

El efecto residual inmunosupresor de la ciclofosfamida no es necesario para evocar la respuesta inmunosupresora condicionada*

José Vidal Gómez
Universitat de Barcelona

El objetivo es comprobar si el efecto residual inmunodepresor de la ciclofosfamida contribuye a la evocación de la respuesta de anticuerpos condicionada. Se condicionaron ratones no consanguíneos, machos, con el estímulo condicionado sacarina al 0,15% y con el estímulo incondicionado ciclofosfamida, a 50 y 250 mg/kg. A los 4 días del condicionamiento con 50 mg/kg de ciclofosfamida, o a los 14 días del condicionamiento con 250 mg/kg de ciclofosfamida, los ratones se inmunizaron con glóbulos rojos de rata y, a continuación, bebieron la disolución de sacarina. Se comprobó que i) la dosis más baja de ciclofosfamida no generó efecto residual, mientras que la dosis más alta sí, y ii) en ningún caso, la presentación de sacarina disminuyó la respuesta de anticuerpos anti-glóbulos rojos de rata. Se concluye que no se produjo condicionamiento de la respuesta de anticuerpos, tanto si el efecto residual de la ciclofosfamida está presente, como si está ausente.

Palabras clave: condicionamiento de aversión al sabor, inmunosupresión condicionada, efecto residual de la ciclofosfamida.

The residual effect of cyclophosphamide is not required to evoke the conditioned immune response

The goal is to find out if the residual immunodepressant effect of cyclophosphamide is necessary for the conditioned antibody response to take place. Random-bred male mice were conditioned with a 0.15% saccharin solution as the conditioned stimulus, and with the immunosuppressant drug cyclophosphamide, at 50 and 250 mg/kg, as the unconditioned stimulus. Four days after

* Esta investigación está financiada con las ayudas BSO2003-08507-C2-01 y SEJ2004-07621-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Correspondencia: José Vidal, Departamento de Personalidad, Facultat de Psicologia, Universitat de Barcelona, Passeig de la Vall d'Hebron, 171, 08035 Barcelona. Correo electrónico: jvidal@ub.edu

conditioning with 50 mg/kg of cyclophosphamide, or 14 days after conditioning with 250 mg/kg thereof, mice were immunized with rat erythrocytes and thereafter drank a saccharin solution. The results were: (i) the higher dose of cyclophosphamide left a residual effect, whereas the lower dose did not, and (ii) presentation of a saccharin solution did not impair the antibody response to rat erythrocytes in any case. It was concluded that, regardless of the residual effect of cyclophosphamide, conditioning of the antibody response did not occur.

Keywords: taste aversion conditioning, conditioned immunosuppression, residual effect of cyclophosphamide.

El descenso de la respuesta inmune causada por condicionamiento clásico (inmunosupresión condicionada) fue descrito originalmente por Ader y Cohen (1975). Estos autores emparejaron, en la rata, el sabor de sacarina con una inyección de ciclofosfamida (que produce malestar gastrointestinal y reduce la producción de anticuerpos tras la inmunización); al cabo de unos días, la presentación de sacarina hizo que i) las ratas condicionadas consumieran menos disolución de sacarina (es decir, habían desarrollado aversión al sabor) y ii) las ratas condicionadas produjeran menos anticuerpos a unas células extrañas (glóbulos rojos de cordero) inyectadas al tiempo de la ingesta de sacarina; es decir, la respuesta inmune se había condicionado. Estos hallazgos se han reproducido posteriormente: para una revisión, ver Ader y Cohen (1991), Ader y Cohen (1993), Ader y Cohen (2001).

El efecto supresor de la ciclofosfamida sobre la respuesta de anticuerpos dura varios días en función de la dosis administrada (efecto residual): en el ratón, el efecto de 50 mg/kg ya no se detecta a los 5 días de su administración (Kerckhaert, Hofhuis, y Willers, 1977), el efecto de 100 mg/kg se detecta a los 5 días, pero no a los 7 días, de su administración (Kerckhaert *et al.*, 1977), el efecto de 150 mg/kg dura aproximadamente 7 días (Many y Schwartz, 1971), y el efecto de 200 y 300 mg/kg dura más de 7 días (Kerckhaert *et al.*, 1977).

