



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales



**EFFECTO DE LA INMUNOTOLERANCIA A NEUROANTÍGENOS
SOBRE LA PRESERVACIÓN DE LA FUNCIÓN RETINIANA EN
RATAS CON LESIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO**

T E S I S

para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Ecología Integrativa

Presentada por

Bióloga Abril Dulce Serrato Vidal

Tutor de Tesis:

Dra. Esperanza Meléndez Herrera

Morelia, Michoacán noviembre del 2019.

In loving memory of Beta

AGRADECIMIENTOS

A Dios por poner en mi camino a las personas indicadas.

A la Coordinación de la Investigación Científica (CIC-UMSNH) por colaborar en el financiamiento del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT EMH No. 180762 y ALFF No . 258747) por el financiamiento del presente trabajo y por la beca otorgada.

A mi directora de tesis D. en C. Esperanza Meléndez por todo su tiempo, inconmensurable paciencia y apoyo durante este proyecto y sobre todo por creer en mí hasta el último instante.

A la D. en C. Stéphanie C. Thébault, Investigadora en el Instituto de Neurobiología campus UNAM Juriquilla, Querétaro y a su estudiante de doctorado, Ramsés Noguez por compartir su amplio conocimiento, tiempo y consejos así como apoyo técnico en la realización del experimento de electroretinografía en roedores. Su ayuda fue vital e invaluable para este proyecto.

A la M. V. Z. Madeleine Hernández encargada del Bioterio del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB-UMSNH) y al señor Efraín, por su asesoría y apoyo en el cuidado y manipulación de los animales de laboratorio.

A la oftalmóloga Laura Vega Parrales por su amabilidad y apoyo técnico en la revisión de fondos de ojo.

Al D. en C. Romeo Saldaña por tantas horas de asesoría en línea y presenciales, por su infinita paciencia y consejos.

A la D. en C. Naima Lajud y la D. en C Luz Torner por permitirme trabajar en las instalaciones del CIBIMI y brindarme apoyo técnico.

A las secretarias (Paty, Ceci, Karlita, Lydia, Lupita, Lolita) y trabajadores del INIRENA que nos apoyan tanto con exámenes, equipo e instalaciones.

A Edel por su apoyo en el cuidado de las ratas en bioterio y por su amistad.

A mis apoyos de servicio social Jenny, Jafed y Susy. Jenny seguramente llegarás tan lejos como te lo propongas.

A mis amigos- compañeros de laboratorio y proyecto de investigación: Lorena, Diana, Migue, Jony, Beto, Edgar, Víctor, que me auxiliaron con los experimentos y conocimientos. A ustedes que caminaron esta travesía conmigo, gracias infinitas por su apoyo y sobre todo por su amistad, sin ustedes no lo hubiera logrado. Lore eres una investigadora fantástica, te admiro y agradezco tanto tu ayuda como tu invaluable amistad. Diana estoy segura que llegarás muy alto, tienes mucho potencial y habilidades para realizar lo que desees. Migue me divertí mucho tomando fotos de fondo de ojo y haciendo experimentos en Querétaro contigo y Beto además de hacer el trabajo más fácil. Edgar y Víctor, gracias por hacerme reír tanto. Beto jamás te olvidaré, aprendí mucho de ti y tu forma tan peculiar de vivir la vida, me hubiera encantado que estuvieses hoy aquí conmigo compartiendo este logro; sé que donde sea que estés, seguramente te alegras por mí.

A mis preciadas y muy amadas Cynthys, gracias por ser mi sostén y motivarme a seguir adelante con tanto amor.

A Elesban que a pesar de estar tan lejos, siempre estuviste muy cerca, escuchándome y brindándome consejos y cariño. Seguramente reprobaras el diseño de esta tesis.

A Yorche y Manuel por creer en mí siempre, escucharme, motivarme, aconsejarme y ser un pilar fundamental en mi vida. Yorche espérame en playa del Carmen. Manuel ¡te gane!

A Juan Pablo – Keeper, gracias por el apoyo con la estancia en Querétaro, leer siempre mis problemas con una actitud positiva y contagiosa además de brindarme tu linda amistad.

A Toriz por ser un soporte que no imaginaba, no solo con conocimientos clínicos para analizar mis datos pero con motivación, amistad y risas.

A Charles N, por siempre motivarme y ayudarme con los fondos de ojo (for always motivating me and helping me analysing some eye fundus, you've been a great friend and support).

A Mayda por la sorpresa de reencontrarnos en Querétaro, compartir tu hogar, conocimientos y amistad.

A mis amigos del Inirena y de la vida que me han brindado su amistad y ánimo: Fanny, Claudia, Lily, Arturo, Martita, Sara, Xochitl, Ricardo, Yuni, Isma, Fran, Saúl, Betza, Ciro, Kiki.

A Tzady, Evelyn y Nayeli por su comprensión y apoyo durante este proceso.

A todos ustedes que de alguna manera me han apoyado, motivado y escuchado quejar y reír sobre esta etapa académica, los amo.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
2. Antecedentes.....	4
2.1. Retina y nervio óptico.....	4
2.2. Modelo de lesión traumática.....	6
2.3. Papel de la inflamación en la fisiopatología de la lesión traumática del sistema nervioso central.....	6
2.4. Valoración de la función visual.....	7
2.5. Inmunotolerancia a neuroantígenos.....	9
3. Justificación.....	10
4. Hipótesis.....	11
5. Objetivo general.....	11
5.1. Objetivos particulares.....	11
6. Materiales y métodos.....	12
6.1. Animales.....	12
6.2. Diseño experimental.....	12
6.3. Inducción de ACAID vía inyección en la cámara anterior del ojo.....	13
6.4. Evaluación de la inducción de inmunotolerancia.....	14
6.5. Lesión del nervio óptico.....	14
6.6. Evaluación de la función retiniana.....	15
6.7. Grosor retiniano.....	16
6.8. Valoración de fondo de ojo.....	18
6.9. Análisis estadístico.....	19
7. Resultados.....	20
8. Discusión.....	25
9. Conclusión.....	29
Apéndice A.....	30
Apéndice B.....	31
Apéndice C.....	32
Bibliografía.....	33

RESUMEN

Las lesiones traumáticas oculares inhabilitan a más de 30 millones de personas y existe un sinnúmero de propuestas de tratamientos neuroprotectores después de dichas lesiones en modelos de lesión de nervio óptico. Sin embargo, realmente pocos tratamientos llegan a la práctica clínica. Recientemente nuestro grupo de trabajo ha evaluado el efecto de la inducción de inmunotolerancia a AgN vía ACAID (desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del ojo, por sus siglas en inglés: Anterior Chamber-Associated Immune Deviation, desviación inmunitaria) sobre la supervivencia de las células ganglionares de la retina (CGR) y la preservación de la estructura tisular en el sitio del daño en un modelo de lesión del nervio óptico utilizando estrategias celulares y moleculares. Estos estudios han mostrado que la inmunotolerancia a AgN vía ACAID favorece la supervivencia de las CGR 7 y 14 días post-lesión, preserva la estructura tisular en el nervio óptico y promueve un ambiente anti-inflamatorio en etapas tempranas después de la lesión. En este contexto, el presente proyecto tiene como objetivo evaluar el impacto de la inmunotolerancia a AgN sobre la función visual en ratas a los 7, 14 y 21 días post-lesión del nervio óptico. Los resultados obtenidos de las pruebas de electroretinografía, fondo de ojo, grosor retiniano y valoraciones cualitativas del tejido a nivel histológico no muestran diferencias significativas entre el grupo vehículo y el tratamiento con AgN. Estos resultados sugieren que la inmunotolerancia a AgN es capaz de preservar la supervivencia de las CGR en etapas tempranas después de la lesión pero no logra evitar su muerte. Estudios subsecuentes deberán evaluar el potencial preventivo o terapéutico de la inmunotolerancia a AgN en otros modelos de lesión.

Palabras Clave:

Lesión del nervio óptico

ACAID

Neuroprotección

Evaluación funcional Visual

CGR

ABSTRACT

Ocular traumatic injuries disable more than 30 million people and there are countless studies that propose neuroprotective treatments after a these injuries, based on models of optic nerve injury, nevertheless very few of these studies reach clinical trials. Recently, our research group assessed the AgN immunotolerance through ACAID (Anterior Chamber-Associated Immune Deviation) effect over the survival of retinal ganglion cells of the retina (RGC) and preservation of tissue structure in the injured site based on a model of optic nerve injury using molecular and cellular strategies of assessment. These studies demonstrated that the AgN immunotolerance through ACAID boosts the survival of RGC at 7, 14 and 21 days post optic nerve injury. Within this context, the current project has the objective to assess the impact of AgN immunotolerance over the visual function of rats at 7,14 and 21 days post optic nerve injury. The results obtained from the tests of electroretinography, eye fundus, retinal thickness and qualitative assessment of histological tissue don't demonstrate significant differences between the vehicle and AgN treatment groups. These results suggest that the AgN immunotolerance is able to preserve the survival of RGC in early stages after injury but it doesn't avoid their death. Subsequent studies shall assess the AgN immunotolerance preventive or therapeutic real potential in different injury models.

Keywords:

Optic nerve injury

ACAID

Neuroprotection

Visual function assessment

RGC

1. INTRODUCCIÓN

Más de 30 millones de personas padecen ceguera a nivel mundial. De estas, alrededor del 10% corresponden a alteraciones en el nervio óptico y retina, siendo el glaucoma el problema líder seguido de las neuropatías traumáticas y compresivas (American Academy of Ophthalmology, 2014).

La cintilla óptica o nervio óptico, forma parte del sistema nervioso central (SNC), por ende, al sufrir algún daño o traumatismo cursa con un cuadro inflamatorio crónico que evita que los axones de las células ganglionares de la retina (CGR) puedan restablecer su función. Esta respuesta poco eficiente para responder contra el daño es orquestada por el sistema inmunológico, el cual además de evitar los procesos reparativos, desencadena rondas de inflamación que extienden el daño hacia regiones sanas no afectadas por la lesión inicial (degeneración secundaria. Yoles 1998).

A pesar de que la inflamación es un mecanismo homeostático orientado a contener el daño y favorecer la reparación tisular; cuando ésta no se resuelve eficientemente suele desarrollarse una patología autoinmune (Schwab 2014, Li 2015) y desencadenar procesos degenerativos que conducen al incremento en la muerte celular (Li 2015, Zhang 2004). Una estrategia que previene la degeneración secundaria desencadenada después de una lesión traumática al SNC es la inducción de inmunotolerancia a antígenos neurales (AgN) Recientemente nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la inmunotolerancia a AgN favorece la supervivencia de las CGR y preserva la mielina del nervio óptico cuando se induce previo a una lesión por compresión en esta última estructura. En ambos casos el efecto está acompañado de una disminución en la expresión del mRNA de mediadores inflamatorios y un incremento en la expresión del mRNA de citocinas anti-inflamatorias (Martínez-Alcantar 2019).

En un intento por determinar si el efecto neuroprotector se mantiene a lo largo del tiempo y mantiene la funcionalidad visual, el presente trabajo evaluó la respuesta de la retina a los 7, 14 y 21 días después de la lesión del nervio óptico mediante evaluaciones funcionales: electroretinograma (ERG) (Brandli & Stone 2015), fondo de ojo (Allen 2015), medición de grosor retiniano y valoración histológica (Zhikuan 1999, Werther 2017). Las retinas se procesaron con el fin de valorar la correlación entre la preservación tisular y funcional.

2. ANTECEDENTES

A nivel mundial 32.4 millones de personas padecen ceguera. Tan solo en América latina y el Caribe, existen alrededor de 2.3 millones de personas con problemas de visión. De estas, el 8% corresponden a alteraciones en el nervio óptico y retina, siendo el glaucoma el problema líder seguido de las neuropatías traumáticas y compresivas (American Academy of Ophthalmology, 2014). El glaucoma es un conjunto de enfermedades degenerativas relacionadas con el daño al nervio óptico y generalmente asociadas a un incremento en la presión intraocular (National Eye Institute, 2016). Se considera que en el año 2020 el número de personas afectadas por glaucoma a nivel mundial alcanzará los 79.6 millones (Azcona-Cruz 2015).

Se estima que la neuropatía óptica traumática ocurre entre el 0.7-5% de todos los casos con trauma craneal y afecta mayoritariamente a los adultos jóvenes del sexo masculino (85%) de entre 18 y 34 años (Lima-Gómez 2001, Guerra-García *et al.* 2012). Por su parte, las lesiones traumáticas capaces de dañar al nervio óptico incluyen tumoraciones como: meningiomas (tumor más frecuente en adultos), gliomas del nervio óptico (más frecuentes en pacientes con neurofibromatosis), adenomas hipofisarios, craneofaringiomas, lesiones infiltrativas, aneurismas carotídeos, mucocelos, abscesos pituitarios, aracnoiditisquiasmática y procesos compresivos orbitarios como la oftalmopatía tiroidea (incidencia de 13.9 casos por cada 100 000 habitantes por año en Estados Unidos con predominio en el sexo femenino. Pérez-Moreiras 2003). Algunos tumores son de etiología congénita, como el 50% de los retinoblastomas, los cuales se transmiten de una generación a otra y afectan a 1 de cada 15,000 recién nacidos (Gutiérrez-Ortiz 2010).

