MacQueen, G. M., Marshall, J., Perdue, M., Siegel, S., & Bienstock, J. (1989). Pavlovian conditioning of rat mucosal mast cells to secrete mast cell protease II. *Science*, 243, 83-85.
- Metalnikov, S., & Chorine, V. (1926). rôle des réflexes conditionnels dans l'immunité. *Annales de L'Institute Pasteur*, 40, 893-900.
- Rothwell, N. J., & Hopkins, S. J. (1995). Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends in Neurosciences*, 18, 130-136.

Comentario al Trabajo 1

En el presente trabajo se demostró la posibilidad de obtener un condicionamiento inmune con un solo ensayo y sin el uso de una dosis no inmunogénica de antígeno el día de la prueba. Evidentemente muchas preguntas quedan sin resolver, por ejemplo, no sabemos si aún después de 25 días, que es cuando se reexpone a los animales a la sacarina, existe todavía antígeno circulante en el organismo, pero es poco probable. Por ello se podría sugerir que el efecto condicionado puede prescindir de la presencia de antígeno, lo que desde el punto de vista inmunológico es muy difícil de resolver ya que se sabe que las células del sistema inmune responsables de la producción de IgG's (las células B de memoria) responden ante señales que actúan de manera sinérgica y entre las cuales, la señal que representa el antígeno parece imprescindible. Es posible que células del sistema inmune como las células dendríticas mantuvieran prolongadamente al antígeno atrapado y que cuando se reexpone al estímulo condicionado estas lo presentasen. Si esto estuviera ocurriendo, el problema desde el punto de vista inmunológico quedaría resuelto pues el dogma central no se pondría en debate y lo único que implicaría es que el sistema nervioso puede estimular a las células que mantienen cautivo al antígeno para que estas lo presenten.

Sin embargo también existe la posibilidad de que el antígeno ya no este presente en lo absoluto, lo cual, si representa un problema desde el punto de vista inmunológico. Si bien es cierto que existe una gran variedad de moléculas que tienen una potente actividad mitogénica en las células linfáticas, no se ha demostrado claramente que productos del sistema nervioso como las catecolaminas u otros neurotransmisores puedan tener dicha propiedad. Pero aún cuando se demostrara esta propiedad en moléculas liberadas por células nerviosas, se tendría que explicar como estas moléculas son capaces de remplazar la presencia de antígeno. Además, se tiene que aclarar si el efecto condicionado es específico o no. En el caso de que no fuese específico y no hubiese antígeno presente en el organismo, el problema se resuelve si se demuestra que el sistema nervioso es capaz de estimular a las células B de memoria. Sin embargo, de ser específico y no haber antígeno presente en el organismo, el problema se complicaría mucho.

Como las anteriores, muchas preguntas pueden ser resueltas con el uso del condicionamiento inmunoactivador como modelo de comunicación entre el sistema nervioso y el sistema inmune. En adelante presentaremos algunos trabajos que permitirán ver la utilidad de este condicionamiento en el estudio de las interacciones neuroinmunes.

Estructuras neurales involucradas en el condicionamiento inmune

La Corteza Insular y el CAS

En las neurociencias la estrategia de destruir una región particular de tejido nervioso y estudiar sus efectos sobre diversos parámetros funcionales, es una herramienta útil que permite distinguir la participación de estructuras neurales en diversos procesos fisiológicos, reduciendo el universo de posibilidades que representan la inmensa diversidad de estructuras neurales. Si bien esta es una estrategia útil, se requieren de pistas que dirijan la búsqueda.

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

En el caso del CAS se ha reportado desde 1972 que una región cortical conocida en ese entonces como corteza gustativa participaba de manera importante en la adquisición de este aprendizaje (Braun, Slick & Lorden, 1972). La corteza insular (CI) como se conoce actualmente a lo que se llegó a llamar corteza gustativa es una región que en la rata ocupa aproximadamente 1 x 3 mm de área, se encuentra localizada en la confluencia de la arteria cerebral media y el surco rinal, lo que representa las áreas 13 y 14 de Krieg. Se consideró a esta corteza como la corteza gustativa primaria, basándose en sus relaciones anatómicas con los núcleos ventrobasales del tálamo (Frommer, 1961), lo cual bajo el criterio anatómico la implicaba como una corteza sensorial. Más adelante se encontró que la estimulación de la lengua con sabores producía cambios en la actividad eléctrica de las células de la corteza insular (Yamamoto & Kawamura, 1972), lo cual coincidía con los datos anatómicos.

Braun y Kiefer (1982), interesados en determinar si la CI realmente estaba involucrada en la percepción de los sabores, realizaron lesiones de la CI y midieron el consumo de diferentes concentraciones de quinina, salina y sacarosa, con el propósito de observar si se presentaban cambios en la capacidad discriminativa de los animales lesionados. Encontraron que las ratas con ablaciones de esta corteza consumían diferentes cantidades de las diversas concentraciones de las soluciones antes mencionadas, al igual que los animales intactos, observando sólo un pequeño incremento en el consumo global del fluido en la

parte media del gradiente de concentración, lo cual indicaba que la CI no afectaba la discriminación de los sabores y sugería que las ratas con lesión en la CI eran más sensibles a los pequeños cambios en la concentración del sabor. En otras investigaciones, se ha demostrado que los animales con lesión en la CI no cambian su preferencia a los sabores dulces, ni su natural aversión a sabores como la quinina (Braun, Lasiter & Kiefer, 1982; Kiefer, 1985). Estos datos permitieron plantear la idea de que la CI no es importante para la percepción y discriminación de los sabores, aunque era claro que esta región es indispensable para poder establecer un CAS en el animal.

Yamamoto, Matsuo y Kawamura (1980) observaron que las lesiones de la CI causaban severos déficits en el aprendizaje y la retención del CAS, mientras que las lesiones en otras regiones corticales que recibían información gustativa no afectaban la retención de dicho aprendizaje. Yamamoto propone que la CI está involucrada en los procesos cognoscitivos relacionados a estímulos gustativos más que en los procesos perceptuales de dichos estímulos. Braun, Lasiter y Kiefer (1982) mencionan que el pequeño efecto que la lesión en corteza insular tiene sobre la curva de discriminación, representa una pequeña alteración en la discriminación fina de los sabores, debido probablemente a que se ven afectados los aspectos cognoscitivos de la integración de estímulos gustativos.

La CI se conoce también por su importancia en la integración de estímulos viscerales. Esta región cortical recibe aferencias del NTS (Van-der-Kooy, McGinty, Koda, Gerfen & Bloom, 1982). En el NTS converge gran cantidad de información visceral, por ello se ha estudiado la representación de los estímulos viscerales en la CI, encontrándose que esta corteza es capaz de responder a estímulos viscerales (Kiefer, 1985; Lasiter, Glazman & Mensah, 1982; Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991), por ello, algunos autores se han referido a la CI como corteza visceral.

Rosenblum, Meiri y Dudai (1993) observaron que tanto los estímulos gustativos, como los estímulos viscerales producen pequeños incrementos en la síntesis de proteínas en células de la CI, mientras que el estímulo gustativo una vez apareado con la irritación gástrica produce por sí solo, un aumento significativamente mayor de la síntesis proteica. El hecho de que la CI reciba aferencias viscerales y gustativas, sugiere su participación en la integración de este tipo de estímulos, dando lugar a la asociación que ocurre en el CAS y por lo cual su papel en el aprendizaje parece evidente. Ahora sabemos que la corteza insular está involucrada no solo en la adquisición y evocación del CAS (Ormsby, Ramírez-Amaya & Bermúdez-Rattoni, 1998), sino también en la capacidad de adquirir aprendizajes como la

prevención pasiva y el laberinto de agua de Morris (Bermúdez-Rattoni, Introini-Collison & McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991; Dunn & Everit, 1988).

La corteza insular, la amígdala y el condicionamiento inmunosupresor.

La participación de la CI en los procesos asociativos de los que depende el CAS puede explicarse por sus relaciones anatómicas y funcionales con estructuras que intervienen en el procesamiento de estímulos viscerales y gustativos. Las estructuras por donde arriba información visceral hacia la corteza insular como el NTS o la amígdala, y estructuras asociadas con la información gustativa como el NPP, hemos mencionado que están involucradas en las relaciones neuroinmunes. La participación de estas estructuras en la comunicación neuroinmune puede incluir tanto una función aferente, recibiendo información del sistema inmune por medio de receptores a interleucinas localizados en el sistema nervioso autónomo y en el sistema límbico (Saito et al., 1991; Cunningham & Souza 1993), como una función eferente mediante la modulación que ejerce el sistema simpático en órganos linfáticos (Felten & Felten, 1991) o bien mediante la activación del eje hipotálamo hipofisario.

Lo anterior junto con el hecho de que el condicionamiento inmune se obtiene mediante un procedimiento semejante al que se usa en el CAS, dirige nuestro interés por evaluar la participación de la corteza insular en el condicionamiento de la respuesta inmune.

En los primeros trabajos realizados dentro de esta línea de investigación, no contábamos con el modelo de condicionamiento inmunoactivador, por lo cual primero replicamos el modelo de Ader y Cohen, descrito en 1975, en el que se aparean sacarina y ciclofosfamida y se desarrolla un condicionamiento inmunosupresor. Este modelo está bien caracterizado y existe suficiente literatura con la cual comparar nuestros resultados.

El primer trabajo consistió en efectuar lesiones exitotóxicas de la corteza insular y posteriormente entrenar a los animales en el condicionamiento inmunosupresor, realizado mediante el apareamiento del sabor de sacarina y una inyección intraperitoneal de ciclofosfamida. Los resultados obtenidos mostraron que los animales con lesiones bilaterales de la corteza insular no eran capaces de expresar la respuesta de inmunosupresión condicionada en comparación a los controles condicionados y a los condicionados con lesión fantasma quienes presentaron un claro efecto inmunosupresor en respuesta a la sacarina, evidente por un bajo nivel de títulos de anticuerpos (Ramírez-

Amaya et al., 1996). En dicho trabajo se evaluó en detalle la posibilidad de que las lesiones de la corteza insular pudieran afectar la respuesta inmune normal o la inmunosupresión causada por la ciclofosfamida, encontrándose que los efectos de la lesión en corteza insular alteraban exclusivamente la adquisición del condicionamiento inmunosupresor. Este primer resultado nos permitió entender que el condicionamiento inmunosupresor es dependiente de la integridad funcional de una región particular en el sistema nervioso como lo es la corteza insular.

El siguiente paso fue evaluar la participación de otras estructuras neurales y estudiar el papel de estas tanto en la adquisición como en la evocación del CIS. Elegimos la amígdala por su cercana relación a la CI y por su importancia para las relaciones neuroinmunes, ya que se sabe expresa receptores para interleucinas (Hopkins & Rothwell, 1995), recibe información de estructuras como el NTS y se sabe responde ante cambios en el estatus inmunológico (Masek, Petrovicky & Seifert, 1992).

El segundo trabajó consistió en lesionar la corteza insular y la amígdala de ratas antes y después del apareamiento de sacarina y ciclofosfamida. Los resultados mostraron que las lesiones de la corteza insular y la amígdala afectaban el condicionamiento inmunosupresor cuando las lesiones eran efectuadas 8 días antes del apareamiento de los estímulos, sin embargo con las lesiones efectuadas 8 días después del apareamiento, solo las lesiones de la corteza insular afectaron la expresión del condicionamiento (Ramírez-Amaya, Alvarez-Borda & Bermúdez-Rattoni, 1998). Esta evidencia permitió establecer que tanto la amígdala como la corteza insular son importantes estructuras que participan las interacciones neuroinmunes responsables del condicionamiento y dados los datos, al menos en la entrada de información inmune al sistema nervioso estas estructuras parecen relevantes. Por otro lado, la corteza insular parece ser indispensable también para los mecanismos de expresión del efecto inmune condicionado, lo que implica el hecho de que esta estructura puede ejercer una importante función moduladora sobre el sistema inmune, muy probablemente a través de sus relaciones con núcleos autonómicos como el NTS y el NPP, regulando al sistema inmune vía el sistema nervioso autónomo.

Trabajo 2

Los resultados obtenidos con el CIS permitieron no sólo hacer evidente la participación de estructuras neurales en la comunicación neuroinmune, sino también permitieron hacer evidente la utilidad de la estrategia de lesión para estudiar las relaciones entre el sistema nervioso y el sistema inmune.

Sin embargo, el condicionamiento inmunosupresor al ser obtenido mediante el uso de una droga inmunosupresora cuyos efectos inmunológicos tienden a ser bastante inespecíficos, lo hace poco útil como modelo para el estudio de las comunicaciones neuroinmunes, pues por ejemplo, el entender la manera en cómo el sistema nervioso recibe información inmunitaria resulta extremadamente compleja si se estudian los factores que son liberados a consecuencia de la administración de ciclofosfamida, pues ésta causa alteraciones generalizadas a nivel inmunitario. Es así, que al haber encontrado la posibilidad de obtener un condicionamiento más natural basado en el apareamiento de un estímulo gustativo y un antígeno, teníamos en nuestras manos un paradigma más adecuado para continuar nuestra línea de investigación.

