



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**EFFECTO NEUROPROTECTOR DE LA DESVIACIÓN
INMUNOLÓGICA ASOCIADA A LA CÁMARA ANTERIOR DEL
OJO INDUCIDA CON ANTÍGENOS NEURALES EN RATAS CON
LESIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO**

TESIS QUE PRESENTA

MIGUEL AVALOS VIVEROS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Directora de Tesis:

D. en C. Esperanza Meléndez Herrera

Codirectora de Tesis:

M. en C. Lorena Martínez Alcantar

Morelia, Michoacán, abril de 2019.



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

REVISIÓN Y APROBACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Morelia, Michoacán con fecha 23 / 11 / 18 los Profesores
revisores de la TESIS titulada:

EFFECTO NEUROPROTECTOR DE LA DESVIACIÓN INMUNOLÓGICA ASOCIADA A LA
CÁMARA ANTERIOR DEL OJO INDUCIDA CON ANTÍGENOS NEURALES EN RATAS CON
LESIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO

Presentada por el estudiante:

AVALOS
Apellido paterno

VIVEROS
Apellido materno

MIGUEL
Nombre(s)

aspirante al título de Lic. en Químico Farmacobiología, nos permitimos informar a la Comisión de Tesis de la Facultad de Químico Farmacobiología, que la revisión, así como las observaciones y recomendaciones al documento final de tesis han sido realizadas, por lo que manifestamos **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface las condiciones para proceder a su impresión.

Directores de tesis

D. C. Esperanza Meléndez Herrera
(Nombre y firma del asesor)

M. C. Lorena Martínez Alcantar
(Nombre y firma del co-asesor)

Comisión revisora

D. C. Martha Estrella García Pérez
(Nombre y firma del revisor 1)

D. C. Luz Torner Aguilar
(Nombre y firma del revisor 2)

D. C. Naima Lajud Ávila
(Nombre y firma del revisor 3)

D. C. Rocío del Carmen Montoya Pérez
(Nombre y firma del revisor 4)

D. C. Joel Edmundo López Meza
(Nombre y firma del revisor 5)

DEDICATORIA

A mi mamá: MA. BELEN VIVEROS-LOPEZ

A mi papá: RAFAEL AVALOS-LOPEZ

A mi hermana: MARÍA GUADALUPE AVALOS-VIVEROS y

A RICARDO CHÁVEZ-NÚÑEZ, quien es como un padre para mí.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, a mis padres y a mi hermana porque gracias a ellos e culminado esta etapa importante de mi vida; gracias por sus enseñanzas, conocimientos, dedicación y apoyo constante e incondicional; han sido un pilar muy importante durante toda mi formación personal, académica y profesional.

A la D. en C. Alma Lilia Fuentes-Farías directora del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA-UMSNH). Por su apoyo y asesoría durante la realización del presente proyecto.

A mis directoras de tesis la D. en C. Esperanza Meléndez-Herrera y la futura D. en C. Lorena Martínez-Alcantar, por sus conocimientos, asesoría y consejos durante la realización del presente proyecto.

A mi comité sinodal conformado por la PhD. Martha-Estrella García-Pérez, la PhD. Luz Torner-Aguilar, la D. en C. Naima Lajud-Avila, la D. en C. Rocío del Carmen Montoya-Pérez y el D. en C. Joel Edmundo López-Meza, gracias por sus conocimientos, sugerencias y aportaciones que ayudaron a enriquecer aún más nuestro proyecto de investigación y el presente trabajo.

A la D. en C. Rosa Elvira Núñez-Anita por sus conocimientos y asesoría en citometría de flujo y ensayo de inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA).

A la M. en C. Alejandra Castellón-Ruíz, maestra, amiga y compañera de trabajo en estos últimos dos años, gracias por tus conocimientos, asesoría, ayuda y compañía en largas horas de investigación, estudio y trabajo.

A la M. en C. Diana Karina Talavera-Carrillo por su asesoría, conocimientos y apoyo técnico durante la inducción de ACAID y en la lesión del nervio óptico.

A la M. en C. Dulce Abril Serrato por sus conocimientos en pruebas de funcionalidad visual, electrorretinografía y fondo de ojo.

A la M. en C. Sibila Concha-Santos, por su apoyo técnico en la cuantificación del material genético.