Se ha propuesto que, en roedores condicionados con sacarina como estímulo condicionado y ciclofosfamida como estímulo incondicionado, la exposición al estímulo condicionado evoca la depresión de la repuesta inmune si la exposición ocurre mientras dura el efecto de la ciclofosfamida (Klosterhalfen y Klosterhalfen, 1987; Kusnecov, Husband, y King, 1988; Neveu, Crestani, y Le Moal, 1987). Klosterhalfen y Klosterhalfen (1987) y Kusnecov *et al.* (1988) utilizaron, en la rata, una dosis única de ciclofosfamida (80 mg/kg y 50 mg/kg, respectivamente) y expusieron las ratas condicionadas al sabor de sacarina en diferentes días tras el condicionamiento: solo se observó depresión condicionada de la respuesta inmune dos días después del condicionamiento (Kusnecov *et al.*, 1988) o cinco días después (Klosterhalfen y Klosterhalfen, 1987). Neveu *et al.* (1987) administraron, al ratón, dos dosis de ciclofosfamida (120 mg/kg o 250 mg/kg) y expusieron los ratones condicionados al sabor de sacarina a los 19 días del condicionamiento: solo se observó depresión condicionada de la respuesta inmune cuando el condicionamiento se hizo con la dosis de 250 mg/kg. Por todo ello, los autores anterior-

res propusieron que la evocación de la respuesta condicionada inmunosupresora solo se produciría en presencia del efecto residual de la ciclofosfamida.

El objetivo de este artículo es comprobar esa hipótesis. Para ello, se intentará condicionar los ratones con dos dosis de ciclofosfamida: una, 50 mg/kg, que genera un efecto residual de corta duración, y otra, 250 mg/kg, que genera un efecto residual de más larga duración (Kerckhaert *et al.*, 1977). Si la hipótesis es correcta, la presentación de sacarina a las dos semanas del condicionamiento tendría que evocar la respuesta inmune condicionada en el condicionamiento con la dosis alta, pero no con la dosis baja. Los resultados de este artículo muestran que la presentación de sacarina no evoca en ningún caso la respuesta inmune condicionada.

Método

Sujetos

Se utilizaron ratones no consanguíneos ICR (CD-1), machos, comprados a Harlan Ibérica (Barcelona, España). Los ratones se alojaron en grupos de 4 o 5 por jaula hasta el comienzo del experimento. El ciclo de luz-obscuridad fue de 12 horas: el periodo de luz fue de las 8:00 horas a las 20:00 horas. La temperatura de la habitación fue de 21 ± 1 °C. No hubo restricción en el suministro de comida, y la bebida fue restringida en los momentos que se indican más adelante. La edad de los ratones al comienzo de cada experimento fue de 2 meses aproximadamente. El número total de ratones usados fue de 87.

El Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona aprobó los experimentos descritos en este artículo.

Productos químicos

Los productos siguientes se compraron a Sigma-Aldrich: sacarina sódica hidrato y ciclofosfamida monohidrato.

Inmunización y medida del nivel de anticuerpos

El antígeno (la sustancia que estimula la producción de anticuerpos) fue una suspensión de glóbulos rojos de rata a las dosis indicadas en el texto; los glóbulos rojos se obtuvieron de una rata de la cepa Long Evans.

El nivel sanguíneo de anticuerpos anti-glóbulos rojos de rata se midió con la técnica diffusion -in-gel enzyme-linked immunosorbent assay (DIG-ELISA; Elwing, Lange, y Nygren, 1980), según una modificación hecha por el autor de este artículo (Vidal, 2002). El nivel de anticuerpos en una muestra de suero sanguíneo se expresa como la fracción del contenido en un suero de referencia. En cada ex-

perimento, el suero de referencia fue una mezcla de sueros de ratones no inyectados con ciclofosfamida (grupo placebo que se describe en la sección siguiente).