Así entonces, tomamos como modelo de comunicación neuroinmune al condicionamiento inmunoactivador descrito en el primer trabajo, y nos abocamos a la tarea de estudiar el papel de las mismas estructuras neurales que habíamos visto involucradas en el condicionamiento inmunosupresor pero ahora en el condicionamiento inmunoactivador. De esta manera se dio origen al siguiente trabajo.

Conditioned Enhancement of Antibody Production Is Disrupted by Insular Cortex and Amygdala but Not Hippocampal Lesions

Victor Ramírez-Amaya and Federico Bermúdez-Rattoni

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-253, 04510 México DF, México

Pavlovian conditioning procedures can be used to activate the immune system. A reliable conditioned increase of antibody production can be obtained in rats that have previously received a gustative or odor stimulus as the conditioned stimulus paired with an antigen, by exposing the animals to the conditioned stimulus alone. We showed evidence that an excitotoxic lesion bilaterally applied into the insular cortex or the amygdala, but not into the dorsal hippocampus, impaired the acquisition of both odor and gustatory conditioned immune enhancement. We found no effects of lesions on normal antibody production. These results suggest that the amygdala and the insular cortex are involved in the neural-immune interactions that mediate conditioned immunity. © 1999 Academic Press

Key Words: behavior and immunity; neuroimmunomodulation; psychoneuroimmunology; gustatory cortex; Pavlovian conditioning of immune responses.

INTRODUCTION

Several lines of evidence have shown that the immune response can be modulated by the central nervous system. Brain structures like the hypothalamus, the limbic system, and the neocortex have been implicated in the regulation of neural-immune interactions (Ader, Cohen, & Felten, 1995; Neveu, 1992). Furthermore, the brain is able to respond to changes in the immune status, using this information as a feedback mechanism necessary for the neural modulation of immunity (Luheshi, Hammond, & Dam, 1996; Masek, Petrovicky, & Seifert, 1992; Rothwell & Hopkins, 1995).

In this regard, the conditioned immunosuppression paradigm developed by Ader and Cohen (1975) is the most prominent example of the neural modulation of immunity (Ader & Cohen, 1991). Conditioned immunosuppression procedure consists in the pairing of a novel taste as the conditioned stimulus and cyclophosphamide (CY) as the unconditioned one, allowing the association of the taste with the immunosuppressive effect of CY. Later on, when the animals are reexposed to the taste, they show a conditioned attenuation of the immune response, and collaterally, the animals show a conditioned taste aversion, due to the malaise inducing effect of cyclophosphamide.

Conditioning can also be used to induce enhancement of the immune responses. Thus, Ader and colleagues (1993) have found that antibody production against a protein antigen can be elicited by a conditioned stimulus coupled to a nonimmunogenic dose of antigen, after pairing it several times with an antigen. Recently we have demonstrated that conditioned enhancement of antibody production can be elicited by pairing the exposure of saccharin dissolved in their drinking water with the injection of hen egg lysozyme (HEL) as the antigen (Alvarez-Borda, Ramírez-Amaya, Pérez-Montfort, & Bermúdez-Rattoni, 1995). When the animals were reexposed to the conditioned stimulus alone, IgG antibody production against HEL was significantly increased, resembling a secondary immune response. Both IgM and IgG antibody levels



were increased as a result of reexposure to the conditioned stimulus, IgG enhancement being the most robust. Since this immunological effect is a result of a learning experience we are interested in the neural substrates of this conditioning.

The insular cortex is a neural structure that has been related to learning and memory (Bermúdez-Rattoni, Ormsby, Escobar, & Hernández-Echeagaray, 1995; Kiefer, 1985) and particularly with conditioned taste aversion (for review see Bermúdez-Rattoni & Yamamoto, 1998). Moreover, it has been reported that the insular cortex and the amygdala have connections with autonomic regions like the nucleus of the solitary tract (Bermúdez-Rattoni & Yamamoto, 1998). This is of relevance since the autonomic nervous system could be the primary source of modulation from the brain to the immune system (Felten, Cohen, Ader, Felten, Carlson, & Roszman, 1991; Reder, Karaszewsk, & Arnason, 1989), and it could also be regulating the feedback of immune information to the brain (Luheshi et al., 1996; Rothwell & Hopkins, 1995). It has also been suggested that the hippocampus could be involved in neural immune interactions; e.g., it has been demonstrated that the hippocampus expresses interleukin 1 (IL-1) receptors (Gabellec, Griffais, Fillion, & Haour, 1995; Taishi, Bredow, GuhaThakurta, Obal, & Krueger, 1997), and this structure has been shown to be involved in learning and memory processes (McClelland, McNaughton, & O'Reilly, 1995; Shen, Specht, De-Saint-Ghislain, & Li, 1994).

Although the conditioned immune response paradigm reveals a robust interaction between the brain and the immune system, it is not yet clear how this interaction is established. Previously, we have found that the insular cortex and amygdala participate in the acquisition of conditioned immunosuppression, since lesions of these structures significantly impair the acquisition of immunosuppressive conditioning (Ramírez-Amaya, Alvarez-Borda, Ormsby, Martínez, Pérez-Montfort, & Bermúdez-Rattoni, 1996; Ramírez-Amaya, Alvarez-Borda, & Bermúdez-Rattoni, 1998), leaving the normal immune response unaffected. Although our previous works suggests that the insular cortex and amygdala are involved in the modulation of conditioned immunosuppression, it is not known if these structures also play a role in conditioned enhancement of antibody production. Conditioned immune enhancement can be a more adequate model for studying the neural correlates of conditioned immunity, since this procedure by itself does not produce a nonspecific alteration of the immune system, as it is caused by the use of cyclophosphamide used in conditioned immunosuppression. Additionally, considering our previous data, we cannot rule out the possibility that neural lesions induced a nonspecific sensory effect, which would explain the disruption of conditioning. It is possible to assess this issue using different modalities of stimuli, such as gustatory and olfactory, to produce conditioning and evaluate the effects of lesions in each kind of association.

The aim of the present work is to evaluate the effects of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced lesions into the insular cortex, the amygdala, or the dorsal hippocampus on the acquisition of conditioned enhancement of antibody production, achieved by pairing saccharin taste or almond odor as the conditioned stimulus with the injection of hen egg lysozyme as the unconditioned stimulus.

METHODS

Subjects

Male Wistar rats were obtained from the vivarium of our institute with a range of weight between 250 and 300 g at the beginning of the experiment. The animals were

individually caged and maintained under an inverted 12:12-h light dark cycle (lights on at 9:00 PM), with food *ad libitum*; the behavioral procedures were carried out during the dark cycle using an outside light. Water was also freely available, except during the measurement of baseline water consumption and saccharin presentation. Animals were bled at the beginning of the experiment and 1–1.5 ml of blood was collected through a small incision in the tip of the tail using a surgical scalpel. Sample sera were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for anti HEL IgG antibodies to measure a baseline titer of antibodies against this antigen.

Surgical Procedure

Three days after blood sampling, the animals were separated into six surgically treated groups. The animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg) and manipulated with a stereotaxic apparatus. The first three groups received bilateral microinjections of 0.6 μ l of NMDA solution (NMDA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; 10 mg/ml solution in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4) into the insular cortex (ICLx: Ap +1.2, DV -5.5, L \pm 5.5), the amygdala (AmLx: Ap -2.5, DV -8.2, L \pm 5.0), or the dorsal hippocampus (HpLx: Ap -2.8, DV -2.0, L \pm 3.5). To induce excitotoxic lesions, NMDA was back filled into a 30-gauge needle connected to a polyethylene tube and this to a 10- μ l Hamilton microsyringe. Each lesioned group had a corresponding sham-operated control that received PBS (0.1 M, pH 7.4) instead of NMDA denominated ICSh, AmSh, and HpSh, respectively.

Conditioning Procedure

Eight days after the surgical procedure, all animals were deprived of water for 12 h. After the deprivation period, distilled water was given to the rats in graded test tubes in two drinking periods of 10 min each, one in the morning (10:00 AM) and the other in the afternoon (6:00 PM). This procedure was used for all rats during the 4 days prior to the exposure of the conditioned stimulus (CS). On the fifth day, the conditioning day, all rats, except the animals of the nonconditioned (NC) and the unconditioned (UCS) groups, were exposed to the CS (0.1% of saccharin solution) for 10 min followed by an intraperitoneal (ip) injection of 0.5 mg of HEL (Sigma Chemical Co.) in 300 μ l of normal Abbot's saline. When odor was used as a CS, the animals were exposed in a separate room to almond odor simultaneously with the drinking water. Almond essence solution (0.5 ml McCormick) was absorbed in a filter paper inside a tissue culture dish. The dish was attached to the tip of the water probe. The animals were exposed for 10 min to the odor while they drank plain water. The NC and UCS groups were immunized simultaneously with all groups and in the same conditions, but were exposed to water alone instead of the conditioned stimulus. Groups were kept in different rooms during the conditioning procedure. The NC group was exposed to the CS (saccharin or almond odor) the day following immunization.

At 25 days after immunization with HEL, when primary anti HEL production was no longer detectable (Alvarez-Borda et al., 1995), rats were again deprived of water and a new baseline water consumption was taken. After 4 days of baseline water consumption, all rats were reexposed to the CS in the corresponding morning period, except the CSo group, which was reexposed to plain water. It is important to mention that the CSo group was kept in a different room from the other animals, to avoid the sense of saccharin or almond odor.

Immunological Procedures

Blood samples were collected through an incision in the tail 4, 8, and 12 days after reexposure to saccharin. The sample sera were taken and stored at -70°C until determination of anti-HEL antibody by ELISA.

Ninety-six-well ELISA plates were coated with 100 μl of 10 mg/ml HEL in carbonate buffer (pH 9.6) overnight at 4°C and washed with phosphate buffer (PBS). Plates were blocked with 1% bovine serum albumin in PBS for 1 h at 37°C . After washing, 1:50 dilutions of sera in blocking buffer were added to wells (100 μl /well) and incubated for 2 h at 37°C following three washing steps. Peroxidase-conjugated rabbit anti-rat IgG immunoglobulins (Pierce Chemical Co.) diluted 1:15,000 were added to each well and incubated 2 h at 37°C . A final series of washing steps was followed by the addition of a solution of 3% H_2O_2 as substrate in 0.1 M citrate buffer (pH 4.2) with 2,2'-azino-di-3-ethylbenzothiazolone sulfonic acid as a chromogenic agent. Twenty minutes later, absorbance at 405 nm was measured, using 490 nm as the reference wavelength. The IgM production was not measured since we have previously found that the best indicator of increased antibody production is IgG and not IgM (See Alvarez-Borda et al., 1995). Statistical analysis was carried out by repeated measures ANOVA through sample days, to assess group differences, and the Sheffe posthoc test was used where appropriate.

EXPERIMENT I

This experiment was designed to evaluate the effect of NMDA-induced lesions into the insular cortex, the amygdala, and the dorsal hippocampus on the acquisition of conditioned immunoenhancement obtained by the pairing of saccharin and HEL.

Eighty-one male Wistar rats were used and assigned to 1 of 10 different groups. The first 4 groups were used to assess the effect of conditioning using saccharin as the conditioned stimulus. A conditioned group (CS, $n = 7$) received the pairing of saccharin and HEL and was reexposed to saccharin. The CS₀ group ($n = 7$) received the pairing of saccharin and HEL but was not reexposed to saccharin; plain water was presented instead. In the NC group ($n = 6$) a noncontingent presentation of stimuli was done, and on the day of reexposure saccharin was presented again. Finally, the UCS group ($n = 6$) was immunized the day of conditioning and reimmunized the day of reexposure, so we would have a parameter of normal secondary antibody production.

The rest of the animals were assigned to 1 of 6 different groups. The first 3 groups received NMDA lesions into the insular cortex (ICLx, $n = 10$), the amygdala (AmLx, $n = 11$), or the dorsal hippocampus (HpLx, $n = 10$). The other 3 groups were treated as sham-operated controls (ICSh, $n = 8$; AmSh, $n = 8$; HpSh, $n = 8$), receiving phosphate buffer (0.1 M pH 7.4) instead of NMDA during the surgical procedure. Eight days after the surgical procedure all animals were subjected to the conditioning procedure (simultaneously with the animals of the nonoperated groups) where saccharin and HEL were paired.

At the end of the experiment, all lesioned animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital and perfused transcardially with approximately 100 ml of 0.15 M sodium saline and 100 ml of 4% paraformaldehyde solution. After perfusion, the brains were immersed in 30% sucrose solution until they sank. Using a cryostat microtome, 40- μm -thick brains slices were obtained. A Nissl histological technique was used to evaluate the exact location of lesions.