A todos mis amigos del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB-UMSNH) por sus conocimientos, en especial a la M. en C. Mayra Xóchitl Durán-Maldonado por su asesoría en patología, hematología e inmunología.

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

A todos los Doctores, Maestros y Profesores de la Facultad de Químico Farmacobiología (QFB-UMSNH), gracias por sus conocimientos, asesoría y consejos, han sido una parte muy importante para mi formación.

A la M. en C. María del Rocío Lara Madrigal, profesora de la Facultad de Químico Farmacobiología (QFB-UMSNH) y a la C. P. C. María Eugenia Hernández-Vidales profesora de la Facultad de Contaduría y Ciencias Administrativas (UMSNH) por sus conocimientos y asesoría durante mi formación.

A la maestra María Luisa Ángeles-Rocha y a la M. C. P. María Guadalupe Sánchez-Mercado por sus conocimientos y asesoría durante mi formación.

A todos mis amigos y compañeros de la Facultad de Químico Farmacobiología (QFB-UMSNH), en especial a mis amigas; Wendy C. Aguirre, Martha Guzmán, Dalia E. Fernández... ya que juntos compartimos muchos momentos de estudio y trabajo.

A todas las personas con las que he tenido el honor de convivir y que me han ayudado a crecer profesionalmente, en conocimientos y como persona.

ÍNDICE

Sección	Página
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Características generales del sistema nervioso	3
2.2 Características generales de la vía visual	4
2.3 Fisiopatología de la lesión del sistema nervioso central	6
2.4 Factores neurotróficos y su función en el sistema nervioso central.....	10
2.5 Factores de supervivencia y de muerte celular	14
2.6 Inmunotolerancia a los antígenos propios y neuroprotección	16
3. ANTECEDENTES DIRECTOS	18
4. JUSTIFICACIÓN.....	19
5. HIPÓTESIS.....	20
6. OBJETIVOS.....	20
6.1 Objetivo general.....	20
6.2 Objetivos particulares	20
7. METODOLOGÍA	21

7.1 Animales de experimentación.....	21
7.2 Diseño experimental.....	21
7.3 Inoculación de AgN en la cámara anterior del ojo	22
7.4 Determinación del ciclo estral de las ratas	23
7.5 Lesión por compresión del nervio óptico	23
7.6 Procesamiento histológico del nervio óptico	24
7.7 Extracción de RNA de la retina.....	24
7.8 Síntesis del DNA complementario (cDNA)	25
7.9 Análisis de la expresión	26
7.10 Análisis estadístico	28
8. RESULTADOS.....	29
9. DISCUSIÓN	33
10. CONCLUSIÓN	37
11. BIBLIOGRAFÍA	38

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Moléculas que mantienen el inmunoprivilegio del ojo.....	5
2. Generalidades de las neurotrofinas.....	11
3. Generalidades de la oncomodulina	15
4. Reactivos utilizados para la síntesis de cDNA.	26
5. Protocolo de reacción para la síntesis de cDNA.	26
6. Reactivos utilizados para la amplificación del cDNA.	26
7. Oligonucleótidos de los genes utilizados.....	27
8. Protocolo de amplificación para las reacciones de PCR.	27

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Anatomía del sistema nervioso.....	3
2. Anatomía del globo ocular	5
3. Fisiopatología del daño al nervio óptico	6
4. Las neurotrofinas favorecen la supervivencia de las células ganglionares de la retina	13
5. Vías de señalización de Bcl-2 y caspasa-3	16
6. Se muestra el mecanismo de acción de la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo.....	17
7. Diagrama de Flujo. Muestra los grupos, procesos y periodos de tiempo evaluados para cumplir con los objetivos del presente proyecto.....	22
8. La inducción de desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo modula la expresión de neurotrofinas en ratas con lesión del nervio óptico	29
9. La inducción de desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo modula la expresión de factores de supervivencia en ratas con lesión del nervio óptico	30
10. La inoculación de antígenos neurales preserva la estructura tisular en el nervio óptico de ratas con lesión por compresión cuando se induce previo al daño	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAID	Desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo, del inglés associated chamber anterior immune deviation
AgN	Antígenos neurales.
Bcl-2	Del inglés, B-cell lymphoma.
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés brain-derived neuronal factor
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario, del inglés complementary deoxyribonucleic acid
CGR	Células ganglionares de la retina
CPA	Célula presentadora de antígeno
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero, del inglés messenger ribonucleic acid
NT-3	Neurotrofina-3
NT-4	Neurotrofina-4
OM	Oncomodulina
PBS	Buffer de fosfatos, del inglés phosphate buffered saline
Treg	Linfocitos T reguladores