2.1. Retina y nervio óptico

El ojo está conformado por tres áreas anatómicamente importantes que de afuera hacia adentro se nominan como; el área de soporte o esclerótica, el área vascular o coroides y el área nerviosa que se localiza íntimamente unida a la coroides. La retina es el componente nervioso del ojo compuesto por diez capas celulares localizadas en la capa más interna del ojo, cuya disposición está conformada de afuera hacia adentro de la siguiente manera (Figura 1): epitelio pigmentario de la retina (EPR) y su lámina basal donde podemos encontrar una capa muy delgada si la especie estudiada es albina, sobre esta capa encontramos la capa de fotorreceptores en donde encontramos los segmentos externos de conos y bastones, posteriormente se encuentra una capa delgada de fibras y tejido intersticial conocida como membrana limitante externa que está unida a la capa nuclear externa, la cual corresponde a los núcleos de los fotorreceptores, conos y bastones; unida a la capa plexiforme externa correspondiente a los segmentos internos de los fotorreceptores y a su sinapsis

con las neuronas integradoras; la capa siguiente es la nuclear interna donde se encuentran los núcleos de las neuronas integradoras: bipolares, amacrinas y horizontales. Esta capa se encuentra limitada por la capa plexiforme interna que corresponde a las sinapsis de las neuronas integradoras con las CGR (Células ganglionares de la retina) subsecuentemente encontraremos la capa de CGR conformada por el cuerpo de las neuronas que originan el nervio óptico, ésta se continúa con la capa de fibras nerviosas formada por los axones de las CGR y por último encontramos la membrana limitante interna que se encuentra en contacto con el humor vítreo (Varón 2010, Geneser 2000).

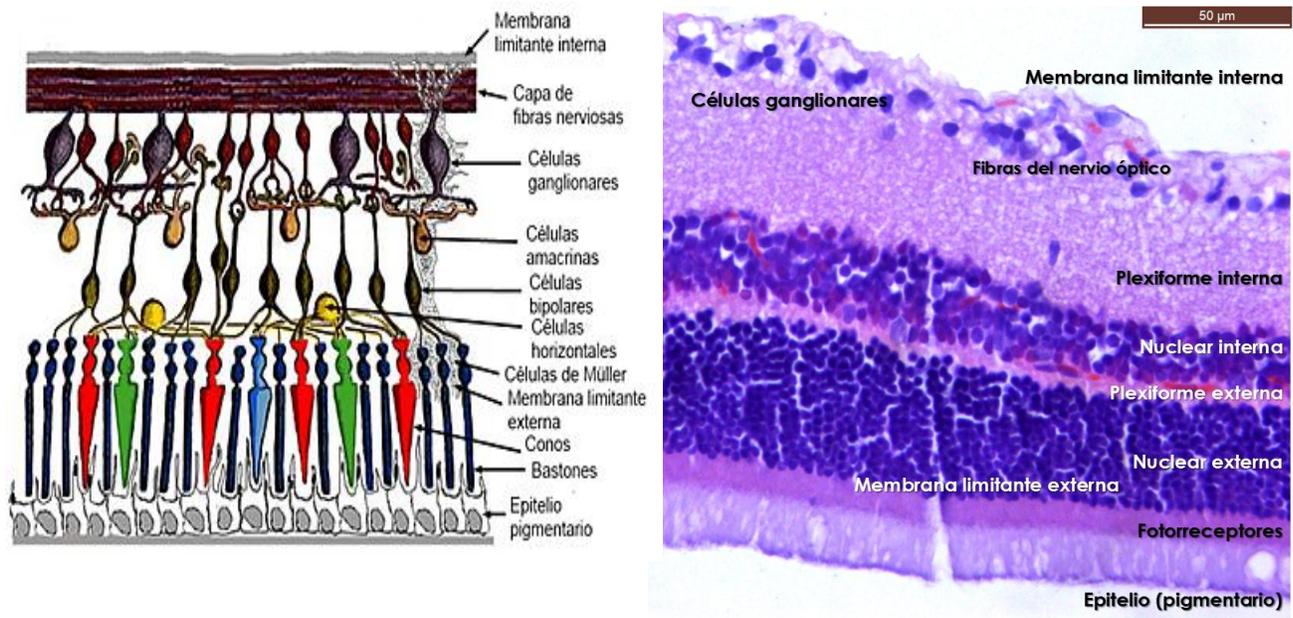


Figura 1. Esquema de las células que componen la retina (izquierda) y su correlación histológica teñida con hematoxilina y eosina (derecha). (<https://accessmedicina.mhmedical.com>, Serrato-Vidal 2018).

El nervio óptico es la estructura encargada de transmitir la información que recibe la retina hacia el cerebro. Esta estructura, al igual que cualquier región del SNC, es altamente susceptible al daño mecánico de origen traumático o asociado a enfermedades degenerativas. Una vez que es sometido a una lesión traumática o compresiva, echa a andar una serie de mecanismos degenerativos retrógrados (hacia los somas de las CGR que residen en la retina) y anterógrados (hacia los núcleos cerebrales donde se releva la información hacia la corteza visual) que conducen a la pérdida de la visión. Entre los factores que favorecen la degeneración de la vía visual y la consecuente pérdida de la comunicación entre la retina y los centros cerebrales de procesamiento visual están los procesos inflamatorios que se desencadenan en el sitio del daño (Kolb 2011, Geneser 2000).

2.2. Modelo de lesión traumática

El modelo de lesión por compresión del nervio óptico en roedores tiene como objetivo emular la patología humana (p. ej., neuropatía óptica compresiva y traumática). En este modelo, la degeneración retrógrada en el nervio óptico avanza rápidamente, tornándose evidente (*i.e.*, fibras axonales fragmentadas y con terminaciones bulbosas) un día después en la región proximal a la copa óptica. En esta región más de la mitad de los axones se han perdido o se encuentran en proceso de muerte a los 7 días post-lesión, y se vuelven casi inexistentes a las tres semanas (Qu & Jakobs 2013). Este proceso degenerativo es acompañado desde el día 3 post-lesión cuando se lleva a cabo la pérdida de las proteínas del citoesqueleto de los axones retinales, dicha degeneración se extiende poco a poco hasta los extremos distales del axón (Agudo-Barriuso *et al.* 2011). Por lo que respecta a las CGR, su desaparición comienza a ser evidente desde el tercer día post-lesión, alcanzando su máximo al día 7 y estabilizándose alrededor de las tres semanas posteriores a la lesión (Qu & Jakobs 2013). Dicha pérdida o daño de las CGR provoca una funcionalidad deficiente o nula (Farkas & Povlishock 2007), la cual es observable a través de distintos métodos de evaluación funcional, como se mencionará a continuación.

2.3. Papel de la inflamación en la fisiopatología de la lesión traumática del sistema nervioso central

El SNC de los mamíferos no se repara eficientemente después de una lesión (Nieto-Sampedro *et al.*, 2002). Ha sido demostrado que esta incapacidad para reparar no es un defecto inherente de las neuronas para volver a elongar sus procesos, sino principalmente debido a un ambiente poco permisivo para la reconexión axonal (Yoles & Schwartz 1998). Este ambiente es generado principalmente por la activación del sistema inmunológico en el sitio de lesión, el cual además de evitar los procesos reparativos, desencadena rondas de inflamación que extienden el daño hacia regiones sanas no afectadas por la lesión inicial (degeneración secundaria)(Schwartz 1998).

La inflamación es un mecanismo homeostático orientado a contener el daño y favorecer la reparación tisular; sin embargo, la inflamación crónica no controlada puede desencadenar una patología autoinmune (Schwab 2014). En el SNC esta patología autoinmune comienza poco tiempo después de la lesión, cuando la microglía residente del SNC secreta quimiocinas que atraen a poblaciones de macrófagos derivados de monocitos circulantes y juntas, ambas poblaciones comienzan a fagocitar restos celulares (Toscano-Tejeida *et al.* 2016). Debido a su incapacidad para remover eficientemente los restos celulares, ambas poblaciones reclutan a linfocitos circulantes, los cuales son instruídos para producir linfocitos T efectores (secretores de citocinas pro y anti-

inflamatorias) y linfocitos B (productores de anticuerpos dirigidos contra componentes neuronales, principalmente).

2.4. Valoración de la función visual

La evaluación de la función de la retina y el nervio óptico es de vital importancia tanto para el diagnóstico de enfermedades visuales como para su tratamiento, debido a que nos permite conocer el grado de daño de las estructuras relacionadas con el adecuado funcionamiento visual.

Dentro de estas técnicas encontramos el fondo de ojo, una prueba básica de exploración física no invasiva de la porción postero-interior de la retina donde evaluamos el calibre, trayectoria y cantidad de los vasos sanguíneos que emergen radialmente desde el disco o papila óptica, el cual es la cabeza del nervio óptico. Los vasos sanguíneos son de 5-6 venas de calibre más grueso en comparación con las 5-7 arterias más delgadas en calibre (Fukuda 1977). Por último evaluamos también, el lecho vascular de la retina de color rosado con capilares en él (figura 2). Esta prueba nos permite identificar algunas de las anomalías o patologías del ojo que puedan afectar su adecuado funcionamiento al observar engrosamiento o adelgazamiento de los vasos sanguíneos, manchas o blanquecimiento del lecho vascular, excavación o edema del disco óptico que se traducen en daños que pueden ser irreversibles para la visión como son glaucoma, retinopatías y hasta ceguera (Lima-Gómez 2007).

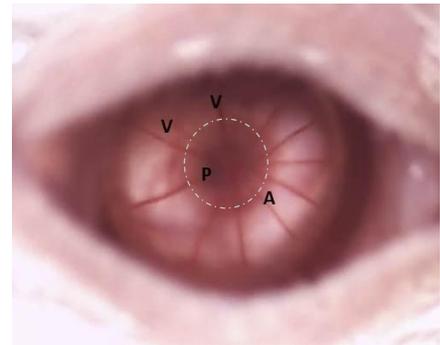


Figura 2. Fondo de ojo normal de rata. Polo posterior del ojo, donde se observa el lecho vascular rosado, los vasos sanguíneos (V: venas, A: arterias) y disco óptico o papila (círculo punteado) (Serrato-Vidal2017).

Otro estudio mínimamente invasivo muy utilizado para evaluar el estado funcional de las capas medias y externas de la retina es el electroretinograma (ERG) Este estudio es ampliamente utilizado para evaluar el daño en la retina causado por diversas etiologías como glaucoma, retinopatía diabética, catarata, maculopatías diversas, neuritis óptica desmielinizante y otras patologías del nervio óptico (Catalá & Castany 2005).

El ERG (Figura 3) consta de un conjunto de registros de impulsos bioeléctricos en un periodo de tiempo distintas o una misma intensidad que corresponden a los potenciales evocados por las distintas capas de la retina (Green 1973, Perlman 2007). Está compuesto por tres procesos o partes principales, PI, PII y PIII (Porciatti 2015). El proceso PI corresponde a la onda C que representa la despolarización del epitelio pigmentario; esta onda generalmente está ausente en los

organismos albinos. El proceso PII forma el cuerpo principal del ERG y es de gran importancia clínica para valorar la integridad funcional, ya que corresponde a la despolarización de las células bipolares, amacrinas y CGR (forma el pico de la onda-b. Perlman 2007). La onda B puede verse eliminada del ERG cuando el flujo sanguíneo se bloquea por medio de la arteria central retiniana. En condiciones de oscuridad está relacionada con la cantidad de rodopsina en la retina; esto se ve afectado si el pigmento blanquea o se tiene poco pigmento. El proceso PIII está conformado por la onda A y la despolarización de la glía de Müller (Kolb 2011).

La onda A corresponde a la respuesta de los fotorreceptores; en condiciones escotópicas o sin luz, refleja la acción de los bastones, mientras que en condiciones fotópicas refleja la acción de los conos. Esta onda se considera la suma del proceso PIII y PII, ya que desencadena este último dando lugar a la onda-b; si se saturan los bastones o la retina está anóxica por falta de flujo sanguíneo de la coroides, no se registra la onda-b (Kolb 2011, Perlman 2007, Green 1973).

Existen otros componentes menores no siempre evaluados en el ERG convencional, como una onda D que representa una onda corneal positiva seguida del proceso PIII; el potencial oscilatorio, el potencial receptor temprano (ERP, por sus siglas en inglés) la onda-M y la respuesta de umbral escotópica (STR). Esta última ha servido a para registrar las células de la capa más interna de la retina, las CGR y se ha mostrado que no existe diferencia significativa entre la respuesta de onda a y b en ratas albinas y pigmentadas (Alarcón-Martínez 2010).

En un ERG se evalúan y comparan las amplitudes de las ondas y el tiempo implícito de respuesta de las mismas bajo condiciones fotópicas (de luz) y escotópicas (de oscuridad).