Results

The histological analysis showed that IC lesions were located in the medial part of the anteroposterior axis of the IC. The lesions were observed mainly above the rhinal sulcus and some included the claustrum. The amygdala lesions were located in the basolateral nucleus of the amygdala and some animals showed damage in the central nucleus. Lesions into the hippocampus destroyed mainly the CA1 region, with some of the animals showing a mild destruction of CA3; none of these animals showed lesions in the dentate gyrus. Animals with inadequate lesions or unilateral lesions were discarded from the analysis (see Fig. 1).

The saccharin consumption before and after the conditioning procedure did not change significantly, indicating that no aversive effect to taste can be established. Antibody levels measured by ELISA increased as a result of conditioning and surgically treated animals behave differently according to the lesioned area. Repeated measures ANOVA (including all groups) showed a significant effect between groups ($F(9, 71) = 41.649, P < .01$), differences between days ($F(3, 27) = 203.154, P < .01$), and a groups \times days interaction ($F(3, 213) = 10.02, P < .01$). Figure 2a shows the change in anti-HEL antibody levels of conditioned animals after reexposure to saccharin alone. A remarkable effect of conditioning in the IgG anti-HEL antibody levels is evident. Repeated measures ANOVA (for the four conditioned groups) revealed a significant effect of treatment in the IgG levels after reexposure to the conditioned stimulus ($F(3, 22) = 54.89, P < .01$); differences through samples ($F(3, 9) = 62.60, P < .01$) and a group \times days interaction were found ($F(3, 66) = 10.86, P < .01$). Posthoc analysis showed that the CS group presented significantly higher IgG antibody production compared with the NC (noncontingent conditioning) and CS0 (conditioned but not reexposed) groups in all samples (P 's $< .01$). There were no significant differences between the antibody production of the CS and UCS groups, indicating that the conditioned response was similar to the secondary immune response both in timing and in levels reached.

Figures 2b–2d present the results of IgG antibody levels of surgically manipulated conditioned animals. The analysis and figures are separated according to the lesioned area in order to simplify the presentation of the data. The CS group was used as the control group to compare the effect of lesions.

Figure 2b shows the effect of IC lesions on the acquisition of conditioned immunoactivation. Repeated measures ANOVA revealed a significant effect between groups ($F(2, 22) = 42.68, P < .01$), and days ($F(3, 6) = 13.83, P < .01$), with groups \times days interaction ($F(3, 66) = 13.83, P < .01$). It is evident that IC lesions disrupted the acquisition of this conditioning since lesioned animals presented significantly lower antibody production in all samples, compared with the CS group (P 's $< .01$) and with the sham control (ICSh, P 's $< .01$).

The effects of amygdala lesions on the acquisition of conditioned immunoactivation are shown in Fig. 2c. Repeated measures ANOVA showed group ($F(2, 23) = 69.13, P < .01$) and days differences ($F(3, 6) = 73.61, P < .01$) with a group \times days interaction ($F(6, 69) = 16.83, P < .01$). Posthoc analysis showed differences in the antibody production of all samples of AmLx animals compared with CS and AmSh groups (P 's $< .01$).

Hippocampal lesions did not show any significant effect on the acquisition of conditioned antibody production (Fig. 2d). Repeated measures ANOVA did not show

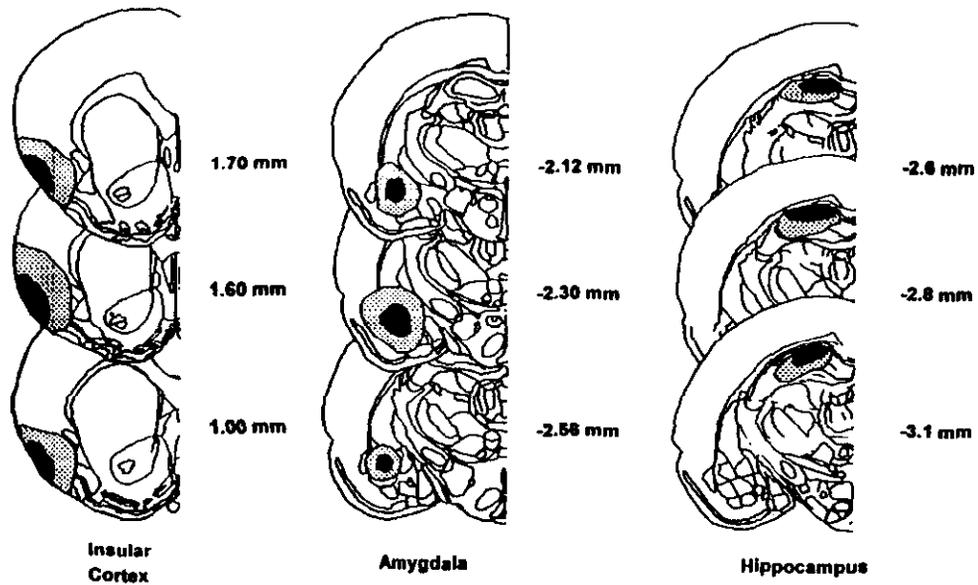


FIG. 1. Schematic representation of lesions into the insular cortex (left), amygdala (middle), and dorsal hippocampus (right). The darkened areas represent the smallest lesion, and the gray areas represent the largest lesion obtained. Atlas plates are adapted from the rat stereotaxic coordinates of Paxinos and Watson (1986).

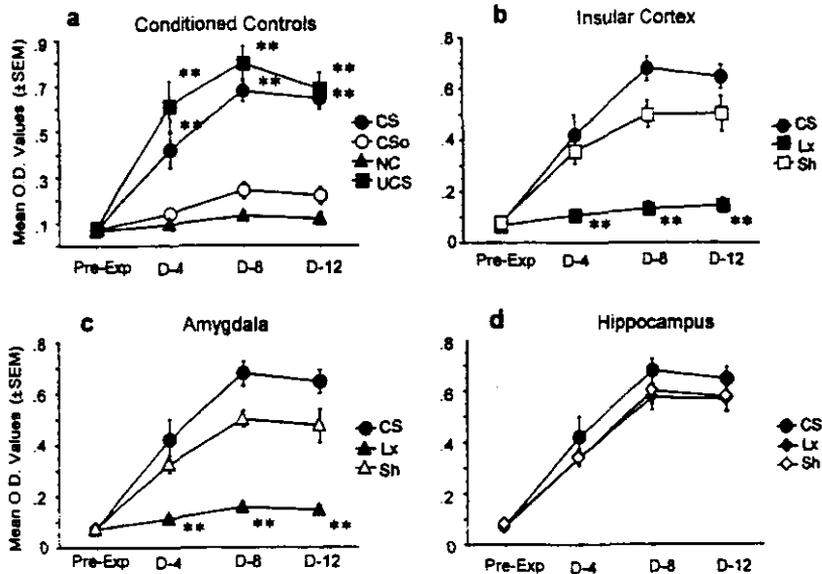


FIG. 2. Mean optic density values (\pm standard error of the mean) from ELISA of IgG antibody levels, obtained in the preexperimental sample (Pre-Exp) and in the samples taken several days (D-4, D-8, and D-12) after reexposure to saccharin, which was used as the conditioned stimulus. a shows the results of conditioning in the nonoperated controls. CS, conditioned animals reexposed to the conditioned stimulus; CSo, conditioned animals not reexposed to the conditioned stimulus; NC, animals that received a noncontingent pairing of the stimuli and were reexposed to the conditioned stimulus. UCS, animals immunized in the conditioning day, not exposed to the conditioned stimulus, and reimmunized the day of reexposure to the conditioned stimulus. b-d present the antibody levels of insular cortex (ICLx), amygdala (AMLx), and hippocampal (HPLx) lesioned animals, respectively, including the respective sham controls (ICSh), (AMSh), (HPSh). It is to be noted that the CS group is the same as that of a and is presented in the rest of the figures for comparison. ** $P < .01$.

differences between groups ($F(2, 22) = 1.46$) but did show differences between days ($F(3, 6) = 129.75$, $P < .01$), indicating that antibody production was enhanced in all groups as an effect of conditioning.

EXPERIMENT II

Effects of IC lesions over the conditioned immune response have been observed when the conditioning is made with a gustatory stimulus. This observation alone, however, is not enough to conclude that IC participates in this form of learning, i.e., by association stimuli, because there is the possibility that the IC lesion disrupts the sensory ability of animals to recognize the conditioned stimulus, i.e., taste. Although it has been demonstrated that IC lesions do not affect taste discrimination (Braun, Lasiter, & Kiefer, 1982), it is important to assess if the effects of lesions are due to a sensory disruption or an alteration of the association mechanisms underlying the conditioning of immune responses. Therefore, in the second experiment we used an odor stimulus instead of a gustatory one, to evaluate the effects of lesions on conditioned immune activation with the pairing of almond odor and HEL as the antigen.

Eighty-five male Wistar rats (250–300 g) were assigned to 1 of 10 different groups. The first 4 groups were used to evaluate the effect of conditioning. CS ($n = 9$), CSo ($n = 8$), NC ($n = 7$), and UCS ($n = 8$) groups were used as the groups described in experiment I. On the conditioning day the animals were exposed to almond odor (instead of saccharin) for 10 min while they drank plain water, and immediately afterwards immunized with 0.5 mg of HEL. Twenty-five days after conditioning the animals were reexposed to the odor stimulus. The other 6 groups were surgically manipulated as described in experiment I, and the group distribution remained the same. ICLx ($n = 11$), ICSH ($n = 9$), AMLx ($n = 8$), AMSH ($n = 10$), HPLx ($n = 8$), and HPSH ($n = 7$).

After the end of the experimental procedure, the animals were sacrificed and their brains processed for Nissl as described above; the results of the histological analysis are presented in the analysis described in experiment I.

Results

Water consumption associated with the odor stimulus in conditioned animals did not show any significant variation before and after the conditioning procedure. Repeated measures ANOVA of IgG antibody production for all groups revealed significant differences between groups ($F(9, 75) = 18.33$, $P < .01$), through days ($F(3, 27) = 186.82$, $P < .01$), with a group \times days interaction ($F(3, 225) = 8.56$, $P < .01$). Figure 3a shows the conditioned immunoactivation obtained by pairing almond odor as an olfactory stimulus with HEL as the antigen. The conditioned effect is as clear as that in the conditioning obtained with saccharin. Repeated measures ANOVA analysis showed a significant group effect ($F(3, 28) = 31.70$, $P < .01$) and differences through days ($F(3, 9) = 84.54$, $P < .01$), on IgG anti-HEL antibody production, with a group \times days interaction ($F(3, 84) = 16.86$, $P < .01$). Posthoc analysis revealed that CS animals presented significantly higher IgG antibody production compared with the NC and CSo controls (P 's $< .01$) during samples D-4, D-8, and D-12. The CS group did not present statistical differences with the UCS animals.

This evidence implies that it is possible to obtain conditioning immune activation using either a gustatory or an olfactory conditioned stimulus. It can also be observed that the kinetics and magnitude of increase are similar using either conditioning procedure.

Figure 3b shows the dynamics of odor conditioning of anti-HEL IgG production in the insular lesioned animals. Repeated measures ANOVA showed group differences ($F(2, 26) = 16.68$, $P < .01$) and differences between days ($F(3, 6) = 64.79$, $P < .01$), with a group \times days interaction ($F(6, 78) = 6.69$, $P < .01$). Posthoc analysis revealed that the IgG antibody production of ICLx animals was significantly lower when compared with the CS and ICSH groups (D-4, P 's $< .01$; D-8, $P < .01$ and $P < .05$ respectively; D-12, P 's $< .01$). These results indicate that insular lesion disrupts the conditioned immunoenhancement obtained with an odor as the conditioned stimulus.