RESUMEN

La desviación inmunológica asociada a la cámara anterior (ACAID) del ojo con antígenos neurales (AgN) reduce la pérdida de las células ganglionares de la retina (CGR) cuando es inducida previo a una lesión traumática del nervio óptico, debido en parte a su capacidad para regular la inflamación en el sitio del daño. Con el objetivo de determinar el mecanismo de acción de la ACAID con AgN para favorecer la supervivencia de las CGR, el presente trabajo evaluó su potencial neuroprotector mediante el análisis de los cambios en la expresión del mRNA de factores tróficos (*i.e.*, factor neurotrófico derivado del cerebro, BDNF; y neurotrofinas, NT-3 y NT-4), de supervivencia (*i.e.*, oncomodulina, OM; y B-cell lymphoma, Bcl-2) y muerte (*i.e.*, caspasa-3) en la retina a los 2 y 7 días postlesión del nervio óptico; así como mediante la preservación de la mielina en el nervio óptico a los 7 y 14 días postlesión. La ACAID fue inducida con AgN en ratas de la cepa Wistar. El grupo control fue inoculado con PBS. Un mes después de la inoculación, el nervio óptico izquierdo de todas las ratas fue lesionado mediante compresión, y 2 (PBS, n = 6; AgN, n = 6) y 7 (PBS, n = 6; AgN, n = 6) días más tarde la retina fue disecada para cuantificar la expresión del mRNA mediante qPCR. Un grupo adicional fue inoculado y lesionado como se refiere anteriormente (PBS, n = 3; AgN, n = 3), y las ratas fueron sacrificadas a los 14 días postlesión. Los nervios ópticos de las ratas a los 7 y 14 días postlesión fueron disecados, fijados, cortados longitudinalmente y teñidos con luxol fast blue y con hematoxilina-eosina para evaluar la preservación de la mielina. Los resultados mostraron que la ACAID inducida con AgN modula diferencialmente la expresión de neurotrofinas y factores de supervivencia/muerte durante los periodos evaluados: a los 2 días incrementó BDNF ($t_{(6)} = -2.48$, $p < 0.05$) mientras a los 7 días incrementó NT-4 ($t_{(4)} = -7.46$, $p < 0.01$), y disminuyó BDNF ($t_{(4)} = 8.83$, $p < 0.001$), oncomodulina ($t_{(4)} = 24.89$, $p < 0.001$) y caspasa-3 ($t_{(4)} = 5.80$; $p < 0.01$). Adicionalmente, el análisis cualitativo de la tinción para fosfolípidos en el sitio del daño sugiere que la inoculación de AgN en la cámara anterior del ojo preserva la mielina a los 7 y 14 días postlesión. En conjunto, los resultados obtenidos en el presente proyecto

permiten concluir que el potencial neuroprotector de la ACAID con AgN está relacionado con la regulación diferencial de los factores neurotróficos y apoptóticos durante el curso de la lesión, así como con el mantenimiento de la mielina en el sitio del daño.

Palabras Clave: Degeneración neuronal secundaria, inflamación, inmunotolerancia, neurotrofinas, ACAID.