Procedimiento

Cuando se utilizó la dosis de ciclofosfamida de 250 mg/kg, el procedimiento fue: se alojaron los ratones individualmente (un ratón por jaula) y se asignaron al azar a cuatro grupos: condicionado (n=12), no contingente (n=10), placebo (n=10), e incondicionado (n=10). En el día 0, se instauró un protocolo de restricción de agua: el agua estuvo disponible solo durante 30 minutos por la mañana (de 11:00 a 11:30 horas) y durante 30 minutos por la tarde (de 17:30 a 18:00 horas). Se midió el consumo de agua durante tres días (línea base); después, el agua estuvo disponible ad libitum hasta el día anterior al condicionamiento. La fase de condicionamiento duró dos días: en el primer día, los ratones del grupo no contingente bebieron una disolución de sacarina al 0,15% (peso/volumen), mientras que los demás ratones bebieron agua; en el segundo día de condicionamiento, los ratones de los grupos condicionado y placebo bebieron sacarina al 0,15%, mientras que los ratones de los grupos no contingente e incondicionado bebieron agua. A los 30 minutos después de beber, los ratones de los grupos condicionado y no contingente fueron inyectados intraperitonealmente (ip.) con ciclofosfamida, 250 mg/kg, mientras que los otros ratones recibieron una inyección ip. de suero fisiológico. A partir de entonces, el agua estuvo disponible ad libitum hasta el día anterior a la fase de prueba (día 13 después del segundo día de condicionamiento). La fase de prueba duró dos días: en el primer día, se inmunizaron todos los ratones con glóbulos rojos de rata ($1,1 \times 10^8$ por ratón, ip.) y, a los 15 minutos, los ratones de los grupos condicionado, no contingente, y placebo bebieron sacarina al 0,15% durante 30 minutos, mientras que los ratones del grupo incondicionado bebieron agua durante 30 minutos. A los 15 minutos del final de la bebida, los ratones del grupo incondicionado fueron inyectados ip. con ciclofosfamida, 250 mg/kg, y los ratones restantes fueron inyectados ip. con suero fisiológico. En el segundo día de la fase de prueba (dos días después de la inmunización), los ratones del grupo incondicionado bebieron agua durante 30 min, mientras que el resto de los ratones bebió sacarina al 0,15%; a continuación, todos los ratones fueron inyectados ip. con suero fisiológico. El agua de bebida estuvo disponible ad libitum durante el resto del experimento. El nivel de anticuerpos de clase IgM anti-glóbulos rojos de rata se midió a los 6 días de la inmunización. La bebida de sacarina tuvo lugar por la mañana. La tabla 1 (ver página siguiente) resume este protocolo.

Cuando se utilizó la dosis de ciclofosfamida de 50 mg/kg, el protocolo fue análogo al protocolo descrito, con la diferencia de que el intervalo entre el final del condicionamiento y la inmunización fue de 4 días (en vez de 14 días). La do-

sis de glóbulos rojos inyectada fue de $1,71 \times 10^8$ por ratón. El número de ratones en cada grupo fue: condicionado ($n=16$), no contingente ($n=14$), y placebo ($n=15$).

El consumo de líquido se midió como la diferencia de peso de la botella antes y después de la bebida.

TABLA 1. PROTOCOLO DE CONDICIONAMIENTO Y PRUEBA

Grupo	Basal	Condicionamiento			Immunización y 1er día de prueba	2o día de prueba
	Días 1-3	Día 7	Día 8	Días 9-21 (*)	Día 22	Día 24
condicionado	agua	agua	sac-ciclo	agua	eritrocitos-sac-salino	sac-sal
no contingente	agua	sac	agua-ciclo	agua	eritrocitos-sac-salino	sac-sal
placebo	agua	agua	sac-sal	agua	eritrocitos-sac-salino	sac-sal
incondicionado	agua	agua	agua-sal	agua	eritrocitos-agua-ciclo	agua-sal

(*) Para ciclofosfamida, 50 mg/kg, el intervalo entre el condicionamiento y la inmunización es de 4 días, la inmunización ocurre al día 12, y el segundo día de prueba es el día 14.

Sal: suero fisiológico. Sac: sacarina al 0.15% (peso: volumen). Eritrocitos: glóbulos rojos de rata, ip., $1,1 \times 10^8$ por ratón, si la dosis de ciclofosfamida es 250 mg/kg, o $1,7 \times 10^8$ por ratón si la dosis de ciclofosfamida es 50 mg/kg. Ciclo: ciclofosfamida, 50 o 250 mg/kg, ip.

Tratamiento estadístico

Cada experimento se analizó mediante un análisis de la varianza que incluyó los grupos condicionado, no contingente, y placebo. [Se excluyó el grupo incondicionado porque su desviación típica era muy pequeña y hacía la prueba de homocedasticidad significativa (pruebas de Cochran y Hartley; $p < 0.01$)]. Tras el análisis de la varianza, se llevaron a cabo los contrastes siguientes:

1. Cuando la variable dependiente era disolución de sacarina consumida en el día de la inmunización, el contraste fue "grupo no contingente menos grupo placebo" (este contraste estima la magnitud del condicionamiento de aversión al sabor).