Figure 3c shows the effects of amygdala lesions on the acquisition of conditioned enhancement of antibody production. The repeated measures ANOVA showed group differences ($F(2, 24) = 18.07$, $P < .01$), days differences ($F(3, 6) = 70.55$, $P < .01$), and a group \times days interaction ($F(3, 72) = 11.31$, $P < .01$) of IgG antibody production. Posthoc analysis revealed that the animals with amygdala lesions presented lower antibody production (see Fig. 3c), which was statistically different from

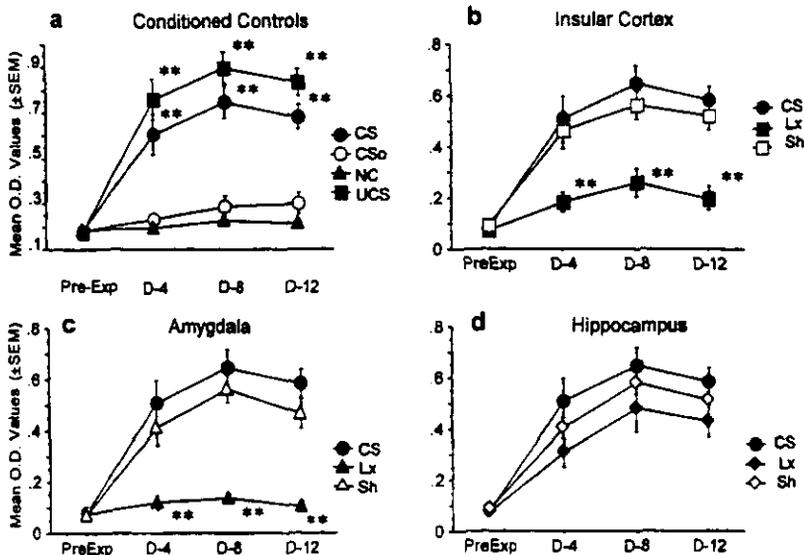


FIG. 3. Mean optic density values (\pm standard error of the mean) from ELISA of IgG antibody levels, obtained in the preexperimental sample (Pre-Exp) and in the samples taken several days (D-4, D-8, and D-12) after reexposure to almond odor, which was used as the conditioned stimulus. (a) The results of conditioning in the nonoperated controls. CS, conditioned animals reexposed to the conditioned stimulus; CS0, conditioned animals not reexposed to the conditioned stimulus; NC, animals that received a noncontingent pairing of the stimuli and were reexposed to the conditioned stimulus; UCS, animals immunized in the conditioning day, not exposed to the conditioned stimulus, and reimmunized the day of reexposure to the conditioned stimulus (UCS). b-d present the antibody levels of insular cortex (ICLx), amygdala (AMLx), and hippocampal (HPLx) lesioned animals, including the respective sham controls (ICSx), (AMSh), (HPSx). It is to be noted that the CS group is the same as that of a and is presented in the rest of the figures for comparison. ** $P < .01$.

that of the CS and AmSh groups (D-4, P 's $< .01$; D-8, $P < .01$ and $P < .05$ respectively; D-12, P 's $< .01$).

As we found in the first experiment, hippocampal lesions did not cause a significant effect on conditioning (see Fig. 3d). Repeated measures ANOVA did not show group difference, but did present differences between days ($F(3, 6) = 78.44, P < .01$), with no interaction between group and days, indicating that the same dynamics curve of IgG production was observed in all groups.

EXPERIMENT III

In order to assess the effects of lesions on the normal immune response, we tested the effects of lesions into the insular cortex, amygdala, and hippocampus on the induction of primary immune response to HEL. We measured the IgM and IgG antibody production against HEL in the primary antibody production with the purpose of evaluating if lesions affected the normal primary immune response.

TABLE I
Effect of Lesions on Primary IgM and IgG
Normal Anti-HEL Antibody Production

Group	Elisa O.D. values	
	IgM	IgG
Con	0.590 ± 0.031	0.533 ± 0.125
ICLx	0.530 ± 0.064	0.556 ± 0.100
ICSh	0.509 ± 0.051	0.494 ± 0.086
AmLx	0.490 ± 0.091	0.463 ± 0.170
AmSh	0.544 ± 0.075	0.515 ± 0.130
HpLx	0.539 ± 0.045	0.501 ± 0.106
HpSh	0.513 ± 0.059	0.449 ± 0.096

Note. IgG and IgM primary antibody responses to HEL of the following groups: CON, intact control; ICLx, insular cortex lesion; ICSh, insular cortex sham; AmLx, amygdala lesion; AmSh, amygdala sham; HpLx, hippocampal lesion; HpSh, hippocampal sham. Values are the mean optic density (\pm standard error of the mean) of IgM or IgG production at 8 days after immunization, obtained by ELISA.

Forty-four male Wistar rats, weighing 250–320 g, were used. Animals were caged individually at 25°C in an inverted 12-h light/dark cycle. All the experimental manipulations were carried out in the dark phase of the cycle. Animals were surgically manipulated as in the second and first experiments, using three lesioned groups (ICLx, $n = 5$; AmLx, $n = 6$; and HpLx, $n = 9$) with their respective sham-treated groups (ICSh, $n = 4$; AmSh, $n = 4$; and HpSh, $n = 4$) and one intact control (CON, $n = 5$).

Eight days after surgery, the animals were immunized with 0.5 mg of HEL diluted in 300 μ l of Abbot's saline. Blood samples were taken 8 days after immunization, and IgM antibody production was assessed through ELISA.

Results

Table I presents the antibody levels of insular cortex, amygdala, and hippocampal lesions on IgM and IgG antibody production against HEL. ANOVA analysis revealed no differences between groups in IgM or IgG anti-HEL antibody production. Therefore, no effect of insular cortex, amygdala, or hippocampal lesions on the normal antibody response could be found.

DISCUSSION

In the present experiments we demonstrate that a robust conditioned immunoenhancement can be obtained by the pairing of either odor or taste with an antigen. Our results confirm previous findings that a gustatory or olfactory stimulus can be used to develop conditioned enhancement of antibody production (Ader, Kelly, Moynihan, Grotta, & Cohen, 1993; Spector, Provinciali, Stefano, Muzzioli, Bulian, Viticchi, Rossano, & Fabris, 1994).

The present experiments show evidence that the insular cortex and amygdala are involved in the acquisition of conditioned immunoenhancement, since the conditioned enhancement of anti HEL IgG antibody production is not present in animals with lesions in either the amygdala or the insular cortex. Previously, it has been reported that insular cortex lesions disrupt taste-conditioned aversion but not odor-conditioned aversion (Fernández-Ruiz, Miranda, Bermúdez-Rattoni, & Drucker-Colín, 1993; Kiefer, Rusiniak, & Garcia, 1982). Conversely, a number of studies have demonstrated that amygdala lesions disrupt conditioning when using odor but not when using taste stimuli (Hatfield & Gallagher, 1995; Ferry, Sandner, & DiScala, 1995; for review see Bermúdez-Rattoni & Yamamoto, 1998). These results indicate that lesions into the insular cortex do not affect the ability to acquire odor aversion, while amygdala lesions leave intact the ability to acquire taste aversions. In our case both amygdala and insular cortex lesions disrupt conditioned enhancement of antibody production obtained by either gustatory or odor stimuli. These results suggest that their involvement in conditioned enhancement of antibody production is not attributable only to a sensory mediation.

Lesions of the insular cortex, the amygdala, or the dorsal hippocampus did not produce any significant effects on normal primary IgM or IgG antibody production. Although control lesions were evaluated in a primary immune response, the IgG levels which can be related to a B cell memory activation (Kindler & Zubler, 1997) remained intact after insular cortex or amygdala lesions, suggesting that the secondary immune response would not be affected by lesions of those structures. These results suggest that the amygdala and the insular cortex are involved in the neural mechanisms responsible for the acquisition of conditioned immunoactivation. Conversely, hippocampal lesions did not affect the conditioned immunoenhancement, despite the fact that the sizes of the hippocampal lesions were equivalent to those induced in the amygdala or the insular cortex.

Previously, we have found that lesions into the insular cortex (Ramírez-Amaya et al., 1996) and the amygdala (Ramírez-Amaya et al., 1998) disrupt the acquisition of conditioned immunosuppression. In addition, we found that the insular cortex but not the amygdala is involved in the evocation of this conditioning (Ramírez-Amaya et al., 1998). These data were interpreted as suggesting the involvement of the amygdala in the feedback mechanisms of immune information required for the brain to develop conditioned immunosuppression and the participation of the insular cortex as the key structure for the association mechanisms underlying this kind of learning.

The insular cortex, considered as a limbic structure (Saper, 1982), has important relations with other brain regions implicated in the neural-immune link. The insular cortex is related to the nucleus of the solitary tract (NTS), the parabrachial nucleus of the pons, and the amygdala (Bermúdez-Rattoni & Yamamoto, 1998). All of these regions have been implicated in neural-immune interactions. Of particular interest are the parabrachial nucleus of the pons and the NTS, which express receptors for a great variety of interleukins (Haas & Schauenstein, 1997) and can be important regions for the regulation of immune input information to the CNS. The insular cortex has bidirectional connections with the NTS and with the parabrachial nucleus, allowing this structure to receive direct inputs from the immune system. In this regard, it has been observed that the insular cortex and the amygdala change the pattern of c-fos expression after an immunological challenge (Elmqvist, Scammell, Jacobson, & Saper, 1996; Tkacs, Li, & Strack, 1997). The relation of the IC with the NTS may

allow it to exert an important modulatory influence over the immune system. The agranular IC receives olfactory afferences provided by the pyriform cortex, which in turn receives information from the olfactory bulb (Haberly & Price, 1978), contributing to the sensation of "flavors" (Lasiter & Glanzman, 1985). According to our data, both the odor-antigen and taste-antigen associations can be established in the insular cortex. This suggests that the participation of IC in conditioned immunity is not attributable merely to a sensory mediation. In summary, these data support the idea that the insular cortex is involved in mechanisms related to the association of stimuli implicated in conditioned immune responses.

A number of studies have implicated the amygdala in neural-immune interactions. For example, it has been demonstrated that the amygdala expresses IL-1 receptors (Cunningham & Souza, 1993), and the *in situ* administration of IL-1 β induces membrane hyperpolarization in amygdala neurons (Yu & Shinnick-Gallagher, 1994). The amygdala is closely related to the hypothalamus, and it has been proposed that this region is involved in neuroendocrine-immune interactions (Haas & Schauenstein, 1997). There are some studies reporting that lesions of the amygdala produce effects on immunological parameters (Petrovicky, Masek, & Seifert, 1994; Masek, Petrovicky, & Seifert, 1992). However, in our results, amygdala lesions did not produce any significant effects on the antibody production, which is in accordance with previous findings (Grijalva, Levin, Morgan, Roland, & Martin, 1990).

Its relation to the autonomic nervous system (McGaugh, Cahill, Parent, Mesches, Coleman-Mesches, & Salinas, 1995) can explain the involvement of the amygdala in conditioned immunoenhancement. It has been proposed that the autonomic nervous system is an important source of information from the immune system (Luheshi, Hammond, & Dam, 1996). It has also been demonstrated that the amygdala responds electrically and metabolically to immunological challenges (Galkina, Al'perina, Podgornaia, & Devoino, 1990) or to changes in the immune status (Masek et al., 1992). These data support the idea that the amygdala participates in the feedback mechanisms between the immune and the central nervous systems necessary for the establishment of conditioned immunoactivation.

Several data suggest that the dorsal hippocampus can be involved in neural-immune interactions (Gabellec et al., 1995; Taishi et al., 1997). The hippocampus expresses receptors for a variety of interleukins, including IL-1, IL-2, and TNF α (Hopkins & Rothwell, 1995). Electrolytic and excitotoxic lesions of the hippocampus have been observed to produce differential effects on humoral immune response depending on the site of lesion (Pan & Long, 1993). In our results, the size and location of hippocampal lesions are equivalent to those induced by Pan and Long that span mainly to the CA1 region of the hippocampus. We did not observe any effect on the humoral immune response consistent with the Pan and Long results, where hippocampal lesions including the CA1 region did not produce immunological effects.

In summary, we have found evidence suggesting that limbic structures like the amygdala and the insular cortex are related to the behavioral modulation of immunity, particularly the conditioning of immune responses. It is not clearly understood how these structures modulate the information required for conditioned immunity. Further studies should be performed in order to understand which brain regions respond to immunological challenge and how the immune system signals the brain to allow these structures to modulate the neural-immune interactions acting in conditioned immune responses.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Christopher Ormsby and Enrique Espinosa for reviewing the manuscript, Oreste Carbajal and Federico Jandete for their technical assistance, and Yolanda Díaz de Castro for preparing the manuscript. This work was supported by DGAPA (IN212996).