ABSTRACT

Anterior Chamber Associated Immune Deviation (ACAID) using neural antigens (AgN) reduces the loss of retinal ganglion cells (RGC) when induced prior to optic nerve lesion, due in part to its ability to regulate inflammation at the injury site. In an attempt to determine the mechanism of action of ACAID, this work evaluated its neuroprotective effect through the expression of mRNA of trophic (*i.e.*, brain-derived neurotrophic factor of the brain, BDNF; and neurotrophins, NT-3 and NT-4), survival (*i.e.*, oncomodulin, OM; and B-cell lymphoma, Bcl-2) and death factors (*i.e.*, caspase-3) in the retina at days 2nd and 7th postinjury of the optic nerve; as well as through the preservation of the myelin in the optic nerve at 7th and 14th days postinjury. ACAID was induced using AgN in Wistar rats. The control group was inoculated with PBS. A month after the inoculation, left optic nerve was injured by compression. Retina was dissected to quantify the expression of mRNA using qPCR at days 2nd (PBS, n = 6; AgN, n = 6) and 7th postinjury (PBS, n = 6; AgN, n = 6). An additional group was inoculated and injured as mentioned previously (PBS, n = 3; AgN, n = 3), and rats were sacrificed at day 14th postinjury. The optic nerves of rats at days 7th and 14th postinjury were dissected, fixed, cut lengthwise and stained with luxol fast blue and hematoxylin-eosin to evaluate the preservation of myelin. The results showed that in the AgN induced group, ACAID differentially modulates the expression of neurotrophins and survival/death during the assessed periods: at days 2nd increased BDNF ($t_{(6)} = -2.48$, $p < 0.05$) while at 7th increased NT-4 ($t_{(4)} = -7.46$, $p < 0.01$), and decreased BDNF ($t_{(4)} = 8.83$, $p < 0.001$), OM ($t_{(4)} = 24.89$, $p < 0.001$) and caspase-3 ($t_{(4)} = 5.80$; $p < 0.01$). In addition, qualitative analysis of staining for phospholipids in the site of the damage suggests that inoculation of AgN in the anterior chamber of the eye preserves myelin at days 7th and 14th postinjury. Altogether, the results obtained in this project suggest that the neuroprotective effect of ACAID using AgN is related to differential regulation of apoptotic and neurotrophic factors during the course of the injury, as well as with the maintenance of the myelin sheath at the site of damage.

Key words: Secondary neuronal degeneration, inflammation, immunotolerance, neurotrophins, ACAID.

1. INTRODUCCIÓN

Las patologías neurodegenerativas, entre las que se encuentran las enfermedades glaucomatosas así como los accidentes vasculares y traumáticos en el nervio óptico, han incrementado su incidencia en el mundo (Barranco, 2016; Abril et al., 2004; Llibre y Guerra, 1999). Durante la progresión de estas patologías se lleva a cabo la activación del sistema inmunológico. Sin embargo, debido a que el sistema nervioso central (SNC) es considerado un órgano inmunoprivilegiado, la respuesta inflamatoria es atenuada y poco eficaz para promover la reparación tisular, por lo que se convierte en una inflamación crónica capaz de incrementar el daño neuronal secundario (Kumar y Loane, 2012; Guimarães et al., 2009; Suárez-Morales, 2008; Bernhardt, 2004).

Actualmente no se dispone de tratamientos capaces de evitar la muerte neuronal después de un traumatismo en el SNC, aunque muchos de ellos se encuentran en fase de investigación (Fernández-Gómez et al., 2008; Jordán, 2003). Una posible estrategia preventiva es la inducción de inmunotolerancia con antígenos derivados del SNC mediante un fenómeno conocido como desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo (ACAID del inglés, anterior chamber associated immune deviation). Recientemente el potencial de esta estrategia ha sido evaluado mediante la inoculación de un coctel de antígenos neurales (AgN) previo a una lesión del nervio óptico en ratas. Los resultados obtenidos muestran que la inoculación de AgN favorece la supervivencia de las células ganglionares de la retina (CGR) cuyos axones son lesionados por compresión. Este efecto está mediado, al menos en parte, por la atenuación de la respuesta inflamatoria tanto en el sitio del daño como en la retina (González-Cárdenas, 2018; Martínez-Alcantar et al., *en revisión*). En un intento por determinar el mecanismo de acción de la ACAID con AgN para favorecer la supervivencia de las CGR, el presente trabajo evaluó su potencial neuroprotector mediante la expresión del mRNA de neurotrofinas (*i.e.*, factor neurotrófico derivado del cerebro, BDNF; y neurotrofinas, NT-3 y 4), factores de supervivencia (*i.e.*, B-cell lymphoma, Bcl-2 y oncomodulina, OM) y muerte (*i.e.*,

caspara-3) en la retina durante los días 2 y 7 postlesión del nervio óptico en ratas hembra adultas. Además, este trabajo evaluó la preservación de la mielina a los 7 y 14 días postlesión. Los resultados obtenidos del presente proyecto contribuirán a describir mejor el efecto de la ACAID inducida con AgN después de una lesión del SNC y a evaluar su valor potencial como estrategia neuroprotectora.