2. Cuando la variable dependiente era anticuerpos anti-glóbulos rojos de rata, el contraste era "grupo placebo menos grupo no contingente" (este contraste estima la magnitud del efecto residual de la ciclofosfamida).

3. Cuando la variable dependiente era anticuerpos anti-glóbulos rojos de rata, el contraste era "grupo no contingente menos grupo condicionado" (este contraste estima la magnitud del condicionamiento de la respuesta inmune).

Cada contraste se indica como la diferencia de las medias \pm su error típico y, en corchetes, su intervalo de confianza del 95%.

Como tamaño del efecto estandarizado se utilizó el índice d de Cohen (Kline, 2004; Rosenthal y Rubin, 1982).

Se utilizó el paquete estadístico Statistica, versión 6.0 (Statsoft, Tulsa, Oklahoma).

Resultados

Experimento con ciclofosfamida a 250 mg/kg

Los objetivos de este experimento fueron i) comprobar si una dosis alta de ciclofosfamida (250 mg/kg) era inmunosupresora 14 días después de su administración (efecto residual), y ii) si la exposición a la sacarina 14 días tras el emparejamiento sacarina-ciclofosfamida evocaba un descenso de la respuesta de anticuerpos.

El primer objetivo (efecto residual) se comprobó mediante el contraste "nivel de anticuerpos del grupo placebo - nivel de anticuerpos del grupo no contingente" (figura 1B): el contraste (media \pm error típico [intervalo de confianza del 95%]) es $0,52 \pm 0,25$ [0,02; 1,03]; este contraste es estadísticamente significativo $t(29)=2,13$; $p=0,04$. El tamaño del efecto estandarizado es (d de Cohen \pm error típico [intervalo de confianza del 95%]) $0,91 \pm 0,47$ [0,00; 1,84]. Por tanto, se detecta un efecto residual de la ciclofosfamida.

El segundo objetivo (evocación de la respuesta de anticuerpos condicionada) se comprobó mediante el contraste "nivel de anticuerpos del grupo no contingente - nivel de anticuerpos del grupo condicionado" (figura 1B): el contraste es $-0,04 \pm 0,23$ [-0,52; 0,44]. La magnitud de este contraste es muy pequeña y no es estadísticamente significativa ($p=0,87$); por tanto, no hay evidencia de que se haya evocado la respuesta condicionada.

El emparejamiento de la ciclofosfamida con el sabor de sacarina generó aversión al sabor: el contraste "cantidad de sacarina consumida en el día de la inmunización por el grupo no contingente - cantidad de sacarina consumida en el día de la inmunización por el grupo condicionado" (figura 1A) es $1,57 \pm 0,21$ [1,14; 2,00]; este contraste es estadísticamente significativo $t(29)=7,45$; $p<0,000001$. El tamaño del efecto estandarizado (índice d de Cohen) es $3,27 \pm 0,67$ [1,96; 4,59].

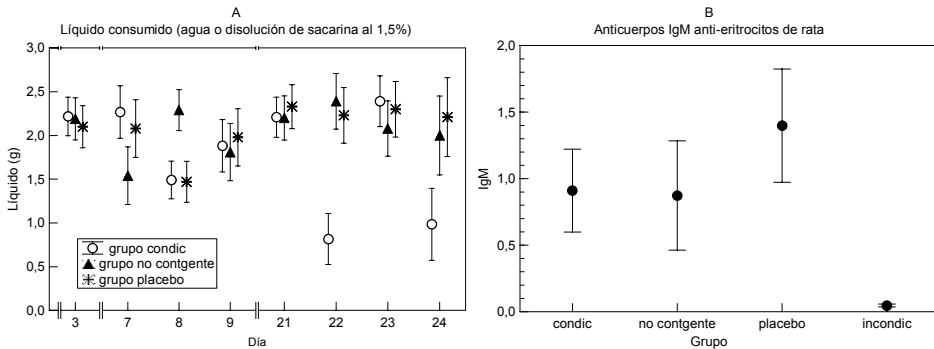


Figura 1. Experimento con ciclofosfamida a 250 mg/kg. El condicionamiento ocurrió en los días 7 y 8, la inmunización (con $1,1 \times 10^8$ eritrocitos de rata por ratón) en el día 22, y la prueba de aversión al sabor en los días 22 y 24. Líquido consumido en la prueba de aversión al sabor: sacarina al 0,15%. La medida del nivel de anticuerpos se hizo a los 6 días de la inmunización. Las barras de error son intervalos de confianza del 95%. Número de ratones: n (condicionado) = 12, n (no contingente) = 10, n (placebo) = 10, n (incondicionado) = 10.