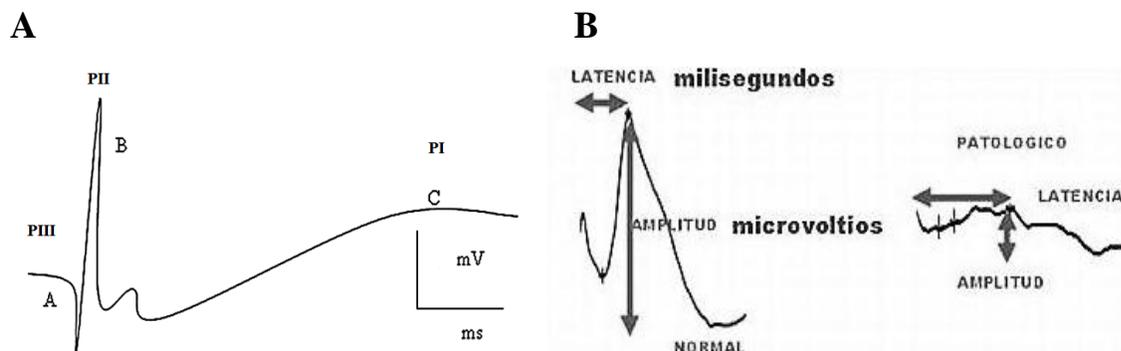


Figura 3. Ejemplos de respuestas obtenidas en el electro-retinograma. La figura A muestra los picos de las ondas principales en microvoltios por milisegundo. En B se muestra una onda normal en amplitud y latencia (tiempo implícito de respuesta) y una onda patológica (Perlman 2007).

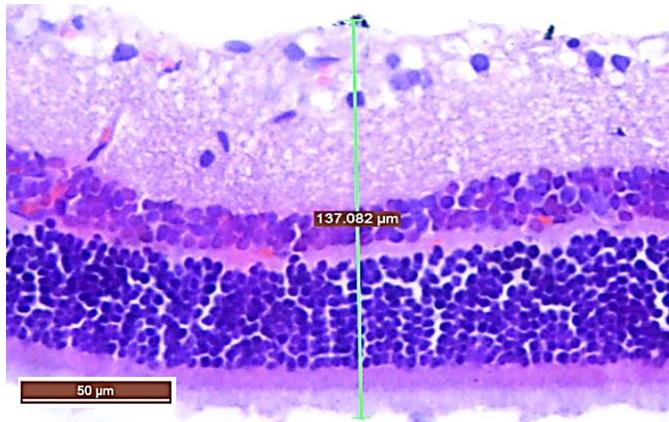


Figura 4. Grosor retiniano central de las 10 capas de la retina. (Serrato-Vidal 2018).

Otra técnica que permite observar, daño retiniano a nivel celular y funcional es la medición del grosor de la retina, el cual puede ser a nivel central a lo largo de las 10 capas (Figura 4), o solo el grosor de las capas nucleares interna y externa. A través de cortes histológicos de la retina podemos no solo evaluar el grosor de las capas retinianas sino también valorar de manera cualitativa con un acercamiento clínica, la organización de las diez capas y conexiones de las células de la

retina; así como el grado de daño degenerativo que pueda presentar la retina, por ejemplo un engrosamiento podría estar relacionado con oclusión vascular, uveítis, edema macular o catarata post-cirugía. Por el contrario, un adelgazamiento de estas capas celulares podría traducirse en glaucoma y otras enfermedades degenerativas del nervio óptico. (Zhikuan 1990, LaVail 1992).

2.5. Inmunotolerancia a neuroantígenos

La inducción de inmunotolerancia sistémica a través de desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del ojo (ACAID, por sus siglas en inglés) es una estrategia eficiente para modular al sistema inmunológico y evitar la inflamación (Cone 2009). La inducción de ACAID incrementa el número de linfocitos T reguladores, los cuales atenúan la respuesta de los linfocitos T helper, por lo que ante la segunda exposición al antígeno, el sistema inmunológico lo reconoce y no desarrolla una respuesta inflamatoria (Stein-Streilein & Taylor 2007). Una forma de valorar la inducción de ACAID es mediante la prueba de hipersensibilidad de tipo retrasado (DTH, por sus siglas en inglés), la cual es una respuesta mediada por linfocitos T helper y citocinas inflamatorias (Streilein 2003).

Recientemente nuestro grupo de investigación ha mostrado que la inducción de inmunotolerancia a AgN mediante ACAID preserva la supervivencia de las CGR y disminuye algunos signos de degeneración de la retina en ratas con lesión del nervio óptico (Pineda-Salazar 2017, Martínez-Alcantar 2019). La relevancia de este hallazgo aún no ha sido valorada sobre la función retiniana. Tampoco ha sido valorado si el número de CGR viables cuantificado a los siete días postlesión en este estudio se mantendrá a lo largo del tiempo o decrementará debido a degeneración secundaria. Por ello, el presente trabajo tiene como objetivo principal evaluar la función visual de la retina a los 7, 14 y 21 días después de la lesión del nervio óptico.

3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los múltiples esfuerzos realizados durante las últimas décadas en investigación neurobiológica, no existe un tratamiento capaz de permitir la reparación tisular y la consecuente recuperación de las funciones perdidas después de una lesión al nervio óptico. Esta escasez de alternativas terapéuticas se vuelve particularmente inquietante debido a la incidencia significativa que las neuropatías ópticas (p. ej., glaucoma, neuritis óptica y traumatismos por compresión) tienen en la población a nivel mundial (Gutiérrez-Ortiz 2010).

En un intento por evitar la degeneración secundaria asociada a lesiones del SNC, y particularmente a aquellas que afectan al nervio óptico y que causan la pérdida de las CGR y de la función visual, el presente trabajo evaluará el valor neuroprotector tisular y funcional de la inducción de inmunotolerancia a AgN hasta los 14 días después de la lesión del nervio óptico. Adicionalmente, con el fin de comparar la eficacia de la inmunotolerancia a AgN como estrategia neuroprotectora con otros tratamientos que evalúan la preservación funcional, una revisión sistemática de la literatura será llevada a cabo en forma de meta-análisis.

En conjunto, los resultados del presente trabajo permitirán determinar el valor potencial de la inmunotolerancia a AgN inducida mediante ACAID.

4. HIPÓTESIS

La inmunotolerancia a antígenos neurales preserva la función retiniana después de una lesión del nervio óptico.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la inmunotolerancia a antígenos neurales sobre la preservación de la función de la retina después de la lesión del nervio óptico.

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de la inmunotolerancia a antígenos neurales sobre la respuesta funcional de la retina en ratas con lesión del nervio óptico
2. Evaluar el efecto de la inmunotolerancia a antígenos neurales sobre la preservación tisular de la retina en ratas con lesión del nervio óptico.
3. Realizar un meta-análisis de la eficacia de los tratamientos neuroprotectores que evalúan la función visual después de una lesión del nervio óptico.

MATERIALES Y MÉTODOS

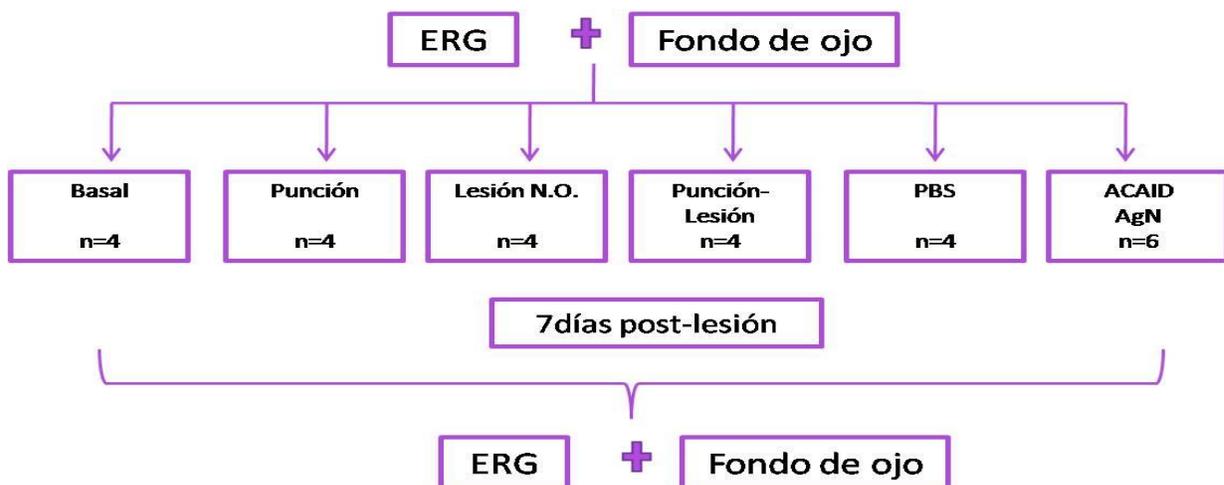
6.1. Animales

Cincuenta y ocho ratas hembras de la cepa Wistar, provenientes del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Juriquilla Querétaro (n=26) y del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH (n=30) fueron utilizadas en el presente trabajo. Los grupos fueron mantenidos en un ciclo luz-oscuridad (12-12) con acceso *ad libitum* a agua y alimento. El cuidado de los animales fue realizado por personal especializado de ambos bioterios. Para la realización del presente proyecto se siguieron los lineamientos establecidos por el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud (Título séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación).

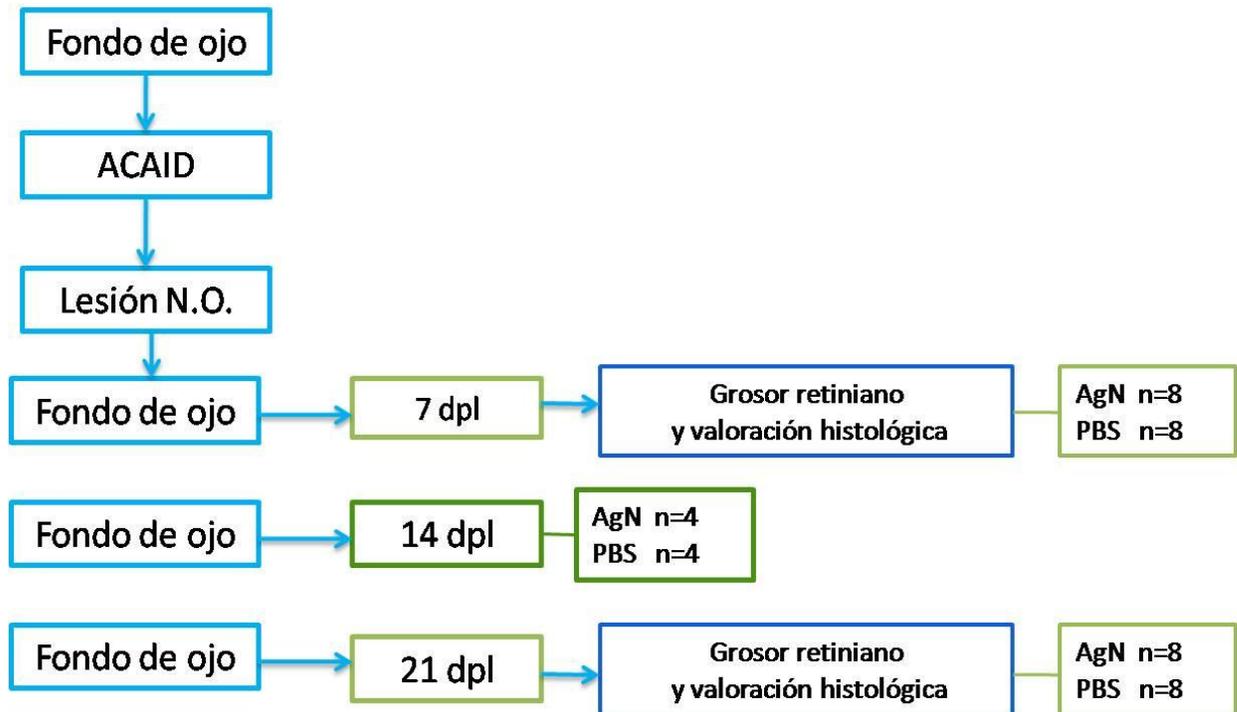
6.2. Diseño experimental

Los organismos de la evaluación electrofisiológica se dividieron en seis grupos experimentales(n=26)

Procedimiento	BASAL	PUNCIÓN	LESIÓN	PUNCIÓN-LESIÓN	PBS	AgN
PUNCIÓN en cámara anterior del ojo	x	✓	x	✓	✓	✓
INOCULACIÓN en cámara anterior del ojo	x	x	x	x	✓	✓
LESIÓN del nervio óptico	x	x	✓	✓	✓	✓



Los organismo de medición del grosor retiniano, valoración histológica cualitativa y fondo de ojo (n=32) fueron divididos en dos grupos: PBS y AgN, estos no fueron sometidos a ERG.



6.3. Inducción de ACAID vía inyección en la cámara anterior del ojo

Para llevar a cabo la inducción de inmunotolerancia, las ratas de los grupos PBS y AgN fueron inoculadas en la cámara anterior de ambos ojos con 10 μL de vehículo (buffer de fosfatos al 0.1 M) o AgN (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) bajo anestesia con un coctel de ketamina/xilacina (70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, respectivamente) vía intraperitoneal (i.p) en etapa juvenil. La inyección en la cámara anterior se realizó con una jeringa Hamilton, liberando el volumen total de la solución en un minuto bajo microscopio estereoscópico (Talavera-Carrillo 2015, Niederkorn & Kaplan 2007). Durante todo el procedimiento, los ojos de las ratas fueron hidratados con solución salina al 0.9% y posteriormente cubiertos con gasas húmedas.