2. ANTECEDENTES

2.1 Características generales del sistema nervioso

De acuerdo a sus características anatómicas, el sistema nervioso se puede dividir en dos partes fundamentales: el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). El primero comprende una porción central formada por dos segmentos principales: uno superior, el encéfalo, contenido en la cavidad craneana, y otro inferior, la médula espinal, albergado en el conducto espinal. El SNC se comunica con los órganos que inerva por medio de cordones nerviosos, parte de los cuales emergen del encéfalo y constituyen los nervios craneales, en tanto que aquéllos que emergen de la médula espinal forman los nervios raquídeos. En conjunto estos nervios constituyen el SNP. Una excepción a esta regla es el nervio óptico, el cual en conjunto con la retina son considerados una prolongación del SNC (Figura 1) (Fortoul, 2013; Drake et al., 2010; Quiroz, 2004; O'Rahilly, 2000; Latarjet y Ruíz-Liard, 1999).

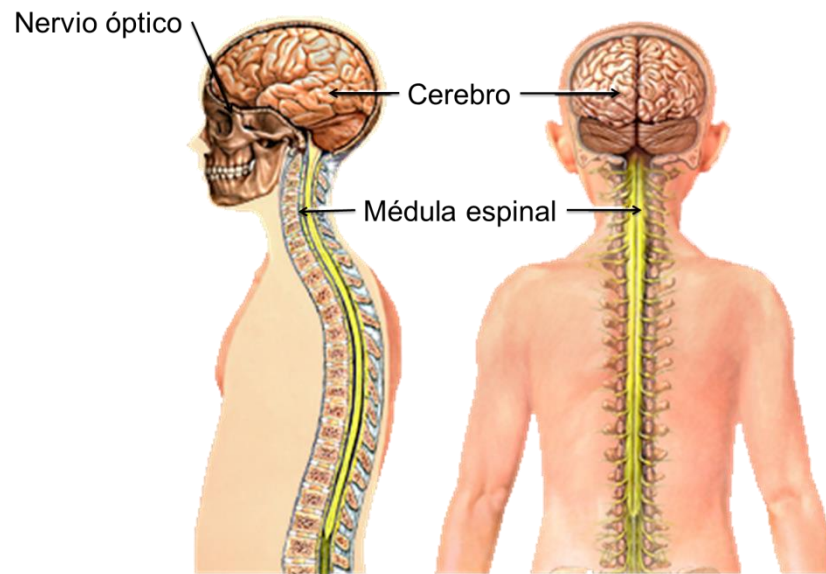


Figura 1. Anatomía del sistema nervioso. Vista lateral y posterior del sistema nervioso central del cual emerge el sistema nervioso periférico (Imagen tomada y modificada de internet).

La unidad funcional del sistema nervioso es la neurona, única célula del organismo que tiene la capacidad de recibir, almacenar y transmitir impulsos químico-eléctricos (Kumar et al., 2010). Además de las neuronas, las células

gliales constituyen una parte importante del SNC. La macroglía (astrocitos y oligodendrocitos), la microglía y las células del epéndimo proporcionan un soporte estructural, trófico y fisiológico a las neuronas. Tanto los astrocitos como la microglía son capaces de responder ante una lesión o enfermedad debido a que forman parte del sistema inmunológico propio del SNC (Sanz, 2012; Fitch y Silver, 2008; Kiernan, 2006; Chen y Swanson, 2003). La activación de estas células ante un estímulo es altamente controlada, ya que el SNC es considerado un órgano inmunoprivilegiado caracterizado por la presencia de la barrera hematoneural y mediadores que controlan la inflamación como el ligando inductor de apoptosis FAS, la presencia de inmunomoduladores como el factor de crecimiento transformante (TGF)- β , la interleucina (IL)-10 e inhibidores del sistema del complemento (De la Torre y Núñez, 2002), entre otros. Los oligodendrocitos, por su parte, son células con pocos procesos citoplasmáticos los cuales forman y mantienen la continuidad de las vainas de mielina para que se lleve a cabo la neurotransmisión de manera más eficiente (Fitch y Silver, 2008; Kiernan, 2006). Después de una lesión en el SNC se genera una desmielinización debido a la muerte de los oligodendrocitos (Gomes-Leal, et al., 2004), esto ocasiona la liberación de autoantígenos que son reconocidos por el sistema inmunológico produciendo una neurodegeneración crónico-inflamatoria (Ortega-Aznar et al., 2000).