REFERENCES

- Ader, R., & Cohen, N. (1975). Behavioral conditioned immunosuppression. *Psychosom. Med.* **37**, 333-340.
- Ader, R., & Cohen, N. (1991). The influence of Conditioning on Immune Responses. In R. Ader, N. Cohen, & D. L. Felten (Eds.), *Psychoneuroimmunology*, 2nd ed., pp. 609-640. Academic Press: New York.
- Ader, R., Cohen, N., & Felten, D. (1995). Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet* **345**, 99-103.
- 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.
- Alvarez-Borda, B., Ramirez-Amaya, V., Pérez-Montfort, R., & Bermúdez-Rattoni, F. (1995). Enhancement of antibody production by a learning paradigm. *Neurobiol. Learning Memory* **64**, 103-105.
- Bermúdez-Rattoni, F., & Yamamoto, T. (1998). Neuroanatomy of CTA: Lesion studies. In J. Bures, F. Bermúdez-Rattoni, & T. Yamamoto (Eds.), *Conditioned taste aversion: Memory of a special kind*. Vol. 31, pp. 28-46. Oxford University Press: Oxford.
- Bermúdez-Rattoni, F., Ormsby, C. E., Escobar, M. L., & Hernández-Echeagaray, E. (1995). The role of the insular cortex in the acquisition and long lasting memory for aversively motivated. In J. L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni, & R. Prado (Eds.), *Plasticity in the central nervous system: Learning and memory*, pp. 67-82. Erlbaum: Mahwah, NJ.
- Braun, J. J., Lasiter, P. S., & Kiefer, S. W. (1982). The gustatory neocortex of the rat. *Physiol. Psychol.* **10**, 13-45.
- Cunningham, E. T. J., & Souza, E. B. D. (1993). Interleukin 1 receptors in the brain and endocrine tissues. *Immunol. Today* **14**, 171.
- Elmqvist, J. K., Scammell, T. E., Jacobson, C. D., & Saper, C. B. (1996). Distribution of Fos-Like Immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. *J. Comp. Neurol.* **371**, 85-103.
- Felten, D. L., Cohen, N., Ader, R., Felten, S. Y., Carlson, S. L., & Roszman, T. L. (1991). Central neural circuits involved in Neural-Immune Interactions. In R. Ader, N. Cohen, & D. L. Felten (Eds.), *Psychoneuroimmunology*, 2nd ed., pp. 3-25. Academic Press: New York.
- Fernández-Ruiz, J., Miranda, M. I., Bermúdez-Rattoni, F., & Drucker-Colín R. (1993). Effects of catecholaminergic depletion of the amygdala and insular cortex on the potentiation of odor by taste aversions. *Behav. Neural. Biol.* **60**, 189-191.
- Ferry, B., Sander, G., & DiScala, G. (1995). Neuroanatomical and functional specificity of the basolateral amygdaloid nucleus in taste potentiated odor aversion. *Neurobiol. Learning Memory* **64**, 169-180.
- Gabellec, M. M., Griffais, R., Fillion, G., & Haour, F. (1995). Expression of interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor antagonist mRNA in mouse brain: Regulation by bacterial lipopolysaccharide (LPS) treatment. *Brain. Res. Mol. Brain Res.* **31**, 122-130.
- Galkina, O. V., Al'perina, E. L., Podgoraia, E. K., & Devoino, L. V. (1990). Izmenenie urovnia dopamina i ego metabolitov v strukturakh mozga i immunokompetentnykh organakh pri formirovanii immunogo otveta. *Biull. Eksp. Biol. Med.* **110**, 66-68.
- Grijalva, C. V., Levin, E. D., Morgan, M., Roland, B., & Martin, F. C. (1990). Contrasting effects of centromedial and basolateral amygdala lesions on stress-related responses in the rat. *Physiol. Behav.* **48**, 495-500.
- Haas, H. S., & Schauenstein, K. (1997). Neuroimmunomodulation via limbic structures: The neuroanatomy of psychoimmunology. *Prog. Neurobiol.* **51**, 195-222.
- Haberly, L. B., & Price, J. L. (1978). Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex in the rat. II. Systems originating in the olfactory peduncle. *J. Comp. Neurol.* **181**, 781-809.

- Hatfield, T., & Gallagher, M. (1995). Taste potentiation odor conditioning impairment produced by infusion of an N-methyl-D-aspartate antagonist into basolateral amygdala. *Behav. Neurosci.* **109**, 663-668.
- Hopkins, S. J., & Rothwell, N. J. (1995). Cytokines and the nervous system I: Expression and recognition. *Trends Neurosci.* **18**, 83-88.
- Kiefer, S. W. (1985). Neural mediation of conditioned food aversions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **443**, 100-109.
- Kiefer, S. W., Rusiniak, K. W., & Garcia, J. (1982). Flavor-illness aversions: Potentiation of odor by taste in rats with gustatory neocortex ablations. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **96**, 540-548.
- Kindler, V., & Zubler, R. H. (1997). Memory, but not naive, peripheral blood lymphocytes differentiates into Ig-secreting cell after CD40 ligation and costimulation with IL-4 and differentiation factors IL-2, IL-10 and IL-3. *J. Immunol.* **159**, 2085-90.
- Lasiter, P. S., & Glanzman, D. L. (1985). Cortical substrates of taste aversion learning: Involvement of dorsolateral amygdaloid nuclei and temporal neocortex in taste aversion learning. *Behav. Neurosci.* **99**, 257-276.
- Luheshi, G. N., Hammond, E., & Dam, A. M. V. (1996). Cytokines as messengers of immune interactions. *Trends Neurosci.* **19**, 46-47.
- Masek, K., Petrovicky, P., & Seifert, J. (1992). An introduction on the possible role of central nervous system structures in neuroendocrine-immune system interactions. *Int. J. Immunopharmacol.* **14**, 317-322.
- McClelland, J. L., McNaughton, B. L., & O'Reilly, R. C. (1995). Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: Insight from the success and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol. Rev.* **102**, 419-457.
- McGaugh, J. L., Cahill, L., Parent, M. B., Mesches, M. H., Coleman-Mesches, K., & Salinas, J. A. (1995). Involvement of the amygdala in the regulation of memory storage. In J. L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni, and R. Prado (Eds.), *Plasticity in the central nervous system: Learning and memory*, pp. 67-82. Erlbaum: Mahwah, NJ.
- Neveu, P. J. (1992). Asymmetrical brain modulation of the immune response. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **17**, 101-107.
- Pan, Q., & Long, J. (1993). Lesions of the hippocampus enhance or depress humoral immunity in rats. *Neuroreport* **4**, 864-866.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press: San Diego.
- Petrovicky, P., Masek, K., & Seifert, J. (1994). Brain regulatory system for the immune response: Immunopharmacology and morphology. *Neuroimmunomodulation* **1**, 165-173.
- Ramirez-Amaya, V., Alvarez-Borda, B., & Bermúdez-Rattoni, F. (1998). Differential effects of NMDA induced lesions in the insular cortex and amygdala on the acquisition and evocation of conditioned immunosuppression. *Brain Behav. Immun.* **12**, 149-160.
- Ramirez-Amaya, V., Alvarez-Borda, B., Ormsby, C. E., Martinez, R. D., Pérez-Montfort, R., & Bermúdez-Rattoni, F. (1996). Insular cortex lesion impair the acquisition of conditioned immunosuppression. *Brain Behav. Immun.* **10**, 103-114.
- Reder, A. T., Karaszewsk, J. W., & Arason, B. G. W. (1989). Sympathetic nervous system involvement in immune responses of mice and patients with multiple sclerosis. In E. J. Goetzl & N. H. Spector (Eds.), *Neuroimmune networks: Physiology and diseases*, pp. 137-47. Alan R. Liss: New York.
- Rothwell, N. J., & Hopkins, S. J. (1995). Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanism of action. *Trends Neurosci.* **18**, 130-136.
- Saper, C. B. 1982. Convergence of autonomic and limbic projections in the insular cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* **2**, 163-173.
- Shen, Y., Specht, S. M., De-Saint-Ghislain, I., & Li, R. (1994). The hippocampus: a biological model for studying learning and memory. *Prog. Neurobiol.* **44**, 485-496.
- Spector, N. H., Provinciali, M., Stefano, G. d., Muzzioli, M., Bulian, D., Viticchi, C., Rossano, F., & Fabris, N. (1994). Immune enhancement by conditioning of senescent mice. Comparison of old and young mice in learning ability and in ability to increase natural killer cell activity and other host defense reactions in response to a conditioned stimulus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **741**, 283-91.

- Taishi, P., Bredow, S., GuhaThakurta, N., Obal, F., & Krueger, J. M. (1997). Diurnal variations of interleukin-1 beta and beta-actin mRNA in rat brain. *J. Neuroimmunol.* **75**, 69-74.
- Tkacs, N. C., Li, J. H., & Strack, A. M. (1997). Central amygdala Fos expression during hypotensive or febrile non-hypotensive endotoxemia in conscious rats. *J. Comp. Neurol.* **379**, 592-602.
- Yu, B., & Shinnick-Gallagher, P. (1994). Interleukin-1 β inhibits synaptic transmission and induces membrane hyperpolarization in amygdala neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**, 590-600.

Received November 2, 1998

Comentario al Trabajo 2

En este trabajo se hizo evidente que el condicionamiento inmunoactivador así como el condicionamiento inmunosupresor dependen de la integridad de estructuras particulares en el sistema nervioso. Dicho de otra manera, el efecto inmune condicionado esta mediado por el sistema nervioso en donde estructuras como la amígdala y la corteza insular son indispensables.

La principal aportación de este trabajo es que permite ir localizando las estructuras que participa o pueden participar en las interacciones neuroinmunes de las que depende el condicionamiento inmune. Tomando en cuenta las relaciones anatómicas de la corteza insular podemos sugerir la participación de estructuras del sistema nervioso autónomo como el NTS, en los procesos efectores que dan lugar a la respuesta inmune condicionada. Así también, en virtud que la amígdala recibe una importante cantidad de aferencias simpáticas y el sistema nervioso simpático a su vez es una importante vía de información inmune al sistema nervioso, probablemente, sea a través de esta ruta, que llegue la información inmune al sistema nervioso para llevar a cabo la asociación de estímulos en el condicionamiento inmunoactivador.

También es importante notar que la participación de la corteza insular en la comunicación neuroinmune, no había sido establecida mediante el uso de otros modelos. Por lo tanto es claro que este modelo de comunicación neuroinmune es sensible a alteraciones en los sistemas neurales implicados en la interacción neuroinmune y capaz de proveer información útil que permita estudiar la manera en como el sistema nervioso central permite esta comunicación.

El carácter del condicionamiento inmunoactivador es más natural, en comparación al condicionamiento inmunosupresor, debido al uso de un antígeno como estímulo incondicionado. El antígeno produce efecto más específicos en la respuesta inmune y por ende las señales que arriban al sistema nervioso deben ser más específicas. Por lo anterior, el condicionamiento inmunoactivador ha de ser útil para proveer de información acerca de lo que ocurre en el sistema inmune que permita explicar como llega la información inmune al sistema nervioso y como el sistema nervioso es capaz de generar un efecto que asemeje a la respuesta inmune inducida naturalmente.

Trabajo 3

Las señales inmunes que informan al sistema nervioso

La estrategia del intervalo óptimo

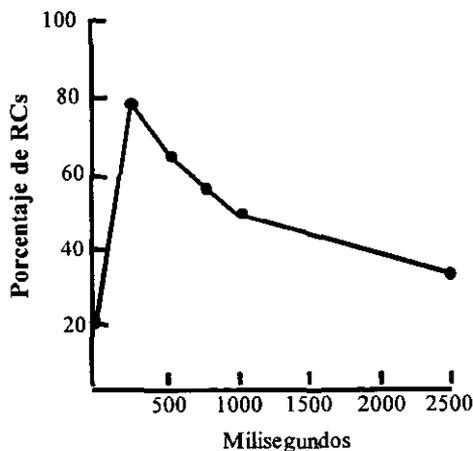
Con el afán de entender cómo el sistema inmunológico informa al sistema nervioso para la asociación de estímulos que da lugar al condicionamiento de la respuesta inmune, el primer paso sería encontrar cuales son las señales que le son útiles al sistema nervioso para desarrollar el condicionamiento.

En todo condicionamiento clásico dos estímulos deben llegar al sistema nervioso central y asociarse al coincidir temporalmente en una región particular del sistema nervioso. En el condicionamiento inmune, el único estímulo (de los que administramos) que sabemos llega directamente al sistema nervioso es el estímulo condicionado (gustativo u olfativo), mientras que el antígeno seguramente produce algo que llega como estímulo al sistema nervioso pero es altamente improbable que por sí mismo funcione como estímulo para el sistema nervioso. Existen moléculas que liberan las células del sistema inmune que pueden funcionar como señales para el sistema nervioso, estas moléculas son las interleucinas que se liberan ante diferentes eventos inmunológicos como durante el procesamiento del antígeno y el desarrollo de la respuesta inmune. Es posible que algunas de las interleucinas que se liberan durante el procesamiento del antígeno y el establecimiento de la respuesta inmune puedan funcionar como señales para el sistema nervioso. Sin embargo, estudiar cada una de las interleucinas que libera el sistema inmune y evaluar su papel en la comunicación neuroinmune determinante del condicionamiento representa una labor muy ardua y poco práctica. Por ello, buscamos una manera de restringir el universo de moléculas que participan en el condicionamiento mediante una estrategia conductual.

La contingencia en todo condicionamiento clásico esta dada por la presentación del estímulo condicionado seguida de la presentación del estímulo incondicionado; sólo de esta manera podemos obtener una respuesta condicionada. El intervalo entre la presentación del estímulo condicionado y la presentación del estímulo incondicionado debe de tener un tiempo óptimo. En la Figura I3, se presentan los resultados de un experimento típico de condicionamiento clásico en donde se mueve el intervalo entre estímulos. Notese que el intervalo en el que la respuesta condicionada es mayor es entre 200 y 300 ms y que antes de esto la respuesta no es tan robusta y después va decayendo paulatinamente hasta no

observarse respuesta alguna. Otra característica importante del condicionamiento clásico es que si presentamos primero el estímulo incondicionado y después el estímulo condicionado, no obtendremos ninguna respuesta condicionada. En el experimento que hicieron Ader y colaboradores (1993), en donde demuestran la posibilidad de hacer un condicionamiento inmunoactivador con el apareamiento de un estímulo gustativo y KLH, obteniendo un condicionamiento inmunoactivador, obtienen también un interesante dato. Los animales del grupo NC (condicionamiento no contingente) a los cuales se les presentó primero el antígeno y después el sabor con intervalos entre estímulos variables, presentan una tenue respuesta condicionada (ver Fig12). Este dato sugiere que en al menos algunos de los apareamientos los animales pudieron asociar el sabor con algún producto del procesamiento del antígeno.