6.4. Evaluación de la inducción de inmunotolerancia

Siete días posteriores a la inoculación y bajo anestesia ligera (ketamina/xilacina 35µg/kg y 3.5 µg/kg de peso corporal, respectivamente) se llevó a cabo una prueba de hipersensibilidad de tipo IV o tardía, en la cual un subgrupo de 10 organismos (5 vehículo y 5 AgN) elegidas al azar, fueron inyectadas intradérmicamente con 200 µl de AgN emulsionados 1:1 con adyuvante completo de Freund en la región interescapular previamente rasurada. Siete días después de la sensibilización, las ratas fueron retadas en oreja izquierda con 10µl de AgN (50µg/µl), mientras que en la oreja derecha se inoculó PBS. El grosor de las orejas fue medido con un micrómetro previo a la inoculación y a las 24 y 48 horas posteriores a la misma. El valor inicial fue considerado como línea base y la medida de inflamación fue calculada sustrayendo la línea base del valor obtenido por día (Δ de inflamación; Talavera-Carrillo 2015).

6.5. Lesión del nervio óptico

Para realizar la lesión del nervio óptico, treinta días después de la inoculación en el ojo, las ratas con un peso mínimo de 250 gramos fueron profundamente anestesiadas como se indicó previamente y sometidas a una cantotomía donde se expuso el nervio óptico del ojo izquierdo, mismo que fue comprimido durante 5 segundos con pinzas de auto-cierre a una distancia aproximada de 3mm desde la copa óptica como se observa en la figura 5 (Talavera-Carrillo 2017, Serrato-Vidal 2018; Sautter & Sabel 1993, Walsh *et al.* 2014). Los ojos lesionados fueron protegidos con lubricante (petrolato y aceite mineral) y ungüento antiséptico (neomicina y polimixina B). Durante los tres días subsecuentes a la lesión, las ratas recibieron una dosis diaria de analgésico oral (Tempra pediátrico 10 mg/kg).

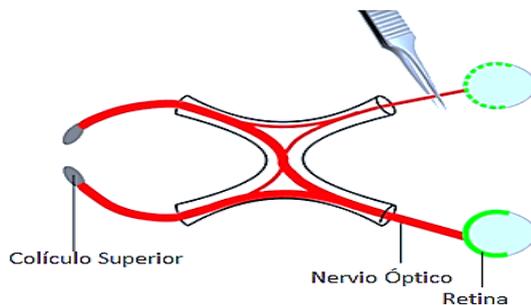


Figura 5. Representación esquemática de la lesión del nervio óptico. La imagen muestra la región donde se realiza la compresión del nervio óptico mediante pinzas de autocierre (Tang *et al.* 2011).

6.6. Evaluación de la función retiniana

La viabilidad de las CGR, así como la funcionalidad de la retina después de una lesión fue evaluada a través de un ERG en condiciones escotópicas y lumínicas siguiendo las normas de la Sociedad Internacional de Electrofisiología Clínica para la Visión (ISCEV, por sus siglas en inglés).

Este estudio consta de la suma de biopotenciales provocados en la retina por un estímulo luminoso de tipo flash (Paneca *et al.* 2005) y fue realizado en todos los animales previo a la primera manipulación (punción /inducción de inmunotolerancia) y previo al sacrificio a los 7 días. En cada sesión, los organismos fueron expuestos a 12 horas en condiciones de total ausencia de luz. Posteriormente, en estado de anestesia profunda (ketamina 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /xilacina 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, vía intramuscular en el músculo de una extremidad inferior) y bajo luz infra-roja se realizó la dilatación pupilar con dos gotas de (tropicamida-fenilefrina). Posteriormente el organismo fue conducido dentro de una caja cubierta a un cuarto oscuro de registro ERG donde recibió una dosis de anestesia conjuntival (paracaína al 2%) e hipromelosa como lubricante (Haberer 2009).

Los registros se realizaron colocando un electrodo con punta de plata previamente ionizado con una mezcla de cloro sobre la superficie de la córnea.

La estimulación retiniana se realizó con un fotoestimulador a una distancia de 5cm de la nariz de la rata, las estimulaciones en condiciones de luz (fotópica) fueron 0dB (2.45cd.s/m²) y +5dB (7.73cd.s/m²); en condiciones de oscuridad (escotópica) fueron 0dB (2.45cd.s/m²), -10dB (0.25cd.s/m²), -20dB (0.02cd.s/m²) y +5dB (7.73cd.s/m²). Los registros fueron obtenidos con el software LabChart7.0 en el departamento de neurociencias en la UNAM, Juriquilla Querétaro bajo



Figura 6. Esquema de un registro eléctrico desde el programa LabChart8 Reader 2018 donde se observa el inicio del impulso a 0mV seguido por la onda A negativa (morado) que continua con la onda B (verde) (Serrato-Vidal 2018).

la tutela de la doctora Stéphanie Thébault y el alumno de doctorado Ramsés Noguez.

Cada rata fue expuesta a los 6 estímulos lumínicos (fotópicos y escotópicos) por un lapso de un minuto; cada estímulo representa la respuesta de amplitud de onda A y B así como el tiempo implícito en que cada amplitud se lleva a cabo. Los 624 registros eléctricos, fueron procesados con el programa LabChart8 Reader 2018. Las mediciones extraídas se promediaron con el paquete Excel 2017.

6.7. Grosor retiniano

Los organismos fueron obtenidos del bioterio del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas ubicado en Ciudad Universitaria. Después de la inducción de ACAID y la lesión del nervio óptico, los globos oculares fueron disecados a los 7 y 21 días post lesión. El tejido fue fijado en PFA al 4%, deshidratado en etanol de concentraciones crecientes, incluido en parafina y seccionado en un micrótopo Zeiss. Se realizaron 10 laminillas con 15 cortes de 5µm por retina, orientadas antero-posteriormente y de nasal a temporal. Los cortes fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (H-E), bajo protocolos convencionales (Faktorovich 1992).

Se midió el grosor de la zona central de cada corte histológico utilizando un microscopio Leica a 4000x de aumento, desde el borde ciliar hasta el epitelio de las CGR (Figura 7). Adicionalmente, se realizaron valoraciones cualitativas con enfoque clínico de la preservación estructural de las capas retinianas, evaluando el grosor de las capa individualmente y en conjunto, el infiltrado celular y los espacios intersticiales con una categorización de 1 a 3 cruces, siendo 1 el valor asociado al mayor daño tisular y 3 el valor asociado a mejor preservación tisular (Figura 8).

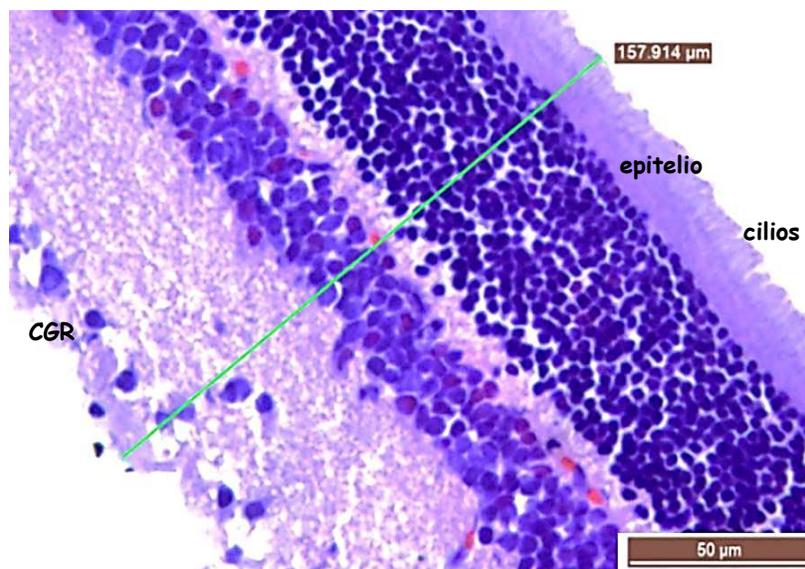


Figura 7. Corte histológico de retina representativo de la manera de medir el grosor de las diez capas retinianas, desde el borde del epitelio con borde ciliar hasta las proyecciones de matrix extracelular de las células ganglionares de la retina (CGR) a un aumento de 4000x. (Serrato-Vidal 2018).

Tabla 1. Escala de valoraciones categóricas de tres cruces del estado de preservación funcional a nivel histológico. (Serrato-Vidal 2018, Salas 2017, Gregg 2013, Bermejo-Pareja 2008, Zhikuan 1999)

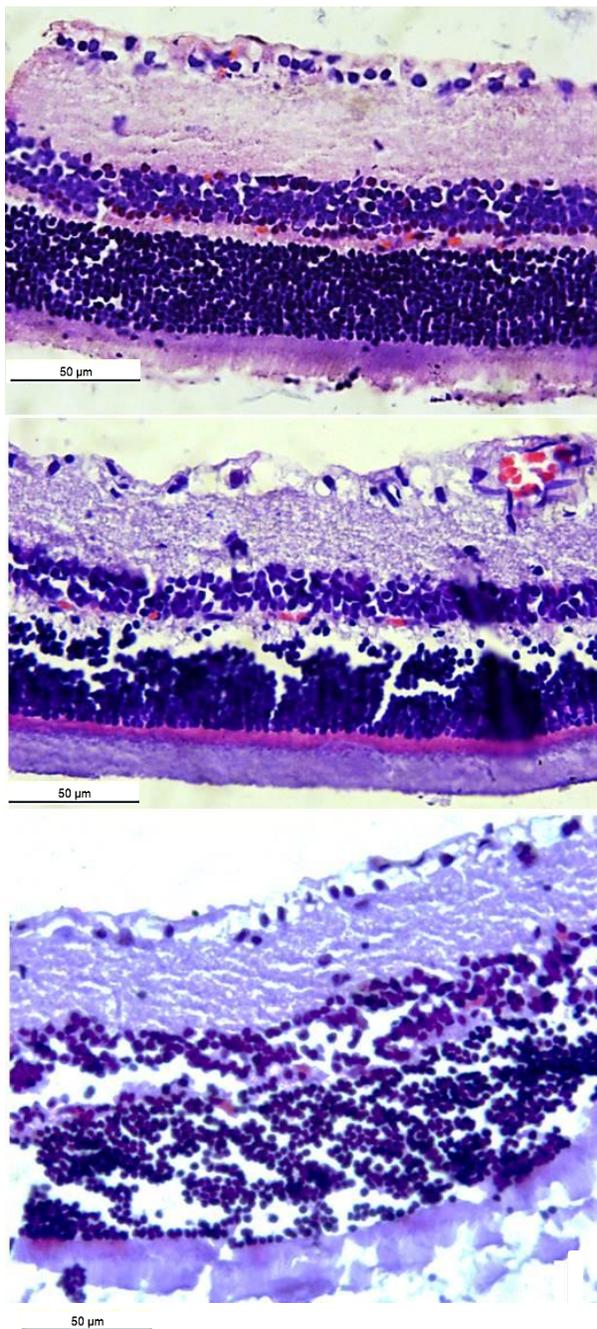


Figura 8. Fotografías a 4000x de cortes histológicos de retinas teñidas con H-E. Se compara el estado de preservación del tejido con la escala de valoración de la tabla 1. Imagen A. equivalente a 3 cruces. B. 2 cruces y C. 1 cruz. Con tejido laxo y sugerente engrosamiento. (Serrato-Vidal 2018).

Cruces	Descripción
+++	El tejido presenta sus capas íntegras y mantiene la disposición y el grosor original de cada capa, sin espacios entre el tejido. Los epitelios son avasculares, por lo tanto no deben existir vasos sanguíneos de gran calibre. Las CGR son abundantes y se observan con extensiones axonales.
++	El tejido presenta espacios entre las capas nuclear interna y externa, las cuales muestran una disposición celular levemente desordenada; sin embargo, es posible distinguir las capas que componen la retina. Se observan vasos sanguíneos de mayor calibre, CGR en menor cantidad y sin extensiones membranales.
+	El tejido presenta espacios entre las capas, las cuales a su vez no se observan íntegras sino con disposición celular desordenada; tejido laxo con escasa a nula organización de las capas. Se observa un aumento en el grosor o un claro adelgazamiento. Se observan CGR escasas y sin extensiones membranales.

6.8. Valoración del fondo de ojo

Con el fin de valorar la función y salud de la retina, se realizó una exploración de fondo ojo bajo el microscopio estereoscópico con el organismo previamente anestesiado. Se aplicaron de 1 a 2 gotas de solución salina al 0.9% en cada ojo. Inmediatamente después se sobrepuso un cubreobjetos sobre la córnea, con el cual se realizó un juego de refracción óptica hasta observar la parte posterior de la retina. El fondo de ojo se realizó previo a la inoculación de AgN y posterior a la lesión del nervio óptico a 7, 14 y 21 días, esto con el fin de descartar una lesión o patología previa a la lesión y que pudiese enmascarar el efecto del tratamiento, así como para evaluar la preservación de la función retiniana post-lesión.

La valoración se realizó utilizando una escala de 3 cruces que evalúa el calibre, forma y cantidad de vasos sanguíneos, el lecho vascular parénquima y la papila o disco óptico (Tabla 2). Se realizó una consulta externa de interpretación de las fotos de fondo de ojo con sus respectivas escalas con la oftalmóloga Dra. Laura Vega Parrales.