2.2 Características generales de la vía visual

En dirección anteroposterior el ojo está constituido por la córnea, la cámara anterior, el iris, la cámara posterior, el cristalino, el cuerpo vítreo y la retina (Figura 2). La porción óptica de la retina que es sensible a la luz está constituida por una capa neural en donde las células ganglionares de la retina (CGR) reciben los impulsos eléctricos provenientes de la estimulación de los fotorreceptores y los envían a los centros visuales del cerebro (colículo superior, núcleo geniculado lateral y corteza occipital del cerebro) por medio de axones cubiertos de mielina que en conjunto forman el nervio óptico (Fortoul, 2013; Drake et al., 2010; Quiroz, 2004; O'Rahilly, 2000; Latarjet y Ruíz-Liard, 1999).

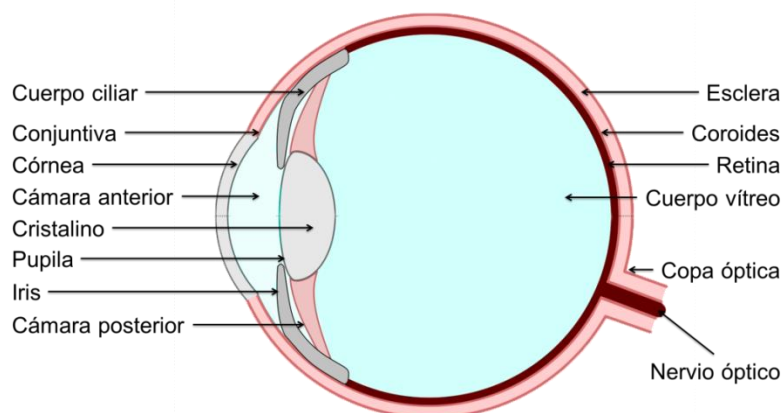


Figura 2. Anatomía del globo ocular. Vista lateral del globo ocular, en la imagen se señalan sus principales estructuras anatómicas (Imagen tomada y modificada de internet).

Tabla 1. Moléculas que mantienen el inmunoprivilegio del ojo.

Molécula	Mecanismo de acción
↓MHC I	Evasión de los linfocitos T citotóxicos
CGRP	Inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias en los macrófagos
CRP	Inhibe la cascada del complemento
FasL	Induce la apoptosis de los linfocitos T y neutrófilos activados
IDO	Reduce la cantidad de linfocitos T
MHC 1b	Inhibe la actividad de las células asesinas naturales y de los linfocitos T citotóxicos
MIF	Inhibe la actividad de las células asesinas naturales
PD-L1	Inhibe la proliferación e induce la apoptosis de los linfocitos T
SFasL	Suprime el reclutamiento y la activación de los neutrófilos
SOM	Inhibe la síntesis de IFN- γ de los linfocitos T e induce la producción de la α -MSH
TGF- β	Inhibe la actividad de los linfocitos T, las células asesinas naturales y macrófagos; induce tolerancia por medio de las células presentadoras de antígeno
TRAIL	Inhibe la proliferación e induce la apoptosis de los linfocitos T, macrófagos y neutrófilos
Treg	Inhibe la actividad de los linfocitos T
VIP	Inhibe la activación y proliferación de los linfocitos T e inhibe la respuesta de hipersensibilidad tipo IV
α -MSH	Inhibe la respuesta de hipersensibilidad tipo IV y la liberación de citocinas proinflamatorias de los macrófagos; inhibe la activación de los neutrófilos e induce células Treg CD4+ y CD25+

Además de estas moléculas, la barrera hematoneural (BHN) inhibe la infiltración de células del sistema inmunológico periférico al parénquima neuronal. CGRP, péptido relacionado con el gen de la calcitonina; CRP, proteínas reguladoras del complemento; IDO, indolamina dioxigenasa; IFN- γ interferón- γ ; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; MIF, factor inhibidor de la migración de macrófagos; PD-L1, ligando 1 de muerte programada; SFasL, FasL soluble; SOM, somatostatina; TGF- β , factor de crecimiento transformante β ; TRAIL, ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF); Treg, linfocitos T reguladores;

VIP, péptido intestinal vasoactivo; α -MSH, hormona estimuladora de los melanocitos (Nieder Korn, 2012; *modificado*).