Experimento con ciclofosfamida a 50 mg/kg

Los objetivos de este experimento son los mismos objetivos del experimento con la dosis de 250 mg/kg de ciclofosfamida. No se detecta efecto residual de la ciclofosfamida porque el nivel medio de anticuerpos del grupo placebo es inferior o igual al nivel medio del grupo no contingente (figura 2B): si hubiera efecto residual, el nivel de anticuerpos del grupo placebo sería mayor. En cuanto al segundo objetivo (evocación de la respuesta de anticuerpos condicionada), el contraste "nivel de anticuerpos del grupo no contingente - nivel de anticuerpos del grupo condicionado" es $0,82 \pm 0,49$ [-0,19; 1,82]; este contraste no alcanza significación estadística $t(28)=1,67$; $p=0,11$. El tamaño del efecto estandarizado (índice d de Cohen) es $0,61 \pm 0,37$ [-0,12; 1,34]. Por tanto, el nivel de anticuerpos del grupo no contingente puede ser mayor, igual, o menor que el nivel del grupo condicionado; así pues, los datos no aportan evidencia de que se haya evocado una respuesta condicionada inmunosupresora.

La figura 2B no muestra el efecto inmunosupresor de una inyección de 50 mg/kg de ciclofosfamida (respuesta incondicionada). Esto se comprobó en un experimento adicional: un grupo de 5 ratones recibió una inyección ip. de ciclofosfamida (50 mg/kg) y otro grupo de 6 ratones fue inyectado ip. con suero fisiológico. Se inmunizaron todos los ratones con $1,5 \times 10^8$ glóbulos rojos de rata. A los 6 días de la inmunización, los niveles de anticuerpos de ambos grupos (media \pm error típico) fueron: grupo control: $1,72 \pm 0,44$; grupo ciclofosfamida: $0,45 \pm 0,17$. La diferencia es $1,27 \pm 0,51$ [0,11; 2,41], y es estadísticamente significativa

$t(9)=2,49$; $p=0,034$. Por tanto, una inyección de 50 mg/kg de ciclofosfamida reduce la respuesta de anticuerpos.

El emparejamiento de la ciclofosfamida con el sabor de sacarina generó aversión al sabor: el contraste "cantidad de sacarina consumida en el día de la inmunización por el grupo no contingente - cantidad de sacarina consumida en el día de la inmunización por el grupo condicionado" (figura 2A) es $1,09 \pm 0,20$ [0,69; 1,49]; este contraste es estadísticamente significativo $t(42)=5,50$; $p=0,000002$. El tamaño del efecto estandarizado (índice d de Cohen) es $2,16 \pm 0,47$ [1,25; 3,08].

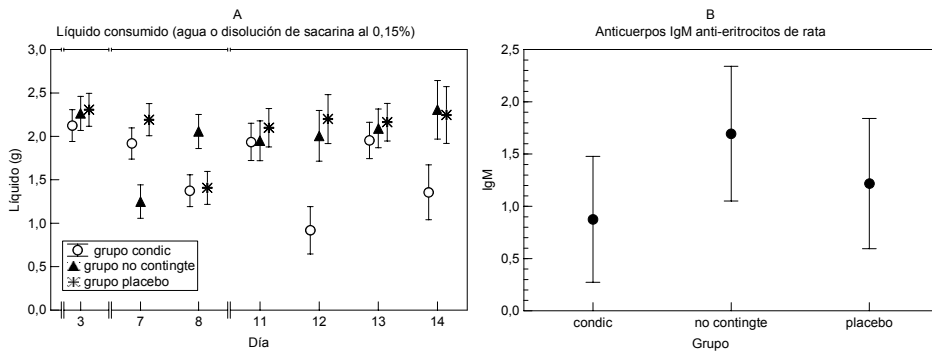


Figura 2. Experimento con ciclofosfamida a 50 mg/kg. El condicionamiento ocurrió en los días 7 y 8, la inmunización (con $1,7 \times 10^8$ eritrocitos de rata por ratón) en el día 12, y la prueba de aversión al sabor en los días 12 y 14. Líquido consumido en la prueba de aversión al sabor: sacarina al 0,15%. La medida del nivel de anticuerpos se hizo a los 6 días de la inmunización. Las barras de error son intervalos de confianza del 95%. Número de ratones: n (condicionado) = 16, n (no contingente) = 14, n (placebo) = 15.