Tabla 2. Escala de valoraciones categóricas de tres cruces del estado de preservación funcional del parénquima vascular y vasos sanguíneos de las estructuras observables en el fondo de ojo. (Serrato-Vidal 2018, De Boever 2014, Wilkie 2013, Williams 2002)

Cruces	Descripción
+++	Los vasos sanguíneos mantienen el calibre normal (venas más gruesas en comparación con las arterias). El parénquima y la papila se observan rosados, ésta última con bordes bien definidos.
++	Las arterias y/o venas no son de su calibre original, siendo más delgado (venas) o grueso (arterias). El parénquima se muestra levemente hiperémico (rojizo), mientras la papila mantiene los bordes bien definidos pero de mayor tamaño, mantiene su color rosado o muestra palidez sugerente de edema (Figura 6b).
+	Las venas y/o arterias se muestran tortuosas (flechas) o engrosadas, lo que sugiere edema. El parénquima se observa pálido y es posible que presente manchas (*). La papila también se observa pálida o hiperémica y presenta bordes irregulares, de mayor tamaño y se muestra edematizada. (Figura 6c).

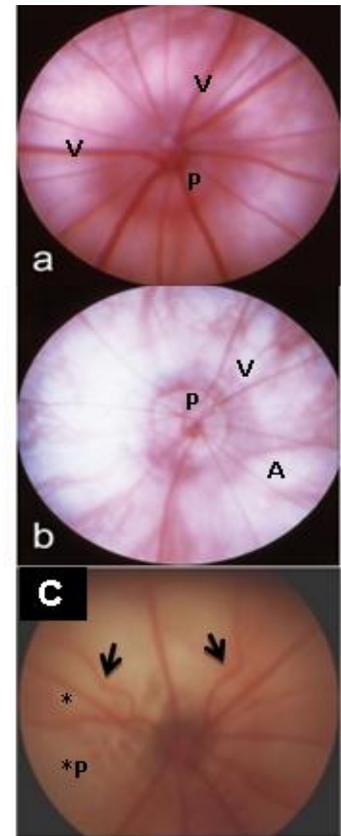


Figura 9. Caracterización del fondo de ojo. V:venas, A: arterias, P: papila. Imagen A.+++ normal. B.++ C. + con vasos sanguíneos tortuosos (flechas), manchas en parénquima (*) (Shibuya 2015)

6.9. Análisis estadístico

Los datos de grosor retiniano y de los ERG fueron promediados, y la suma total por individuo fue analizada utilizando Excel 2017. La normalidad de los datos fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilkinson. .

La relación entre las variables de amplitud de onda, tiempo implícito de respuesta de amplitud en relación con la intensidad de flash bajo cada condición (escotópica o fotópica) de los distintos grupos experimentales se analizó a través de un GLM debido a que los grupos no presentaron una distribución normal aun siendo transformados.

La comparación del grosor retiniano (PBS vs. AgN) fue realizada con una prueba t de Student para muestras independientes.

Las valoraciones clínicas cualitativas de 1 a 3 cruces de fondo de ojo, cortes histológicos y retinas en fresco respectivamente, se analizaron con un GLM debido a sus características categóricas.

El criterio para considerar significancia fue de $p \leq 0.05$. Todos los análisis y gráficas fueron realizados con el programa R Studio versión 3.6.1., excepto las gráficas de ERG, hechas con el programa GraphPad Prism5.

7. RESULTADOS

Para cumplir con el primer objetivo particular que consiste en evaluar el efecto de la inmunotolerancia a AgN sobre la respuesta funcional de la retina en ratas con lesión del nervio óptico, se realizaron registros ERG en ratas sometidas a seis diferentes tratamientos experimentales 7 días después de la lesión bajo condiciones escotópicas y fotópicas y bajo cuatro diferentes intensidades de flash. Los resultados ERG no muestran diferencias significativas entre los grupos previo a la manipulación, lo que sugiere que todas las ratas iniciaron con las mismas capacidades visuales (resultados no mostrados).

En los registros posteriores a la inducción de inmunotolerancia y lesión del nervio óptico, los resultados muestran que bajo condiciones escotópicas, el grupo lesión muestra diferencias significativas tanto para la amplitud de la onda A como para la amplitud de onda B siendo ésta una respuesta lenta en tiempo y corta en amplitud, característica del daño realizado por la compresión (Tabla 3 y Figura 10). Por su parte, la respuesta de amplitud de la onda B bajo las mismas condiciones muestra que el grupo punción también presenta una respuesta significativamente más amplia que el resto de los grupos (Tabla 3, Figura 10).

Con respecto al tiempo implícito de respuesta de amplitud de onda, los resultados muestran que el grupo lesión se comporta de manera diferencial para ambas ondas. Además el grupo AgN y basal presentan diferencias significativas en la respuesta de tiempo implícito para la onda B, siendo estas de respuesta más rápida o estable en comparación con los demás grupos, mientras que la respuesta de lesión es más lenta (Tabla 3, Figura 10). Obtener una respuesta significativa de estabilidad o mejoría de la función retiniana implica que exista una respuesta congruente de tiempo y amplitud de onda, resultados no congruentes con los grupos punción, basal y AgN, por lo que podríamos decir que no hay diferencias significativas que sean relevantes para la preservación funcional de la retina.

Los resultados de ERG bajo condiciones fotópicas no presentan diferencias significativas por parte de ningún grupo, ni en la respuesta de amplitud de onda A y B, ni respecto al tiempo implícito de cada una de las ondas (Tabla 4, Figura 11).

Tabla 3. Registros electroretinográficos bajo condiciones escotópicas, analizados en un GLM donde el valor de la pendiente $\beta=1$ y el valor de $p < 0.05$. Los valores significativos están resaltados.

Condición Escotópica	Amplitud onda A		Amplitud onda B		Tiempo implícito onda A		Tiempo implícito onda B	
	β	p	β	p	β	p	β	P
Basal	6.20	0.6	-12.93	0.77	0	0.83	-0.02	0.03
Punción	9.40	0.41	142.242	0.001	0	0	-0.01	0.30
Lesión	-28.35	0.03	-295.25	0.000004	0	0.02	-0.04	0.0005
Punción-lesión	-4.00	0.73	53.08	0.24	0.01	0.14	0	0.96
PBS	-5.60	0.62	-28.71	0.53	0	0.65	0	0.46
AgN	-6.20	0.58	13	0.78	0	0.83	0.02	0.03

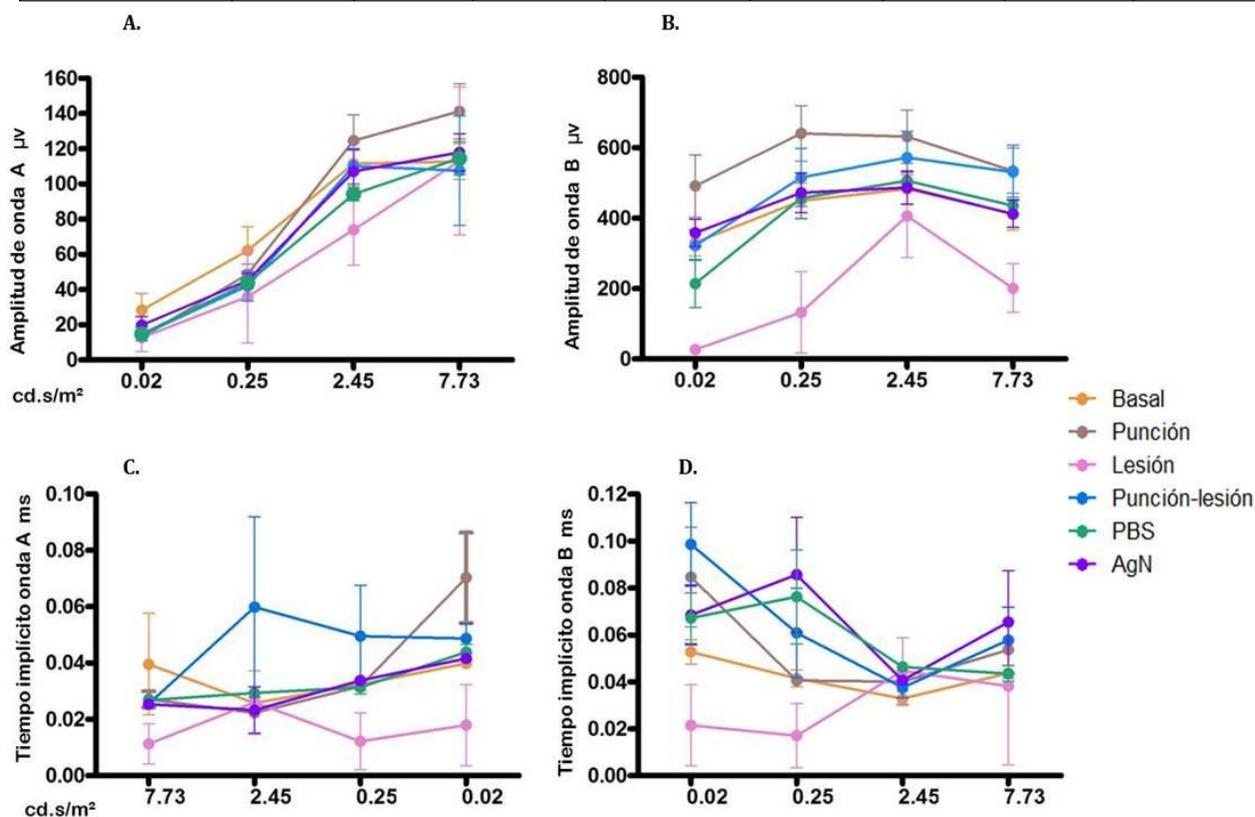


Figura 10. Efecto de la inmunotolerancia a AgN sobre la respuesta eléctrica de la retina al día 7 post-lesión bajo cuatro intensidades de flash (0.02, 0.25, 2.45, 7.73 $cd.s/m^2$) en condiciones escotópicas. Las figuras muestran la respuesta de amplitud de las ondas A (A) y B (B) en μV . Así mismo se grafican las respuestas del tiempo implícito de amplitud de las ondas A (C) y B (D) en ms. Se grafican promedios y desviación estándar por grupo. Basal (n=4), punción (n=4), lesión (n=4), punción-lesión (n=4), PBS (n=5) y AgN (n=7). * $p < 0.05$

Tabla 4. Resultados de ERG bajo condiciones fotópicas, analizados en un GLM donde el valor de la pendiente $\beta=1$ y el valor de $p= <0.05$. Ningún valor es significativo.

Condición Fotópica	Amplitud onda A		Amplitud onda B		Tiempo implícito onda A		Tiempo implícito onda B	
	B	p	β	p	β	p	β	P
Basal	0.89	0.90	-17.30	0.40	0	0.98	0	0.90
Punción	-0.54	0.94	-17.40	0.42	0	0.86	0	0.91
Lesión	4.62	0.57	-15.30	0.50	-0.02	0.12	-0.01	0.21
Punción-lesión	4.09	0.59	-13.51	0.51	0	0.54	0.01	0.25
PBS	4.49	0.53	-11.57	0.55	0	0.62	0	0.61
AgN	-0.89	0.90	17.31	0.41	0	0.98	0	0.90

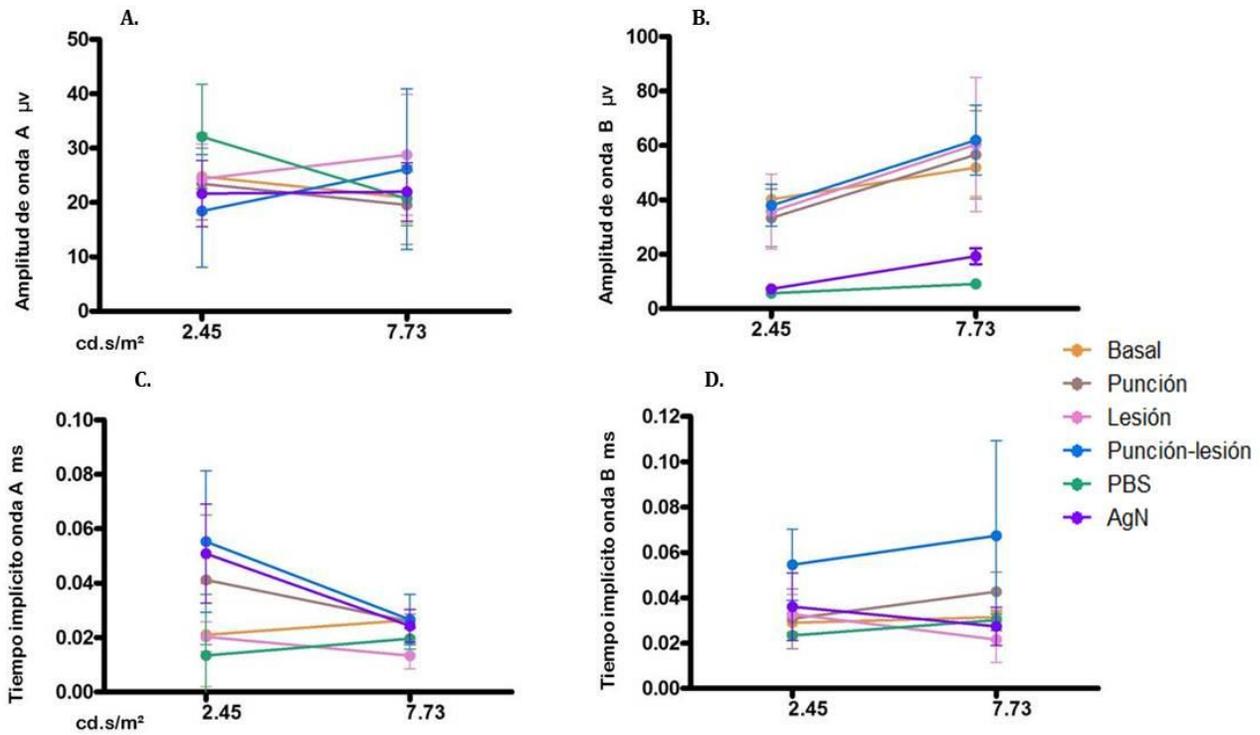


Figura 11. Efecto de la inmunotolerancia a AgN sobre la respuesta ERG a 7 días post-lesión bajo dos intensidades de flash (7.73 y 2.45 cd.s/m²) en condiciones fotópicas. Las figuras muestran la respuesta de amplitud de onda A en µV (A) y la amplitud de onda B en µV (B). Así mismo se grafican las respuestas del tiempo implícito de amplitud de onda A en (milisegundos) ms (C) y tiempo implícito de amplitud de onda B en ms (D). Se grafican las desviaciones estándar por grupo donde se obtuvieron medidas repetidas de basal n=4, punción n=4, lesión n=4, punción-lesión n=4, PBS n=5 y AgN n=7. * $p < 0.05$

El análisis clínico de valoración de fondo de ojo previo a la inducción de tolerancia y lesión es congruente con el ERG, lo que confirma la ausencia de daño previo a cualquier manipulación (datos no mostrados). Con respecto al análisis post-lesión, éste muestra datos congruentes con edema o inflamación característicos de un evento post-traumático. Sin embargo, el grupo de AgN muestra una tendencia hacia una mejor recuperación a lo largo del tiempo evaluado (7, 14, 21 días post-lesión) tanto en la valoración del lecho vascular, los vasos sanguíneos y el disco óptico o papila. No obstante los análisis estadísticos de GLM no muestran diferencias significativas ($\beta=0$, $p > 0.05$) en ninguna de las tres áreas evaluadas del fondo de ojo (Figura 12).