Fig16 Muestra la curva de un experimento típico de condicionamiento clásico en donde se condiciona la



respuesta de parpadeo en conejos. Se observa como se modifica la probabilidad de la respuesta condicionada ante las variaciones del intervalo entre estímulos (EC-EI). Tomado de J.R. Anderson Learning and Memory, 1995.

Si el antígeno se presenta antes y el sabor después y aún así los animales aprenden con este tipo de apareamiento no contingente, la señal que funciona como el verdadero estímulo incondicionado debe ser un producto del procesamiento del antígeno que se

mantiene hasta que se presenta el estímulo condicionado y es entonces, que puede asociarse.

Al conocer el intervalo óptimo entre estímulos que permite dar lugar a una respuesta inmune condicionada, utilizando el sistema de apareamiento hacia atrás (primero el antígeno y después el sabor), podremos reducir el espacio temporal en el que ocurren eventos inmunológicos asociados a la(s) señal(es) que llega(n) al sistema nervioso y se asocia para dar lugar el condicionamiento inmunoactivador. Así podremos reducir el universo de moléculas liberadas por células de sistema inmune que posiblemente sirvan como señal para el sistema nervioso. Por lo anterior se planteó la necesidad de realizar el siguiente experimento, que consistió en mover el intervalo entre estímulos hacia atrás, buscando el intervalo en el cual la respuesta inmune condicionada fuese la más robusta.

Método:

Sujetos:

Se utilizaron 29 ratas macho de la cepa Wistar de 6 semanas de edad aproximadamente, en un rango de peso entre 250-320gr. Los animales fueron separados en cajas individuales y situados en un ciclo invertido de luz obscuridad de 12:12 horas, dentro de un cuarto aséptico. Todos los experimentos se efectuaron durante la fase oscura del ciclo. A lo largo del experimento, los animales se mantuvieron con comida y agua *ad libitum* excepto durante los procedimientos para establecer la línea base de consumo de agua.

Condicionamiento:

Antes del entrenamiento en el condicionamiento inmune, todos los animales fueron privados de agua durante 24hrs, y se les tomó un registro de consumo basal de agua durante 4 días (10 min. de consumo 2 veces al día 9am-9pm). El quinto día en la sesión matutina de consumo se les presentó en su bebedero, una solución al 0.1% de sacarina disuelta en agua y se les permitió beber durante 10 min. Inmediatamente después del período de consumo se les inyectó intraperitonealmente una solución de 0.5 µg de lisozima de gallina (HEL) disuelta en 300 µl de solución salina. Se les deja nuevamente el agua *ad libitum* 5 hrs después del apareamiento de los estímulos y durante los días que dure la respuesta inmune

primaria ante el antígeno, que en el caso de la lisozima es de 25 días. Después de estos días de espera, se priva nuevamente a los animales para comenzar una segunda línea base de consumo de agua. Al final de ésta, se reexpone a los animales a la solución de sacarina durante 10 min. en la fase matutina de consumo.

Medición de los niveles de anticuerpos:

Se tomaron muestras de sangre 4, 8 y 12 días después de la reexposición a la sacarina. De la sangre se obtiene el suero por centrifugación y se analizan los niveles de anticuerpos por medio de la técnica de ELISA, la cual se describe en detalle en los trabajos ya publicados y presentados previamente. El mejor indicador del efecto condicionado como lo hemos visto anteriormente son los niveles de IgG más que los de IgM, por lo cual en este experimento sólo medimos los niveles de IgG.

Procedimiento:

Los animales se dividieron en 6 grupos. Se utilizó un grupo de animales condicionado (CS n=4) el cual recibió el apareamiento contingente de sacarina y lisozima, y que el día de la prueba fue reexpuesto al sabor a sacarina. Un grupo de animales que recibió el apareamiento contingente de los estímulos pero que no se reexpuso a la sacarina (CS₀ n=4). Un grupo de animales UCS (n=3) los cuales el día del entrenamiento solo recibieron la inmunización con HEL y el día de la reexposición fueron inmunizados nuevamente. Finalmente los últimos 3 grupos fueron condicionados de manera no contingente, es decir recibieron el apareamiento de HEL y sacarina de manera invertida (primero la lisozima y después la sacarina) con 3 intervalos entre estímulos diferentes, 15 min. (CS-15 n=6), 60 min. (CS-60 n=7), 360 min. (CS-360 n=5). El día de la prueba los animales de estos tres grupos fueron reexpuestos a la sacarina.

Después del último sangrado todos los animales fueron sacrificados. Se realizaron las pruebas estadísticas de ANOVA simple y ANOVA de medidas repetidas y como *post hoc* la prueba de Fisher.

Resultados:

Como se había visto previamente el consumo de sacarina no varía significativamente entre la primera y segunda exposición, aunque cabe notar que siempre se

observa un incremento en el consumo durante la segunda exposición. La Fig 1 muestra los niveles de IgG en las muestras tomadas a los 4, 8 y 12 días después de la reexposición al estímulo gustativo para los animales de los diferentes grupos.

El ANOVA de medidas repetidas mostró un efecto significativo del tratamiento ($F_{5,78} = 12.57, p < 0.01$) en los niveles de IgG. También se encontraron diferencias entre los días ($F_{2,10} = 206.1, p < 0.01$) e interacción ($F_{10,156} = 6.83, p < 0.01$). Los resultados del ANOVA implican que los animales de los diferentes grupos muestran cambios en la producción de anticuerpos que difieren dependiendo del tratamiento (Ver Figura 7).

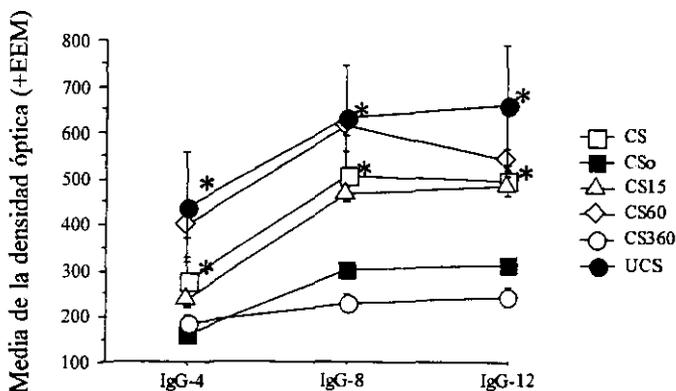


Figura 7. Muestra los resultados de la medición de niveles de anticuerpos del tipo IgG anti HEL. Para los grupos de animales CS: condicionado; CS0: condicionado no reexpuesto; CS15-360: condicionados con intervalo acia atras entre estímulos de 15, 60 y 360 minutos respectivamente; UCS: inmunizado y reexpuesto al antígeno. * = $P < 0.05$ en comparación al CS0.

El análisis *post hoc* reveló que en la muestra tomada a 4 días después de la reexposición (IgG-4) solo los animales de los grupos CS-60, y los del grupo UCS presentan diferencias con el control del condicionamiento (CS0) En las muestras tomadas a los 8 y 12 días (IgG-8 e IgG-12) los animales de los grupos CS, CS-15, CS-60 y UCS presentan diferencias con el CS0. Estos resultados implican que los animales de los grupos CS, CS-15 y CS-60 presentaron la respuesta condicionada. En comparación al UCS los animales de todos los grupos excepto del CS-60, presentan diferencias estadísticamente significativas en todas las muestras ($p < 0.05$), lo cual implica que la respuesta de producción de IgG para

los animales del grupo CS-60 es muy semejante a la respuesta incondicionada inducida por la readministración del antígeno.

Discusión:

Los resultados obtenidos nos permiten sugerir con relativa certeza que dado que es posible obtener un efecto condicionado claro cuando el procedimiento de apareamiento ha sido invertido, como en los casos de los grupos CS-15 y CS-60, que algún producto del procesamiento del antígeno es el estímulo que funciona como estímulo incondicionado para el sistema nervioso, lo cual replica los resultados parciales obtenidos por Ader y cols en 1993.

Es también evidente que la mejor respuesta obtenida se da cuando el intervalo entre estímulos es de 60 minutos, mientras que con 6 horas de intervalo no se obtiene respuesta alguna. Esto sugiere que se trata de un producto temprano del procesamiento del antígeno. Sin embargo también es cierto que el producto puede estar presente entre 60 y 360 minutos, por lo que el rastreo con más detalle del intervalo óptimo necesariamente se ha de hacer de manera más fina.

Con este orden de ideas, a la fecha hemos realizado 2 experimentos más en los que se ha encontrado que con el uso de la lisozima como estímulo antigénico, aparecen 2 intervalos óptimos uno a los 60 minutos y otro a las 2 horas, el primero siempre más robusto que el segundo, y con deterioros en la respuesta entre 60 y 120 minutos y después de 120 minutos en fase descendente hasta no observar nada desde las 5 horas. Con el uso de otro antígeno como el KLH (Key-Hole Lymph Hemocyanine) se han encontrado también dos intervalos óptimos, uno también a los 60 minutos y el otro a los 240 minutos con claros deterioros de la respuesta entre 60 y 240 y en fase descendente desde los 240 hasta no obtener nada a las 6 horas; cabe agregar que a las 4 horas también se observa un efecto condicionado que aunque más bajo que el condicionado normal significativamente mayor al control CSo.

Los resultados del presente experimento sugieren que las moléculas que se producen durante la fase temprana del procesamiento del antígeno son candidatos probables para la señalización a sistema nervioso. Esta señal permite el establecimiento de una asociación entre estímulos que da como resultado un condicionamiento clásico, en donde el estímulo gustativo que adquiere la capacidad de un estímulo condicionado es capaz de producir en el

animal un incremento en la producción de IgG tan robusto como la respuesta inmune secundaria inducida por la readministración del antígeno.

Es sin duda notable que los decrementos de la respuesta entre dos intervalos óptimos y la propia existencia de dos intervalos implica que la cinética de producción de la señal, debe seguir dicho patrón, o bien de que se trata de dos productos cada uno con su pico máximo a un tiempo diferente. También es importante notar que independientemente del antígeno que se use existe un intervalo óptimo a los 60 minutos y después de 6 horas no se obtiene respuesta condicionada alguna, lo que nos dice que el o los productos están en sus picos máximos al rededor de la hora y no deben estar ya presentes a las 6 horas.

Las interlucinas, como ya se mencionó en la introducción de la tesis, pueden funcionar como mensajeros para las células nerviosas. Los resultados del intervalo óptimo apuntan a que algunas de estas interleucinas, sobre todo las producidas durante la activación de macrófagos y la presentación del antígeno, pueden ser mensajeros de los que dependa el condicionamiento inmune. En la actualidad como proyecto de doctorado del Mtro. Enrique Espinosa, se están midiendo los niveles de ácido ribonucleico mensajero de diferentes interleucinas en diversos tejidos como bazo, peritoneo y nodos paratímicos, así como en sangre a diferentes tiempos después de la administración de KLH como antígeno. Se ha encontrado que la interleucina 6 y la interleucina 1 presentan un pico de alta expresión en bazo a 1 hora de administrado el antígeno. La interleucina 1 presenta dos picos máximos de producción uno a 1 hora como se mencionó y el otro a los 240 minutos. En éste sentido, los picos de producción de la interleucina 1 se correlacionan con los intervalos óptimos encontrados con este antígeno.

De esta manera vemos cómo la estrategia conductual del intervalo óptimo nos ha permitido reducir el universo de moléculas candidatas a señalar al sistema nervioso para llevar a cabo la asociación. Aunque cabe señalar que no se cuenta aún con resultados completos respecto a las interleucinas que pueden fungir como señales para el sistema nervioso, tenemos la posibilidad de encontrar correlaciones entre la expresión de moléculas y la fuerza de la respuesta condicionada con lo cual se sugiere la participación de aquellas cuya correlación sea más clara.

No conocemos adecuadamente la vía mediante la cual el sistema nervioso recibe la información inmune. Sin embargo, los datos referentes a las estructuras neurales que participan en el condicionamiento inmune, dirigen nuestra atención hacia el sistema

nervioso autónomo, principalmente al sistema nervioso simpático. Por ello es probable que la o las señales que funjan como estímulos incondicionados lleguen a informar al sistema nervioso via el sistema nervioso simpático.