Discusión

En el caso del condicionamiento clásico de la respuesta inmune, cuando se utiliza la ciclofosfamida como estímulo incondicionado, se ha propuesto que la exposición al estímulo condicionado desencadena la respuesta condicionada mientras dura el efecto de la ciclofosfamida (Klosterhalfen y Klosterhalfen, 1987; Kusnecov *et al.*, 1988; Neveu *et al.*, 1987). Esta hipótesis puede comprobarse de dos formas: i) extender el tiempo entre las fases de condicionamiento y de prueba, a fin de que se desvanezca el efecto de la ciclofosfamida (Klosterhalfen y Klosterhalfen, 1987; Kusnecov *et al.*, 1988), o ii) utilizar una dosis baja de ciclofosfamida, a fin de que su efecto desaparezca pronto (Neveu *et al.*, 1987). En esta investigación se ha utilizado el segundo procedimiento, pero los resultados no

confirman la necesidad del efecto residual de la ciclofosfamida, ya que una dosis de 250 mg/kg mantiene un efecto residual inmunosupresor a los 14 días de su aplicación (Resultados y figura 1B, grupos placebo *vs.* no contingente), pero no se aprecia una respuesta condicionada inmunosupresora (Resultados y figura 1B, grupos condicionado *vs.* no contingente).

Hay evidencia indirecta de que el efecto residual de la ciclofosfamida no parece necesario para que el estímulo condicionado evoque la respuesta inmune condicionada:

1. La evocación de la respuesta inmunosupresora condicionada ocurre en ausencia del efecto residual de la ciclofosfamida (Bovbjerg, Ader y Cohen, 1982; McCoy, Roszman, Miller, Kelley y Titus, 1986; Morato, Gerbase-DeLima y Gorczynski, 1997).

2. La respuesta inmunosupresora condicionada no se evoca en presencia del efecto residual de la ciclofosfamida (Schulze, Benson, Paule y Roberts, 1988).

3. En presencia del efecto residual de la ciclofosfamida, el estímulo condicionado evoca una respuesta inmune condicionada compensatoria (la respuesta del grupo condicionado es mayor que la respuesta del grupo no contingente) (MacQueen, Siegel, y Landry, 1990).

4. La generación por el estímulo condicionado de una respuesta inmune alterada, solo mientras dura el efecto del estímulo incondicionado, no tiene valor adaptativo.

Los resultados de este artículo difieren en un aspecto de la mayoría de los resultados publicados: el emparejamiento del sabor de sacarina con ciclofosfamida, a 50 o 250 mg/kg, no ha producido descenso condicionado de la respuesta de anticuerpos (figuras 1B y 2B: grupos condicionado *vs.* no contingente; Resultados). Aunque estos son resultados negativos, hay que tener en cuenta lo siguiente:

1. El estímulo incondicionado y la respuesta incondicionada están presentes, porque la ciclofosfamida *per se* disminuye la respuesta de anticuerpos (grupos placebo *vs.* incondicionado en la figura 1B, y efecto de una dosis de 50 mg/kg en Resultados).

2. Ambas dosis de ciclofosfamida han originado aversión condicionada al sabor (grupos no contingente *vs.* condicionado al día 22, figura 1A, o al día 12, figura 2A).

Por tanto, parece que la incapacidad de la sacarina para disminuir la producción de anticuerpos en ratones condicionados es real. De hecho, el autor de este artículo no ha podido alterar la respuesta de anticuerpos por condicionamiento clásico (Vidal y Chamizo, 2009): en ese artículo, se describen varios intentos de alterar la respuesta de anticuerpos por condicionamiento; en cada intento, la dife-

rencia entre la respuesta del grupo condicionado y la del grupo no contingente oscila alrededor de cero, es pequeña, y no alcanza significación estadística; por tanto, la media ponderada de las diferencias es próxima a cero.

El autor de este artículo no tiene una explicación clara de por qué la alteración de la respuesta de anticuerpos por condicionamiento clásico es irreproducible. Dos razones posibles podrían ser las siguientes:

1. El ratón no asocia el sabor de la sacarina con el descenso de la inmunidad (Vidal, 2011), por lo que no se produce condicionamiento inmunosupresor.
2. El descenso condicionado de la inmunidad sería contraproducente, ya que aumentaría la probabilidad de una infección (Hinson, 1985; Revusky, 1985).