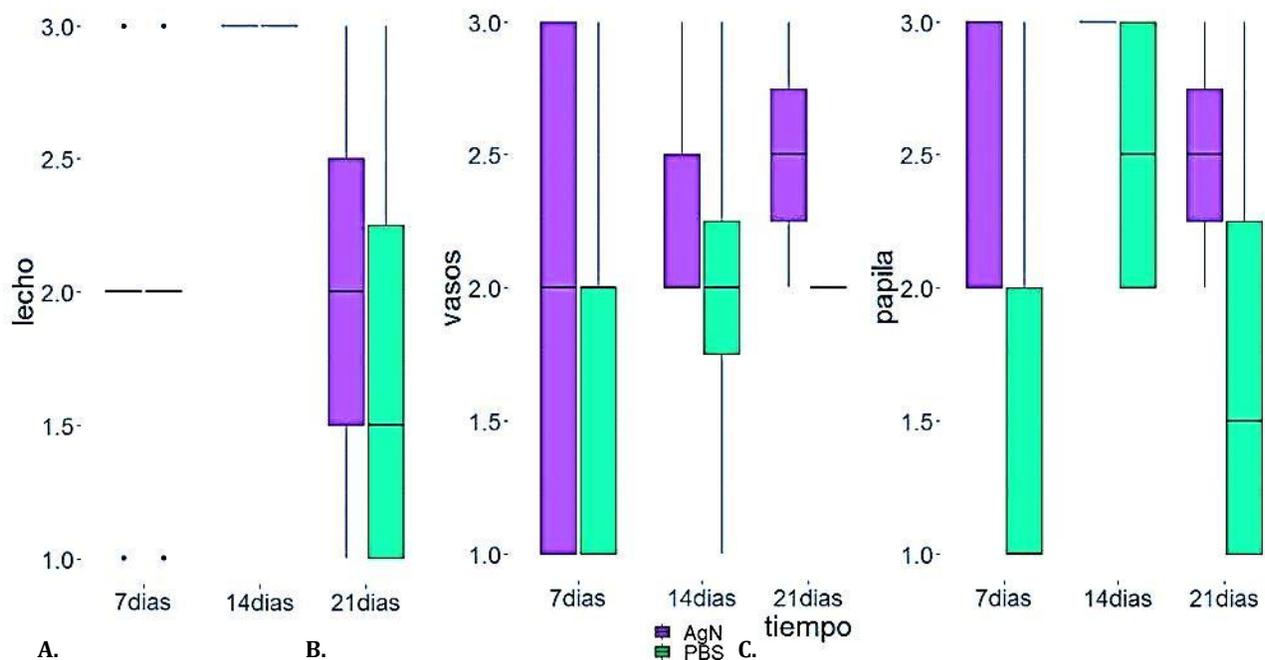


Figura 12. Efecto de la inmunotolerancia a AgN sobre la valoración clínica de fondo de ojo 7, 14 y 21 días post-lesión. Los gráficos muestran el promedio de frecuencias de puntaje por cruces asignado a cada individuo en cada tratamiento, morado AgN, verde PBS. Los valores máximos (3 cruces) reflejan mayor preservación funcional. (A) Valoración del lecho vascular, (B) Valoración de vasos sanguíneos, (C). Valoración de papila.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la inmunotolerancia a AgN sobre la función de la retina e indirectamente sobre la supervivencia de las neuronas ganglionares se midió el grosor central de la retina 7 y 21 días post-lesión en los grupos PBS y AgN (Figura 13). Los resultados muestran que no existen diferencias entre los grupos evaluados en ninguno de los tiempos evaluados (7 días: $t_{(1,10)} = 0.32$; $p > 0.05$; 21 días: $t_{(1,13)} = 0.4$; $p > 0.05$).

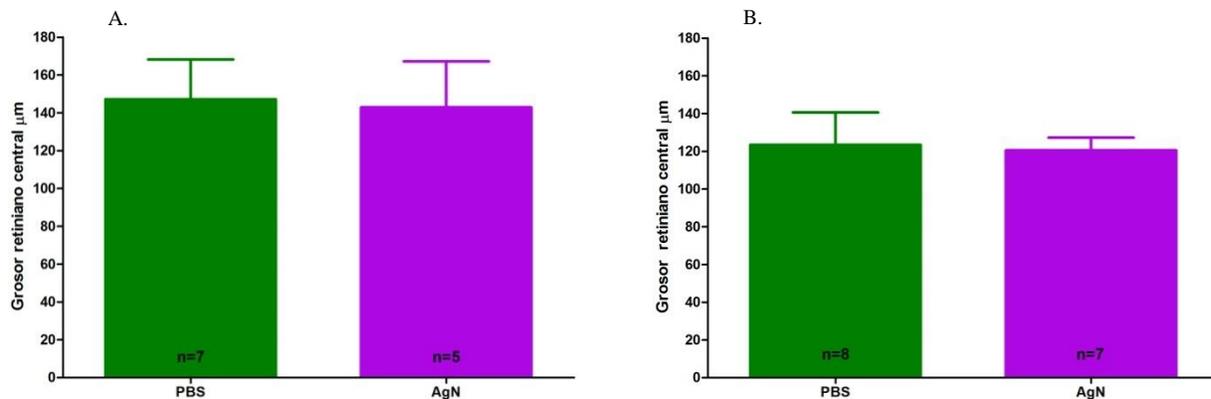


Figura 13. Efecto de la inmunotolerancia a AgN sobre el grosor retiniano. Los gráficos muestran las medidas en micrómetros de la retina en cortes transversales 7 (A) y 21 post-lesión (B) Se grafican promedios \pm DESVEST.

Los resultados de valoración histológica de 3 cruces mostraron un adelgazamiento de las capas a los 21 días, lo cual es congruente con el daño por la lesión. No se encontraron diferencias significativas entre AgN y PBS ($\beta=0$, $p = >0.05$) (Figura 14).

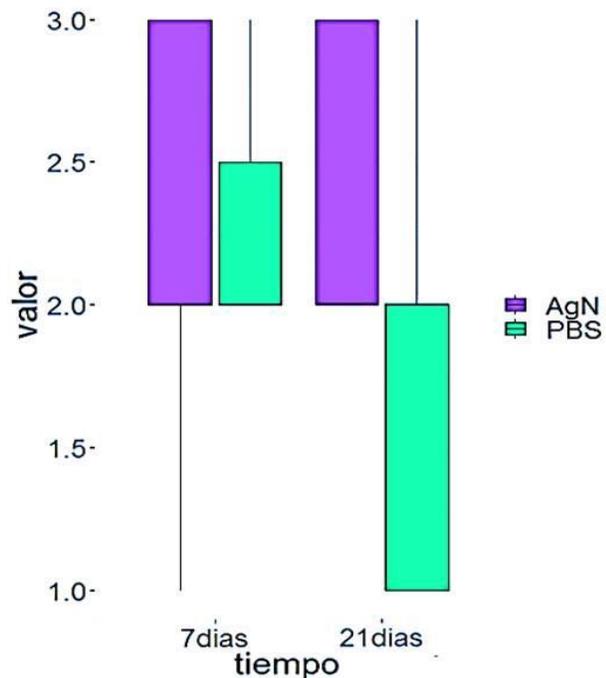


Figura 14. Efecto de la inmunotolerancia a AgN sobre la valoración histológica 7 y 21 días post-lesión. Los gráficos muestran el promedio de frecuencias de puntaje por cruces asignado a cada individuo en cada tratamiento, morado AgN, verde PBS. Los valores máximos (3 cruces) reflejan mayor preservación funcional. ($\beta=0$, $p = >0.05$)

8. DISCUSIÓN

La literatura reporta un gran número de tratamientos neuroprotectores capaces de preservar la función de las neuronas después de lesiones traumáticas en modelos experimentales. Sin embargo, realmente pocos tratamientos llegan a la práctica clínica debido a múltiples razones, entre las cuales destacan: 1) carencia de estudios que evalúen la función de las células preservadas y gran heterogeneidad entre las formas de lesión y evaluación funcional; 2) diseños experimentales muy controlados que no reflejan el complejo ambiente del sistema nervioso frente al daño y 3) diferencias intrínsecas entre los modelos animales y el humano (Vohra 2013, Morquette 2008).

Recientemente nuestro grupo de trabajo ha evaluado el efecto de la inducción de inmunotolerancia a AgN vía ACAID sobre la supervivencia de las neuronas ganglionares en la retina y la preservación de la estructura tisular en el sitio del daño en un modelo de lesión del nervio óptico utilizando estrategias celulares y moleculares. Los resultados obtenidos hasta el momento se han centrado en las etapas tempranas después de la lesión, debido a que los tratamientos neuroprotectores tienen un efecto en ventanas de tiempo limitadas donde ocurren las tasas más elevadas de degeneración secundaria (Allan 2003). Sin embargo, con el objetivo de valorar la función de las neuronas ganglionares preservadas por la inmunotolerancia a AgN al día 7 post-lesión del nervio óptico y su supervivencia y viabilidad a los 14 y 21 días post-lesión, este trabajo realizó registro de actividad eléctrica en la retina, valoración clínica y cuantificaciones histológicas.

Los resultados obtenidos en el ERG muestran que al día 7 post-lesión únicamente el grupo lesión muestra diferencias en la amplitud de las ondas A y B. Esta respuesta es congruente con el daño al nervio óptico; sin embargo, no se observa en los grupos PBS y AgN que también fueron lesionados muestran un cambio en la respuesta de amplitud de onda A y B bajo condiciones escotópicas del grupo de lesión, lo que comprueba la confiabilidad con la que se realizó la lesión. La respuesta de tiempo implícito de la onda B muestra que el mismo grupo lesión presenta diferencias significativas; siendo esto un resultado esperado, debido a que la amplitud de onda está intrínsecamente relacionada con el tiempo en que ésta se lleva a cabo y el daño realizado a las estructuras retinianas.

Con respecto al tiempo implícito de respuesta de amplitud de onda B bajo condiciones escotópicas, los grupos AgN y basal presentan diferencias significativas, es decir una respuesta de despolarización más estable; sin embargo, el que no sea congruente con la amplitud de onda B no traduce significancia a nivel funcional. Para corroborarlo, sería necesario aumentar las repeticiones. Por su parte, las respuestas eléctricas fotópicas no denotan ningún cambio a ningún nivel.

Con respecto a las valoraciones de fondo de ojo, se realizó una evaluación previa a la lesión y posterior a ésta, con el fin de descartar una lesión o patología previa a la lesión que pudiese enmascarar el efecto del tratamiento. Los resultados obtenidos de los análisis previos a la lesión corroboran los resultados del ERG y sugieren que todos los organismos tuvieron una capacidad visual intacta al inicio del experimento (datos no mostrados). Durante el análisis post-lesión el grupo de AgN mostró una tendencia hacia una mejor recuperación a lo largo del tiempo evaluado (7,14 y 21 días). El fondo de ojo del grupo AgN estuvo caracterizado por un menor edema en disco óptico, un lecho vascular menos eritematoso, y vasos sanguíneos con calibres estables, que se traducen en una mejor preservación funcional. Sin embargo, debido a que a nivel estadístico no hay significancia, es posible decir que la inmunotolerancia a AgN no tiene un efecto sobre la preservación de la retina medida mediante el fondo de ojo.