Sabemos que el sistema nervioso simpático inerva directamente regiones de tejido linfóide primario como el bazo (Felten, Ackerman, Wiegand & Felten, 1987) y que dicha inervación lleva a cabo funciones tanto regulatorias como sensoriales. Por ello es posible que las inervaciones simpáticas al bazo, sean las encargadas de que el sistema nervioso reciba la información inmunitaria, aunque esto es sólo especulación pues es necesario descartar la posibilidad de que la expresión correlacionada de interleucina se de en otros tejidos linfoides.

En suma, se tiene ahora una estrategia adecuada para reducir el amplio espectro de posibles señales que pueden informar al sistema nervioso del procesamiento del antígeno para dar lugar al condicionamiento y se han comenzado a obtener datos que en un futuro permitan entender con mayor claridad la manera en cómo el sistema inmune y el sistema nervioso se comunican.

Conclusiones Generales

Mediante un procedimiento de condicionamiento clásico es posible establecer una asociación entre un estímulo gustativo u olfativo con un estímulo inmunológico provocado por la administración de un antígeno, lo cual permite que el organismo desarrolle la capacidad de responder con un incremento en la producción de anticuerpos ante la exposición al estímulo condicionado. Este hecho es sin duda una de las mejores demostraciones de la interacción funcional entre el sistema nervioso central y el sistema inmunológico. El hecho de que las funciones del sistema inmune se puedan condicionar por procedimientos de aprendizaje implica que de alguna manera el sistema nervioso es capaz de enterarse de lo que ocurre a nivel inmunitario, tanto acerca de cambios en el estatus general del sistema inmune, como en el caso de la inmunosupresión, como los cambios poco robustos que ocurren durante el desarrollo de una respuesta inmune a un antígeno en particular, que es el caso del condicionamiento inmunoactivador. De la misma forma, el condicionamiento inmune implica que el sistema nervioso ha de procesar de alguna manera esta información y llevar a cabo procesos asociativos que permitan al estímulo condicionado inducir una respuesta neural que dé lugar a un efecto modulador sobre el sistema inmune.

Así, el condicionamiento inmune puede representar uno de los modelos más útiles para entender los mecanismos de la comunicación neuroinmune. Una de las principales razones que pueden hacer a este el modelo de elección, es que los mecanismos neurales e inmunológicos que participan en el condicionamiento inmune son elementos que naturalmente intervienen en el sistema de comunicación neuroinmune. Es decir, en el modelo de condicionamiento inmune se establece una comunicación bastante limpia, en donde no se altera la función natural de la respuesta inmune a diferencia de lo que ocurre en procesos infecciosos que por la interacción entre el patógeno y el huésped se altera la respuesta inmune. Así también la actividad neural se encuentra trabajando en condiciones fisiológicas. En la literatura se puede encontrar una gran variedad de datos tendientes a esclarecer los detalles de la comunicación entre el sistema nervioso y el sistema inmune; sin embargo los modelos para entender dicha comunicación están basados principalmente en procesos como la infección, inflamación, fiebre y otros. Si bien éstos modelos nos permiten evidenciar también la existencia de una importante interacción entre ambos sistemas, al estar alterado el funcionamiento normal tanto del sistema nervioso como del sistema inmune, los procesos de regulación fisiológica y por ende la comunicación entre los diversos sistemas, no funciona de manera normal. En el caso de la fiebre por ejemplo se

sabe que los incrementos en las concentraciones de interleucina 1 sirven de señal para que el hipotálamo eche a andar los mecanismos pirogénicos responsables del incremento de la temperatura corporal. Sin duda este es un muy buen ejemplo de cómo se comunican el sistema inmune y el sistema nervioso pero dicho evento no permite ver si otros niveles de secreción del mensajero son importantes para el sistema nervioso como señal inmunológica y tampoco nos permite entender que otras estructuras o sistemas neurales participen en la comunicación.

En el condicionamiento inmunoactivador tenemos una herramienta útil para estudiar la comunicación neuroinmune, en donde no se altera de manera importante el funcionamiento del organismo. Cabe señalar que los niveles de temperatura corporal en animales inmunizados con las dosis que se utilizan para el condicionamiento no cambian de manera importante. Tampoco la conducta general del animal se ve alterada, como en el caso de la conducta de enfermedad ampliamente usada como modelo de comunicación neuroinmune. En el condicionamiento inmune se dan cambios que ocurren en ambientes naturales, y esta capacidad adaptativa del animal le permite prepararse mediante estímulos ambientales (al menos gustativos u olfativos) para enfrentar futuros retos inmunológicos.

Con este modelo de condicionamiento de la respuesta inmune se puede estudiar la participación de estructuras neurales en la comunicación neuroinmune. En nuestro caso este modelo nos permitió obtener evidencia relevante que involucra a dos estructuras neurales en este tipo de comunicación. La amígdala y la corteza insular son elementos estructurales del sistema nervioso indispensables para que se lleven a cabo los mecanismos de comunicación neuroinmune responsables de dar lugar al condicionamiento inmune.

Este hallazgo difícilmente se habría dado sin el uso del condicionamiento inmune. Si bien es cierto que con el uso de lesiones en estructuras neurales y el estudio de su efecto directo en la inmunidad, se ha encontrado evidencia de la participación de estructuras como el septum (Wetmore et al., 1994) y el hipocampo (Pan & Long, 1993), resulta interesante el hecho de que lesiones de la corteza insular y la amígdala no afecten la respuesta inmune normal, pero sí impiden el establecer una asociación entre el estímulo gustativo y el antígeno. Esto implica que dichas estructuras son parte fundamental de los sistemas de comunicación neuroinmune que permiten la asociación entre estímulos inmunes y estímulos sensoriales, y sugiere que los sistemas relacionados a estas estructuras en especial el sistema nervioso autónomo, han de estar involucrados de alguna manera en los sistemas de comunicación. De hecho es probable que el sistema nervioso autónomo funcione tanto

como órgano sensorial como sistema efector de la respuesta inmune condicionada. Se ha propuesto que el sistema nervioso autónomo es el órgano sensorial más importante para el sistema nervioso en la interacción neuroinmune (Luheshi et al., 1996), este inerva directamente regiones de tejido linfoide primario y secundario (Felten et al., 1987; Felten et al., 1985) y en las terminales que arriban a dichos tejidos expresa receptores para una gran variedad de interleucinas (Rothwell & Hopkins, 1995). La relación funcional que existe entre el sistema nervioso autónomo y estructuras como la amígdala y la corteza insular podrían ser la clave para entender cómo se establece la comunicación entre el sistema inmune y el sistema neural. Sin embargo primero es necesario establecer si es mediante este sistema que se transmite la información hacia el sistema nervioso.

Con el uso del modelo de condicionamiento inmune también hemos encontrado evidencia que sugiere un papel funcional de factores producidos por las células inmunitarias en la comunicación neuroinmune. Lo anterior se logró mediante el estudio del intervalo óptimo, en donde moviendo hacia atrás el intervalo entre estímulo hemos visto que los animales se pueden seguir condicionando. Más aún, el condicionamiento hacia atrás permite que los animales presenten una respuesta condicionada aún más robusta que con un intervalo cero. Este dato sugiere por si solo, que algunos productos del procesamiento del antígeno son los encargados de fungir como señales para el sistema nervioso y por lo tanto sugiere un papel importante de las interleucinas en este sistema de señalización.

Se ha demostrado la existencia tanto de receptores a interleucinas en diversas regiones de sistema nervioso (Hopkins & Rothwell, 1995) como la expresión de interleucinas en tejido neural (Rothwell & Hopkins, 1995), aún cuando no se tiene evidencia clara de que sean células neurales las que las producen. Se ha especulado mucho respecto al papel que las interleucinas producidas en tejido neural y los receptores para las mismas pueden jugar en la comunicación neuroinmune. Respecto a esto, existen muchos problemas que no se han resuelto, uno de ellos es la manera en como las interleucinas producidas en el sistema linfático llegan a sistema nervioso, pues han de atravesar la barrera hematoencefálica y aún cuando se han propuesto mecanismos de transporte, aún no se ha demostrado concluyentemente su funcionalidad (Cunningham & Souza, 1993). No se sabe tampoco si los receptores que se expresan en el sistema nervioso funcionan como sensores del *status inmunológico* o bien responden ante las interleucinas producidas en tejido nervioso, las cuales muy probablemente puedan ser secretadas por células gliales y cumplir funciones de inmunidad en el tejido neural (Gordon, Nolan, Ksander, Knopf & Harling-Berg, 1998). Aún cuando se encuentren receptores y expresión de interleucinas, esto no es

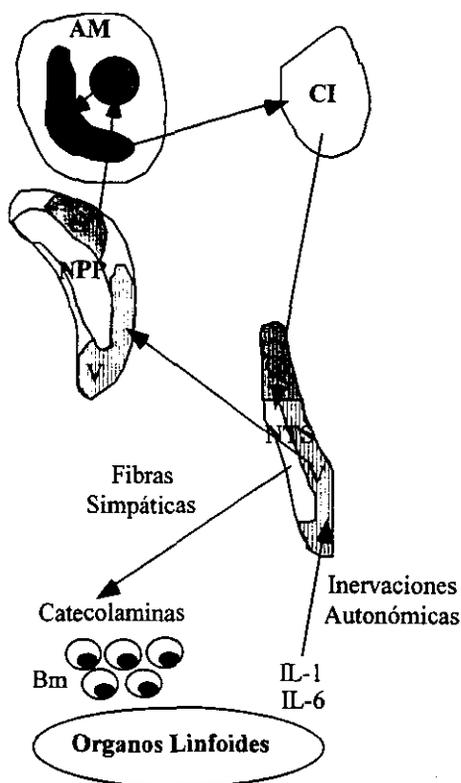
evidencia que permita entender los mecanismos de comunicación neuroinmune. Es necesario tener un modelo de comunicación y con él, estudiar los detalles de la comunicación neuroinmune, como en el caso del modelo de condicionamiento, con el cual es posible diseccionar los mecanismos de comunicación y entender poco a poco los detalles de la misma.

Es así, que creemos que una de las mejores formas de avanzar en esta línea es establecer cuales interleucinas funcionan como mensajeros para el sistema nervioso y si éstas funcionan como tal en algún tejido linfático en particular. Por ejemplo, al correlacionar la expresión de interleucina 1 con el intervalo óptimo podemos sugerir su participación como mensajero entre el sistema inmune y el sistema nervioso, al establecer que la producción del factor mensajero se da en un tejido linfático en particular, como el bazo, podríamos sugerir que ese tejido es un punto clave en la vía de comunicación y estudiaríamos así la inervación autonómica a dicho tejido y entender su papel en los mecanismos de señalización. Recientemente se encontró que el condicionamiento inmunosupresor obtenido con el uso de ciclosporina A es dependiente de la inervación simpática al bazo, ya que la denervación de estas fibras impide la expresión de la respuesta condicionada (Exton et al., 1998). Los autores sugieren que al afectarse solo el condicionamiento inmune y no el condicionamiento aversivo a los sabores obtenido de manera colateral por el efecto de malestar producido por la ciclosporina, las inervaciones al bazo deben ser las responsables del proceso eferente que da lugar a la respuesta condicionada. Sin embargo su evidencia no permite aclarar si las inervaciones al bazo son responsables de informar al sistema nervioso o de dar lugar al efecto condicionado. Es necesario entonces comparar el efecto de la destrucción de las inervaciones al bazo efectuadas antes y después de que se ha adquirido el condicionamiento, para obtener evidencia que pueda aclarar si estas inervaciones son responsables del proceso eferente o aferente.

Para entender como el sistema inmune informa al sistema nervioso, estamos investigando que estructuras del sistema nervioso responden ante el reto antigénico. Ello nos permitirá reconocer las partes del sistema nervioso que responden durante los procesos de comunicación neuroinmune y correlacionar esto con los hallazgos observados con el recurso de las lesiones. Es así, que iniciamos una serie de estudios en donde buscamos ver la expresión de la proteína FOS (un marcador de actividad transcripcional) en diferentes regiones de tallo cerebral y del sistema límbico, después de la inmunización con antígenos como el KLH y la HEL. Con esto podremos localizar la ruta por la que llega la información

inmune a estructuras como la amígdala y la corteza insular. Hasta ahora hemos encontrado que estructuras como el NTS y el NPP presentan un incremento en la expresión de FOS que podría estar asociada a los picos del intervalo óptimo, así también, al parecer el núcleo central de la amígdala presenta un incremento en la expresión de FOS ante el reto antigénico.