REFERENCIAS

- Ader, R. y Cohen, N. (1975). Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosomatic Medicine*, 37, 333-340.
- Ader, R. y Cohen, N. (1991). The influence of conditioning on immune responses. In R. Ader, D.L. Felten, & N. Cohen (Eds.), *Psychoneuroimmunology* (2nd ed., pp. 609-640). New York: Academic Press.
- Ader, R. y Cohen, N. (1993). Psychoneuroimmunology: conditioning and stress. *Annual Review of Psychology*, 44, 53-85.
- Ader, R. y Cohen, N. (2001). Conditioning and immunity. In R. Ader, D.L. Felten, & N. Cohen (Eds.), *Psychoneuroimmunology* (vol. 2, third ed., pp. 3-34). New York: Academic Press.
- Bovbjerg, D., Ader, R., y Cohen, N. (1982). Behaviorally conditioned suppression of a graft-versus-host response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 79, 583-585.
- Elwing, H., Lange, S., y Nygren, H. (1980). Diffusion-in-gel enzyme-linked immunosorbent assay (DIG-ELISA): Optimal conditions for quantitation of antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 39, 247-256.
- Hinson, R.E. (1985). Conditioned immunosuppression and the adaptive function of Pavlovian conditioning. *Behavioral and Brain Sciences*, 8, 403.
- Kerckhaert, J.A., Hofhuis, F.M., y Willers, J.M. (1977). Effects of variation in time and dose of cyclophosphamide injection on delayed hypersensitivity and antibody formation. *Cellular Immunology*, 29, 232-237.
- Kline, R.B. (2004). *Beyond significance testing. Reforming data analysis methods in behavioral research*. Washington, DC: American Psychological Association.
- Klosterhalfen, S. y Klosterhalfen, W. (1987). Classically conditioned effects of cyclophosphamide on white blood cell counts in rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 496, 569-577.
- Kusnecov, A.W., Husband, A.J., y King, M.G. (1988). Behaviorally conditioned suppression of mitogen-induced proliferation and immunoglobulin production: effect of time span between conditioning and reexposure to the conditioning stimulus. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2, 198-211.
- MacQueen, G.M., Siegel, S., y Landry, J.O. (1990). Acquisition and extinction of conditional immunoenhancement following training with cyclophosphamide. *Psychobiology*, 18, 287-292.
- Many, A. y Schwartz, R. (1971). Periodicity during recovery of immune response after cyclophosphamide treatment. *Blood*, 37, 692-695.

- McCoy, D.F., Roszman, T.L., Miller, J.S., Kelly, K.S., y Titus, M.J. (1986). Some parameters of conditioned immunosuppression: Species difference and CS-US delay. *Physiology & Behavior*, 36, 731-736.
- Morato, E.F., Gerbase-DeLima, M. y Gorczynski, R.M. (1997). Conditioned immunosuppression of lipopolysaccharide-induced antibody response of orally immunized mice. *Brain, Behavior and Immunity*, 11, 133-139.
- Neveu, P.J., Crestani, F., y Le Moal, M. (1987). Conditioned Immunosuppression: A New Methodological Approach. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 496, 595-601.
- Revusky, S. (1985). Questions about conditioned immunosuppression and biological adaptation. *Behavioral and Brain Sciences*, 8, 407.
- Rosenthal, R. y Rubin, D.B. (1982). Comparing effect sizes of independent studies. *Psychological Bulletin*, 92, 500-504.
- Schulze, G.E., Benson, R.W., Paule, M.G., y Roberts, D.W. (1988). Behaviorally conditioned suppression of murine T-cell dependent but not T-cell independent antibody responses. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 30, 859-865.
- Vidal, J. (2002). Improvements to the enzyme-developed radial immunodiffusion technique. *Journal of Immunological Methods*, 270, 163-170.
- Vidal, J. (2011). Mice do not develop conditioned taste aversion because of immunity loss. *Neuroimmunomodulation*, 18, 191-197.
- Vidal, J. y Chamizo, V.D. (2009). Taste-aversion conditioning, but not immunosuppression conditioning, occurs under partial water deprivation. *Journal of General Psychology*, 136, 71-89.