Los hallazgos de grosor retiniano mostraron un adelgazamiento de las capas retinianas tanto en el grupo PBS como el grupo AgN a los 21 días post-lesión, sugiriendo que la lesión del nervio óptico realmente genera un daño a nivel histológico y funcional en la retina. A pesar de que el grupo AgN muestra una tendencia a preservar el tejido de mejor manera, al presentar más conexiones celulares a nivel CGR y menor grado de adelgazamiento de las distintas capas retinianas, los datos estadísticos no son significativos. Probablemente no vemos diferencias entre el grupo vehículo y tratamiento porque las mediciones se realizaron en la parte central de la retina, cerca del nervio óptico sin discriminación temporal o nasal. Se ha descrito que hay una pérdida de CGR y tejido principalmente en la parte ínfero-nasal en comparación de la parte supero-temporal (Fukuda 1977, Tanito 2008). Es posible que si las mediciones tomaran en cuenta estos datos anatómicos, podríamos encontrar una tendencia más clara de si nuestro tratamiento promueve la supervivencia celular de las CGR. Adicionalmente, también se podría comparar la capa externa de la retina, es decir, solo medir esa capa en donde se encuentran las CGR y que se ha comprobado que denota las interacciones y organización de las conexiones neuronales de la retina y ha sido utilizado para evaluar la función de fotorreceptores (LaVail 1992).

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la inducción de inmunotolerancia a AgN no preserva la función de la retina durante las tres semanas post-lesión del nervio óptico. La discrepancia entre el efecto neuroprotector de la inmunotolerancia a AgN reportado en estudios previos (Martínez- Alcantar 2019) y el nulo efecto del mismo tratamiento reportado en este estudio probablemente reflejen los distintos niveles de abordaje experimental. Mientras los estudios previos emplearon técnicas de inmunohistoquímica para el marcador Brn3a (presumible marcador de neuronas ganglionares viables, no apoptóticas) y la cuantificación de la expresión del mRNA de diferentes factores, en este estudio empleamos evaluaciones clínicas adaptadas al modelo animal.

Si bien el empleo de técnicas indirectas para medir la función visual podría ser una de las principales limitaciones de nuestro trabajo, se convierte en una fortaleza al favorecer un abordaje más integral y completo del efecto neuroprotector de un tratamiento. Sin embargo, estudios posteriores de otros tratamientos deberán incluir otras valoraciones complementarias que midan la función de las células ganglionares centrales (electrorretinograma de patrón, pERG) o de toda la vía visual (desde la función de los fotorreceptores hasta los núcleos visuales de la corteza occipital: estudio de potenciales evocados visuales, PEV. Catalá 2005). Adicionalmente, aun cuando la valoración histológica es un buen indicador del mantenimiento de la arquitectura celular de toda la retina, no es capaz de discriminar las diferentes poblaciones neuronales, por lo que se deberá complementar con inmunotinciones para tipos celulares específicos. Finalmente, las valoraciones clínicas provenientes de estudios humanos deberán ser estandarizadas en modelos animales con el fin de tener referentes más adecuados.

Una debilidad del presente estudio es el alto nivel de manipulación del ojo, el cual pudo enmascarar los efectos del tratamiento al inducir el daño exacerbado de la vía visual como ha sido discutido previamente.

Considero que las valoraciones clínicas de la retina generan información sobre el estado de preservación funcional de las interacciones celulares de todo el órgano, es decir, al evaluar la función involucramos más niveles de complejidad y otras células que no solo son retinianas, como por ejemplo las células de la córnea, cristalino, humor vítreo y coroides, así como todas las interacciones celulares de las diez capas de la retina y no solo las CGR. Por lo tanto, un cambio en la expresión de citocinas anti-inflamatorias en la retina a los 2 y 7 días post-lesión puede no verse reflejado en ese mismo periodo de tiempo a nivel de complejidad tisular, ya que son etapas muy

tempranas para la valoración clínica, es por esta razón que se propone realizar más pruebas funcionales a 21, 30 y hasta 45 días post-lesión.

Los resultados obtenidos reportan que la inmunotolerancia a AgN incrementa la expresión de factores anti-inflamatorios y neurotróficos a los 2 y 7 días post-lesión en la retina y nervio óptico (Gonzalez-Cardenas 2018, Martínez-Alcantar *et al.* 2019), los cuales muy probablemente contribuyan al mantenimiento de las CGR observado en la retina durante los días 7 y 14 post-lesión (Martínez-Alcantar *et al.* 2019). Sin embargo, este ambiente predominantemente anti-inflamatorio y neuroprotector no se mantiene a los 14 días post-lesión en la retina, donde incluso se observa un incremento en la expresión del factor pro-apoptótico Caspasa 3 (Talavera-Carrillo 2019). Estos datos sugieren que la inducción de inmunotolerancia a AgN es capaz de regular el ambiente inflamatorio y neuroprotector en etapas tempranas después de la lesión y retrasa la muerte de las CGR pero no logra mantener su supervivencia.

9. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos de las valoraciones funcionales e histológicas muestran que la inmunotolerancia a antígenos neurales vía ACAID no preserva la función de la retina después de la lesión del nervio óptico.

APÉNDICE A

La eficiencia de la inducción de inmunotolerancia vía ACAID fue evaluada mediante la prueba de DTH (Figura 14), mientras la eficacia de la lesión por compresión fue evaluada mediante cortes histológicos de nervios ópticos lesionados donde se compararon las tinciones histológicas en cortes longitudinales observando la homogeneidad de la lesión del por compresión del nervio óptico (Figura 15).

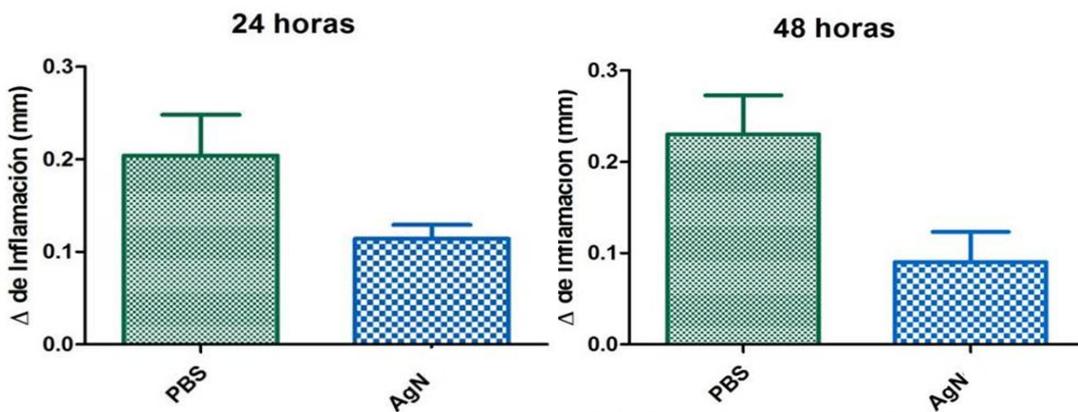


Figura 15. La inoculación de AgN en la cámara anterior del ojo atenúa la inflamación sistémica en ratas de la cepa Wistar. La gráfica muestra la diferencia de inflamación en orejas (Δ) medida a las 24 (A) y 48 horas (B) después del reto con respecto a la línea base en la prueba de hipersensibilidad retrasada. Se presentan resultados de ratas inoculadas en la cámara anterior con vehículo (n=5) y con AgN (n=5). Se grafican promedios de inflamación \pm EEM, *p <0.05.

APÉNDICE B

Prueba de homogeneidad de la lesión del nervio óptico que consistió en valorar el área de la lesión en cuanto a distancia de la copa óptica a la compresión así como el estado del tejido comprimido, es decir que no estuviera rasgado o completamente lesionado, sino que la estructura se mantuviese observando una zona de angostura donde se realizó la compresión, esto se observa en los asteriscos verdes donde apreciamos un tejido con fibras laxas e infiltrados granular, es decir se observa una zona de inflamación.

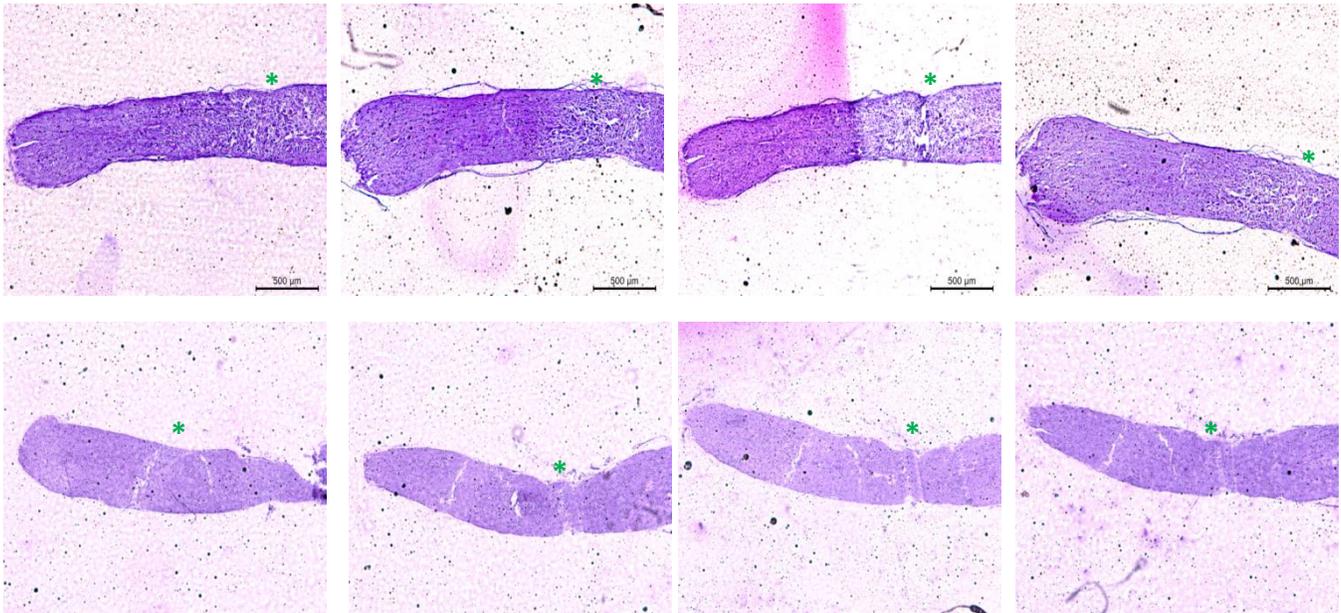
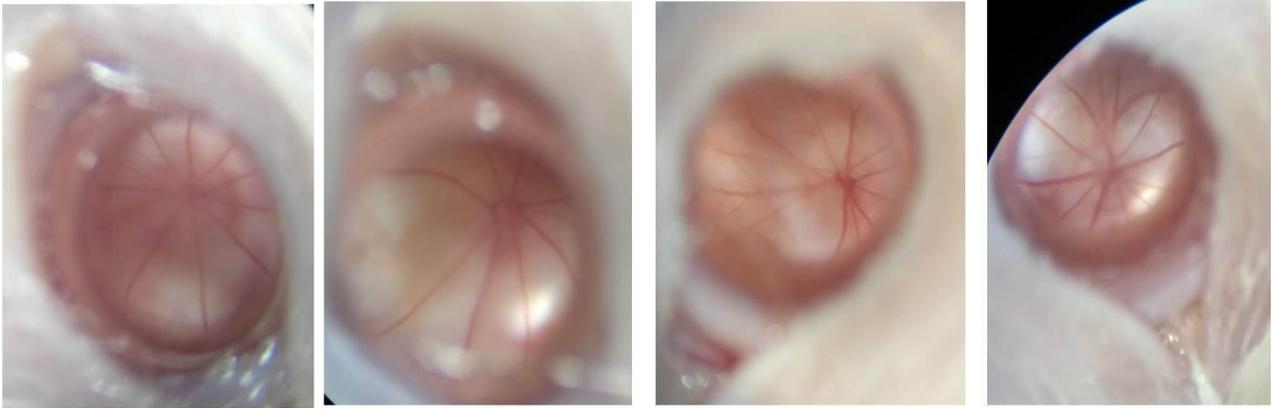


Figura 16. Representación histológica de la lesión del nervio óptico. Cortes seriados a 10 μm de 8 nervios ópticos teñidos con hematoxilina- eosina. Los asteriscos verdes muestran la zona de compresión hechas con pinzas de autocierre. (Serrato-Vidal 2018).

APÉNDICE C

Fotografías de fondo de ojo donde se observan la retina con lecho vascular, arterias y venas radiales así como disco óptico de ratas de la cepa Wistar 21 días post-lesión.



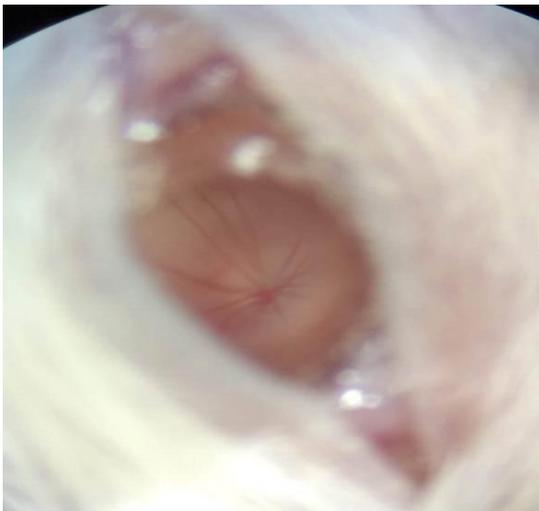
A.

B.