A pesar de que los datos no son abundantes, podemos comenzar a plantear como ocurre el flujo de información entre el sistema inmunitario y el sistema nervioso para dar lugar al condicionamiento de la respuesta inmune. Los factores que funcionan como mensajes para el sistema nervioso como resultado de la inmunización pueden ser interleucinas, como IL-1 e IL-6, liberadas en algunos tejidos linfoides por células inmunes activadas durante el procesamiento del antígeno. Estos factores son traducidos como un mensaje en forma de actividad neural a través de células autonómicas que expresan receptores para estas interleucinas. Las fibras autonómicas llevan a cabo procesamientos primarios de la información en núcleos del tallo cerebral, al parecer, principalmente en el núcleo parabraquial del puente (NPP), que a diferencia del NTS cuenta con interneuronas lo cual podría tener implicaciones en términos de procesamiento de la información. Del NTS la información podría llegar directamente a la corteza insular, aunque se sabe que la amígdala es indispensable para la adquisición del condicionamiento lo cual junto con los datos que muestran al núcleo central de la amígdala incrementar la expresión de FOS después de haber retado al animal con un antígeno, sugieren que la información ha de llegar primero al núcleo central de la amígdala y probablemente también al basolateral, el cual, además de ser indispensable para el condicionamiento, envía fibras a la corteza insular. Probablemente en la corteza insular se lleven a cabo procesos asociativos que permiten que se den cambios plásticos en esta estructura, tales que el estímulo gustativo se hace capaz de activar por sí sólo mecanismos que resultan en la modulación del sistema inmune, muy probablemente a través de la inervación simpática a regiones de tejido linfoide primario como el bazo en donde la liberación de catecolaminas pudieran estimular grupos de células B de memoria, funcionando estas moléculas como mitógenos específicos de células B de memoria (Ver esquema 2).



Esquema 2. Se presenta el esquema propuesto de comunicación neuroinmune que permite el condicionamiento de la respuesta inmune. CI: corteza insular; AM: Amígdala, Bl: basolateral, Ce: central; NTS: núcleo del tracto solitario, G: gustativo, V: visceral; NPP: núcleo parabraquial del puente, G: gustativo, V: visceral; IL: interleucinas; Bm: células B de memoria.

Es importante recordar que no se ha demostrado claramente la participación de muchos de los elementos del esquema que presentamos para explicar el condicionamiento inmune. Se tiene evidencia, por ejemplo, de la participación de la corteza insular y el núcleo basolateral de la amígdala. Además se tienen datos recientes que involucran al NTS y el NPP en sus regiones viscerales, en el procesamiento de la información después del reto antigénico, en donde también al parecer participa el núcleo central de la amígdala. Se tiene evidencia que sugiere que las señales inmunes que intervienen en el condicionamiento pueden ser la IL-1 y la IL-6 secretadas en bazo. Sin embargo, no está demostrado que las

inervaciones al bazo sean las responsables de llevar a cabo la transformación de información inmune en información nerviosa, aunque los datos de Exton lo sugieren (Exton et al., 1998). Tampoco sabemos como la corteza insular lleva a cabo los procesos de regulación de la respuesta inmune, aunque es probable, dadas las relaciones anatómicas de esta estructura que sea a través del sistema nervioso simpático y muy probablemente vía el NTS con el que la corteza tiene conexiones bidireccionales (Norgren, 1978; Ricardo & Koh, 1978; van-der-Kooy, Koda, McGinty, Gerfen & Bloom, 1984). Las eferencias simpáticas a tejido linfoide primario y/o secundario (Felten et al., 1987; Felten & Felten, 1991) pueden ser las responsables de generar el efecto inmunomodulador. Finalmente, es muy poco probable que la regulación de la respuesta inmune sea antígeno específica, por lo que se piensa que los efectos moduladores del sistema nervioso sobre el sistema inmune sean dirigidos a células B de memoria, lo cual explicaría el como se establece una respuesta inmune condicionada, diferente de la respuesta inmune normal. Esto último se ha de aclarar con futuras investigaciones.

Por lo pronto tenemos en nuestras manos un buen modelo de comunicación neuroinmune, y para avanzar en el entendimiento de esta comunicación el camino aún es arduo. Probablemente lo que más se complique sea el demostrar el papel que las diferentes señales inmunes y nerviosas juegan en el sistema de comunicación neuroinmune, pero tenemos la ventaja de que las características propias del modelo puede eventualmente permitimos diseccionar los detalles de la comunicación neuroinmune.

Referencias

- Ader, R., & Cohen, N. (1975). Behavioral conditioned immunosuppression. *Psychosomatic medicine*, 37, 333-340.
- Ader, R., & Cohen, N. (1985). CNS-Immune system interactions: Conditioning phenomena. *The Behavioral and Brain Science*, 8, 379-426.
- Ader, R., Cohen, N., & Bovbjerg, D. (1982). Conditioned suppression of humoral immunity in the rat. *Journal of Comparative physiology and psychology*, 96, 517-521.
- Ader, R., Kelly, K., Moynihan, J. A., Grotta, L. J., & Cohen, N. (1993). Conditioned enhancement of antibody production using antigen as the unconditioned stimulus. *Brain Behavior and Immunity*, 7, 334-343.
- Baciu, I. (1992). The role of nervous mechanisms in the immune response. *Romanian Journal of Physiology*, 29, 5-11.
- Barker, L. M., Best, M. R., & Donjan, M. (1977). *Learning Mechanism in food selection*. Waco Texas: Bayiour University Press.
- Basedovsky, H. O., Del-Rey, A. E., & Sorkin, E. (1985). Immune-neuroendocrine interactions. *Journal of Immunology*, 7, 325-328.
- Bermúdez-Rattoni, F., Introini-Collison, I. B., & McGaugh, J. L. (1991). Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proceedings of the national academy of sciences*, 88, 5379-5382.
- Bermúdez-Rattoni, F., & McGaugh, J. L. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Research*, 549, 165-170.
- Bernardini, R., Calogero, A. E., Mauceri, G., & Chrousos, G. P. (1990). Rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro is stimulated by interleukin-1 in an eicosanoid-dependent manner. *Life Science*, 47, 1601-1607.
- Braun, J. J., Lasiter, P. S., & Kiefer, S. W. (1982). The gustatory neocortex of the rat. *Physiological Psychology*, 10, 13-45.
- Braun, J. J., Slick, T. B., & Lorden, J. F. (1972). Involvement of gustatory cortex in the learning of taste aversions. *Physiology and Behavior*, 9, 637-41.
- Cross, R. J., Markesberry, W. R., Brooks, W. H., & Roszman, T. L. (1980). Hypothalamic-Immune Interactions. *Brain Research*, 196.
- Cunningham, E. T. J., & Souza, E. B. D. (1993). Interleukin 1 receptors in the brain and endocrine tissues. *Immunology Today*, 14, 171.

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

Exton, M. S., Hörsten, S. v., Schult, M., Vöge, J., Strubel, T., Donath, S., Steinmüller, C., Seeliger, H., Nagel, E., Westermann, J., & Schedlowski, M. (1998). Behaviorally conditioned immunosuppression using cyclosporine A: central nervous system reduces IL-2 production via splenic innervation. *Journal of Neuroimmunology*, *88*, 182-191.

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

Felten, D. L., Ackerman, K. D., Wiegand, S. J., & Felten, S. Y. (1987). Noradrenergic and sympathetic innervation of the spleen. *Journal of Neuroscience Research*, *18*, 28-36.

Felten, D. L., Cohen, N., Ader, R., Felten, S. Y., Carlson, S. L., & Roszman, T. L. (1991). Central neural circuits involved in Neural-Immune Interactions. In R. Ader, N. Cohen, & D. L. Felten (Eds.), *Psychoneuroimmunology*, (2nd ed.,). New York: Academic Press.

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

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

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

Gold, R. M., & Proulx, D. M. (1972). Bait-shyness acquisition is impaired by VMH lesions that produce obesity. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, *79*, 201-9.

Gorczyński, R. M., Macrae, S., & Kennedy, M. (1982). Conditioned immune response associated with allogenic skin grafts in mice. *Journal of Immunology*, *129*, 704-9.

Gordon, L. B., Nolan, S. C., Ksander, B. R., Knopf, P. M., & Harling-Berg, C. J. (1998). Normal cerebrospinal fluid suppresses the in vitro development of cytotoxic T cells: role of the brain microenvironment in CNS immune regulation. *Journal of Neuroimmunology*, *88*, 77-84.

Gutierrez, E. G., Banks, W. A., & Kastin, A. J. (1993). Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *Journal of Neuroimmunology*, *47*, 169-76.

Hart, R. P., Liu, C., Shadiack, A. M., McCormack, R. J., & Jonakait, G. M. (1993). An mRNA homologous to IL-1 receptor type I is expressed in cultured rat sympathetic ganglia. *Journal of Neuroimmunology*, *44*, 49-56.

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

Hori, T., Nakashima, T., Take, S., Kaizuka, Y., Mori, T., & Katafuchi, T. (1991). Immune cytokines and regulation of body temperature, food intake and cellular immunity. *Brain Research Bulletin*, *27*, 309-313.

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

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 A. J. Husband (Ed.), *Psychoimmunology: CNS-Immune Interactions*, (pp. 139-147). Boca Raton, FL: CRC Press.

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

Jenkins, P. E., Chadwick, R. A., & Nevin, J. A. (1983). Classically conditioned enhancement of antibody production. *Bulletin of the Psychonomic Society*, *21*, 485-7.

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

Keller, S. E., Schleifer, S. J., & Demetrikopoulos, M. K. (1991). Stress-induced changes in immune function in animals: Hypothalamo-pituitary-adrenal influences. In R. Ader, D. L. Felten, & N. Cohen (Eds.), *Psychoneuroimmunology*, (pp. 771-787). San Diego Cal.: Academic Press.

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

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

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

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

MacLean, P. D. (1972). Cerebral Evolution and Emotional Processes. *Annals of the N.Y. Academy of Sciences*, 193, 137-149.

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

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

Marz, P., Cheng, J. G., Gadiant, R. A., Patterson, P. H., Stoyan, T., Otten, U., & Rose-John, S. (1998). Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 95, 3251-6.

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

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

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

Munck, A., & Guyre, P. M. (1991). Glucocorticoids and immune function. In R. Ader, D. L. Felten, & N. Cohen (Eds.), *Psychoneuroimmunology*, (pp. 447-444). San Diego Cal.: Academic Press.

Nachman, M., & Ashe, J. H. (1974). Effects of basolateral amygdala lesions on neophobia, learned taste aversions, and sodium appetite in rats. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, 87, 622-43.

Nagy, E., Berczy, I., Wren, G. E., Asa, S. L., & Kovacs, K. (1983). Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacology*, 6, 231-243.

Neveu, P. J. (1992). Asymmetrical brain modulation of the immune response. *Brain Research, Brain Research Reviews*, 17, 101-107.

Norgren, R. (1978). Projections from the nucleus of the solitary tract in rat. *Neuroscience*, 3, 207-218.

Ormsby, C. E., Ramírez-Amaya, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (1998). Long term retrieval deficits are ameliorated by cortical fetal grafts. *Behavioral Neuroscience*, 112, 172-182.

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

Pan, Q., & Long, J. (1993). Lesions of the hippocampus enhance or depress humoral immunity in rats. *Neuroreport*, 4, 864-866.

Patterson, P. H., & Nawa, H. (1993). Neuronal Differentiation factors/cytokines and synaptic plasticity. *Cell*, 72, 123-137.

Ramirez-Amaya, V., Alvarez-Borda, B., & Bermúdez-Rattoni, F. (1998). Differential effects of NMDA induced lesions in to the insular cortex and amygdala on the acquisition and evocation of conditioned immunosuppression. *Brain Behavior and Immunity*, 12, 149-160.

Ramírez-Amaya, V., Alvarez-Borda, B., Ormsby, C. E., Martínez, R. D., Pérez-Montfort, R., & Bermúdez-Rattoni, F. (1996). Insular cortex lesion inpair the acquisition of conditioned immunosuppression. *Brain Behavior and Immunity*, 10, 103-114.

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

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

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

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

Rothwell, N. J., & Hopkins, S. J. (1995). Cytokines and the nervous system II: actions and mechanism of action. *Trends in Neurosciences*, 18, 130-136.

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

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

Van-der-Kooy, D. L., Koda, L. Y., McGinty, J. F., Gerfen, C. R., & Bloom, F. E. (1984). The organization of projections from the cortex to the amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *Journal of Comparative Neurology*, 224, 1-24.

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

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

Weiner, H. (1977). *Psychobiology and human disease*. New York: Elsevier.

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

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

Yamamoto, T., Matsuo, R., & Kawamura, Y. (1980). Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination. *Journal of Neurophysiology*, 44, 440-454.

Abreviaturas

ACTH	Hormona Adeno Cortico Trópica
CAS	Condicionamiento Aversivo al Sabor
CI	Corteza Insular
CIS	Condicionamiento Inmunosupresor
FOS	Proteína protooncogénica denominada FOS usada como marcador de actividad transcripcional
HEL	"Henn Egg Lisozime" Lisozima de Huevo de Gallina
IgG	Inmunoglobulina G
IL-	Interleucina
KLH	"Keyhole Lymph Hemocianine" Hemocianina de Molusco
NK	Células Asesinas Naturales
NPP	Núcleo Parabraquial del Puente
NTS	Núcleo del Tracto Solitario
TNF	Factor de Necrosis Tumoral