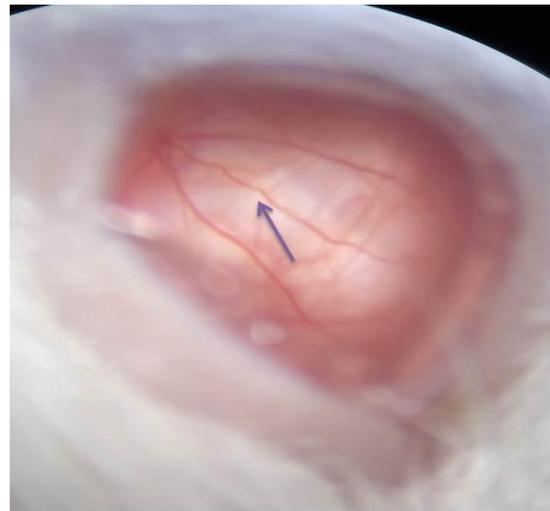
C.

D.

Ojos A y B corresponden a ojos izquierdos lesionados e inoculados con AgN, mientras que C y D son ojos izquierdos lesionados e inoculados con PBS. (Serrato-Vidal 2018)



E. AgN



F. PBS.

Ojos derechos no lesionados pero inoculados. Observamos como parte de la lesión puede pasarse al ojo colateral. En F. observamos una vena central tortuosa marcada con la flecha (Serrato-Vidal 2018).

BIBLIOGRAFÍA

1. Agudo-Barriuso M., Nadal-Nicolás F. M., Parrilla-Reverter G., Villegas-Pérez M. P., y Vidal-Sanz M. (2011). Anatomical and Molecular Responses Triggered in the Retina by Axonal Injury, *The Mystery of Glaucoma*, Dr. Tomas Kubena (Ed.), ISBN: 978-953-307-567-9, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/the-mystery-of-glaucoma/anatomical-and-molecular-responses-triggered-in-the-retina-by-axonal-injury>.
2. Allan, S. M., & Rothwell, N. J. (2003). Inflammation in central nervous system injury. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358(1438), 1669-1677.
3. Allen, R. S., Olsen, T. W., Sayeed, I., Cale, H. A., Morrison, K. C., Oumarbaeva, Y., ... & Stein, D. G. (2015). Progesterone treatment in two rat models of ocular ischemia. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(5), 2880-2891.
4. Azcona-Cruz, M. I., del Carmen Ríos-Lobo, M., & Amador-Jiménez, S. (2015). Glaucoma: Aspectos relevantes para la detección oportuna. *Revista Salud y Administración*, 2(4), 23-35.
5. Bermejo Pareja, F., Porta Etessam, J., Díaz Guzmán, J., & Martínez Martín, P. (2008). Más de cien escalas en neurología. *Madrid: Aula Médica*, 21.
6. Bosco A., Inman D. M., Steele M. R., Wu G., et al. (2008). Reduced retina microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49 (4): 1437-1446.
7. Brandli, A., & Stone, J. (2015). Using the Electroretinogram to Assess Function in the Rodent Retina and the Protective Effects of Remote Limb Ischemic Preconditioning. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (100), e52658-e52658.
8. Català, J., & Castany, M. (2005). Pruebas electrofisiológicas: ¿qué, cuándo, cómo y por qué?(2ª parte). *Anales de Ofalmología*, 13(2), 76-90.
9. Chiu K. Chan H., Yeung S., Yuen W., Zee S., et al. (2009). Modulation of microglia by Wolfberry on the survival of retinal ganglion cells in a rat ocular hypertension model. *J Ocul Biol Dis Inform* 2 :47-56.
10. Cone, R. E., & Pais, R. (2009). Anterior chamber-associated immune deviation (ACAID): an acute response to ocular insult protects from future immune-mediated damage?. *Ophthalmology and eye diseases*, 1, OED-S2858.

11. De Boever, P., Louwies, T., Provost, E., Panis, L. I., & Nawrot, T. S. (2014). Fundus photography as a convenient tool to study microvascular responses to cardiovascular disease risk factors in epidemiological studies. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (92), e51904.
12. Faktorovich, E. G., Steinberg, R. H., Yasumura, D., Matthes, M. T., & LaVail, M. M. (1992). Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *Journal of Neuroscience*, 12(9), 3554-3567.
13. Farkas, O., & Povlishock, J. T. (2007). Cellular and subcellular change evoked by diffuse traumatic brain injury: a complex web of change extending far beyond focal damage. *Progress in brain research*, 161, 43-59.
14. Fukuda, Y. (1977). A three-group classification of rat retinal ganglion cells: histological and physiological studies. *Brain research*, 119(2), 327-344.
15. Geneser, Finn. (2000) Histología. 3a. edición. Editorial Médica Panamericana
16. Guerra García, R. A., Pérez García, D., Rúa Martínez, R., & Llerena Rodríguez, J. A. (2012). Trauma ocular contuso y afecciones de vítreo-retina. *Revista Cubana de oftalmología*, 25, 545-560.
17. González-Cardenas, Luis. (2018) Efecto de la inoculación de antígenos neurales en la cámara anterior del ojo sobre la expresión de Foxp3 en ratas con lesión del nervio óptico. Tesis de Maestría. UMSNH.
18. Green, D. G. (1973). Scotopic and photopic components of the rat electroretinogram. *The Journal of physiology*, 228(3), 781.
19. Gregg, R. G., McCall, M. A., & Massey, S. C. (2013). Function and anatomy of the mammalian retina. In *Retina* (pp. 360-400). WB Saunders.
20. Gutiérrez-Ortiz, C., & Teus Guezala, M. A. (2010). Patología del nervio óptico. *JANO*, 59-68.
21. Haberer, J. P., & Obstler, C. (2009). Anestesia en oftalmología. *EMC-Anestesia-Reanimación*, 35(2), 1-26.
22. Jehle T., Dimitriu C., Auer S., Knoth R., et al. (2007). The neuropeptide NAP provides neuroprotection against retinal ganglion cell damage after retinal ischemia and optic nerve crush. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246: 1255-63.
23. Kolb, H., Nelson, R., Fernandez, E., Jones, B. (2011) Webvision: The organization of the retina and visual system. Moran eye center. <http://webvision.med.utah.edu/book/>

24. Liu S., Li Z., Weinreb R. N., Xu G., et al. (2012). Tracking Retinal Microgliosis in Models of Retinal Ganglion Cell Damage. *IOVS* 53 (10): 1-9. Downloaded From: <http://iovs.arvojournals.org/pdfaccess.ashx?url=/data/Journals/IOVS/932977/> on 06/06/2016.
25. LaVail, M. M., Unoki, K., Yasumura, D., Matthes, M. T., Yancopoulos, G. D., & Steinberg, R. H. (1992). Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(23), 11249-11253.
26. Li, L., Eter, N., & Heiduschka, P. (2015). The microglia in healthy and diseased retina. *Experimental eye research*, 136, 116-130.
27. Lima Gómez, V., & Pérez, E. M. (2001). Causas de deficiencia visual en pacientes diabéticos mexicanos. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 9(4), 176-180.
28. Martínez-Alcantar, Lorena. (2019) Inmunotolerancia específica a antígenos neurales como estrategia neuroprotectora en ratas con traumatismo espinal. Tesis de Doctorado. UMSNH.
29. Morquette, J. B., & Di Polo, A. (2008). Dendritic and synaptic protection: is it enough to save the retinal ganglion cell body and axon?. *Journal of Neuro-Ophthalmology*, 28(2), 144-154.
30. Niederkorn J. Y. (2011). Dynamic immunoregulatory processes that sustain immune privilege in the eye. In *Immunology, inflammation and diseases of the eye*. Elsevier, San Diego, 38-43pp.
31. Nieto-Sampedroa, M., Collazos-Castroa, J. E., Taylora, J. S., Gudiño-Cabrerab, G., Verdú-Navarro, E., Pascual-Piédrolad, J. I., & Insausti-Serranoe, R. (2002). Trauma en el sistema nervioso central y su reparación. *REV NEUROL*, 35(6), 534-552.
32. Paneca Santiesteban, R., Francisco Plasencia, M., Santiesteban Freixas, R., Carrero Salgado, M., & Mendoza Santiesteban, C. E. (2005). Electroretinograma: Valores normales con diferentes protocolos de estudio. *Revista Cubana de Oftalmología*, 18(2).
33. Pérez Moreiras, J. V., Coloma Bockos, J. E., & Sánchez, P. (2003). Orbitopatía tiroidea (fisiopatología, diagnóstico y tratamiento). *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 78(8), 407-431.
34. Perlman, I. (2007). The electroretinogram: ERG. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* [Internet]. University of Utah Health Sciences Center.
35. Pineda-Salazar, J.U. (2016) Efecto neuroprotector de la inmunotolerancia a antígenos neurales en ratas con lesión por compresión del nervio óptico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, UMSNH

36. Porciatti, V. (2015). Electrophysiological assessment of retinal ganglion cell function. *Experimental eye research*, 141, 164-170.
37. Qu J. & Jakobs T. C. (2013) The Time Course of Gene Expression during Reactive Gliosis in the Optic Nerve. *PLOS ONE* 8(6): 1-19 e67094. doi:10.1371/journal.pone.0067094.
38. Salas-Torras, Ana. (2017) Desarrollo de modelos celulares y animales para el estudio de terapia génica no viral anti-angiogénica en retina. Bellaterra. Tesis de Doctorado.
39. Sautter, J., & Sabel, B. A. (1993). Recovery of brightness discrimination in adult rats despite progressive loss of retrogradely labelled retinal ganglion cells after controlled optic nerve crush. *European Journal of Neuroscience*, 5(6), 680-690.
40. Schwab JM, Zhang Y, Kopp MA, Brommer B, Popovich PG. The paradox of chronic neuroinflammation, systemic immune suppression, autoimmunity after traumatic chronic spinal cord injury. *Exp Neurol* 2014;1(258):121–9.
41. Sharma T. P., McDowell C. M., Liu Y., et al. (2014). Optic nerve crush induces spatial and temporal gene expression patterns in retina and optic nerve of BALB/cJ mice. *Molecular Neurodegeneration* 9 (14): 1-19.
42. Shibuya, K., Tomohiro, M., Sasaki, S., & Otake, S. (2015). Characteristics of structures and lesions of the eye in laboratory animals used in toxicity studies. *Journal of toxicologic pathology*, 28(4), 181-188.
43. Stein-Streilein J. y Taylor A.W. (2007). An eye's view of T regulatory cells. *Journal of Leukocyte Biology* 81: 593-598. Street, New York, NY 10013, USA. 547 pp.
44. Streilein J.W. (2003). Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat. Rev. Immunol* (3): 879–889.
45. Talavera-Carrillo, Diana K. (2019) Efecto neuroprotector de dos estrategias inmunomoduladoras en ratas con lesión del nervio óptico. Tesis de Maestría. UMSNH.
46. Tang, Z., Zhang, S., Lee, C., Kumar, A., Arjunan, P., Li, Y., ... & Li, X. (2011). An optic nerve crush injury murine model to study retinal ganglion cell survival. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (50), e2685.
47. Templeton J.P. y Geisert E.E. (2012). A practical approach to optic nerve crush in the mouse. *Molecular Vision* 18: 2147-2152.
48. Toscano-Tejeida, D., Ibarra, A., Phillips-Farfán, B. V., Fuentes-Farías, A. L., & Meléndez-Herrera, E. (2016). ACAID as a potential therapeutic approach to modulate inflammation in neurodegenerative diseases. *Medical hypotheses*, 88, 38-45.

49. Varón, C. L., Jaramillo, S., & Tello, A. (2010). La retina para el médico no oftalmólogo. *MedUNAB*, 13(1), 31-37.
50. Vohra, R., Tsai, J. C., & Kolko, M. (2013). The role of inflammation in the pathogenesis of glaucoma. *Survey of ophthalmology*, 58(4), 311-320.
51. Walsh J.T., Zheng J., Smirnov I., Lorenz U., et al. (2014). Regulatory T Cells in Central Nervous System Injury: A Double-Edged Sword. *The Journal of Immunology* 193: 5013-5022.
52. Werther, K., Candioto, C. G., & Korbel, R. (2017). Ocular Histomorphometry of Free-Living Common Kestrels (*Falco tinnunculus*). *Journal of avian medicine and surgery*, 31(4), 319-326.
53. Wilkie, K. P. (2013). A review of mathematical models of cancer-immune interactions in the context of tumor dormancy. In *Systems biology of tumor dormancy* (pp. 201-234). Springer, New York, NY.
54. Williams, A. C. D. C. (2002). Facial expression of pain: an evolutionary account. *Behavioral and brain sciences*, 25(4), 439-455.
55. Yoles E. y Schwartz M. (1998). Degeneration of Spared Axons Following Partial White Matter Lesion: Implications for Optic Nerve Neuropathies. *Experimental neurology* 153, 1-7.
56. Zhang, C., Lei, B., Lam, T. T., Yang, F., Sinha, D., & Tso, M. O. (2004). Neuroprotection of photoreceptors by minocycline in light-induced retinal degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(8), 2753-2759.
57. Zhang, Z. Z., Gong, Y. Y., Shi, Y. H., Zhang, W., Qin, X. H., & Wu, X. W. (2012). Valproate promotes survival of retinal ganglion cells in a rat model of optic nerve crush. *Neuroscience*, 224, 282-293.
58. Zhikuan, Y., & Shuhua, D. (1999). Histological measurement of human retinal thickness. *Journal of Tongji Medical University*, 19(3), 246-248