El ojo es considerado un órgano inmunoprivilegiado debido a que posee mecanismos que controlan la respuesta inflamatoria (Tabla 1) (Nieder Korn, 2012), de lo contrario, podría sufrir lesiones irreparables con la consecuente pérdida de la visión (Kumar et al., 2010).

2.3 Fisiopatología de la lesión del sistema nervioso central

Las patologías neurodegenerativas, así como los accidentes vasculares y traumáticos del cerebro, nervio óptico y médula espinal, han incrementado su incidencia en el mundo. En particular, todas las formas de lesión al ojo, incluidos el trauma cerrado o penetrante, el glaucoma, las neuropatías ópticas y los tumores que comprimen a cualquiera de las partes del ojo, conducen a la pérdida irreversible de la visión (Lima-Gómez, 2002). Lo anterior debido a que afectan la supervivencia de las CGR (Niwa et al., 2016), dañan la arquitectura de sus axones (Delfino et al., 2011) y desencadenan procesos inflamatorios y neurodegenerativos (Figura 3) (Almasieh et al., 2012).

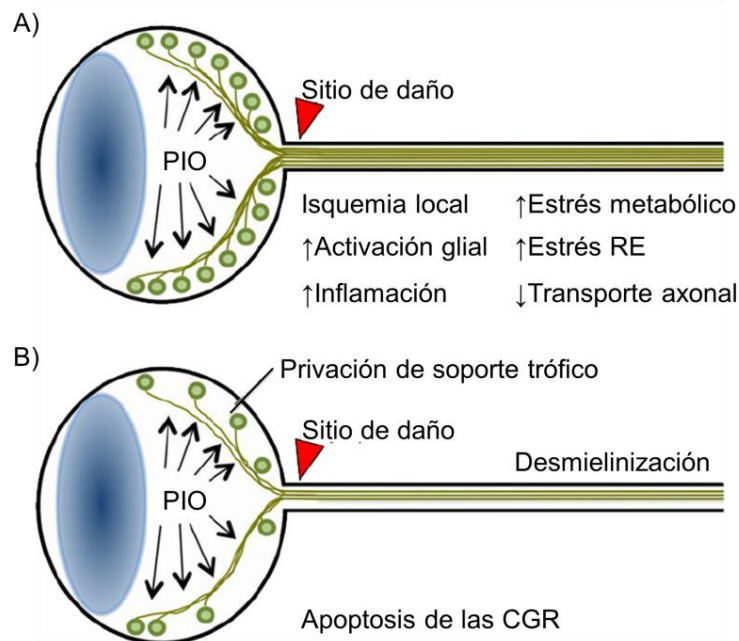


Figura 3. Fisiopatología del daño al nervio óptico. A) Eventos desencadenados después de una lesión por compresión del nervio óptico. B) Muerte de las células ganglionares de la retina (CGR) por eventos neurodegenerativos que conducen a la privación de soporte. PIO, presión intraocular; RE, retículo endoplásmico (Diekmann y Fischer, 2013; *modificado*).

De acuerdo a lo descrito en párrafos anteriores, la retina y el nervio óptico como parte del SNC, al igual que otros órganos y tejidos con escasa capacidad para restaurar sus poblaciones celulares después de un daño, son muy vulnerables a los efectos de la inflamación. Es importante señalar que el SNC tiene la capacidad para responder ante estímulos nocivos (*i.e.*, patógenos, enfermedades neurodegenerativas, trauma, etc.) desencadenando una respuesta inmunológica. Sin embargo, esta respuesta es atenuada, y al no ser controlada eficientemente puede dar lugar a eventos neurodegenerativos (Rumpel, 2018; Quesada-Yamasaki et al., 2016).

La fisiopatología de la lesión traumática al SNC ha sido bien caracterizada en modelos animales. Así, ha sido descrito que dentro de las primeras horas después de la lesión tiene lugar el reclutamiento microglial, el cual es estimulado por quimiocinas y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs del inglés, damage-associated molecular patterns) liberados por las células necróticas o en proceso de apoptosis (Mesa-Villanueva y Patiño, 2006; Matzinger, 2002). Las células microgliales son abundantes principalmente en la zona perilesión, donde retraen sus extensiones adquiriendo una forma ameboide y comienzan a fagocitar los restos celulares. En estas regiones, factores de transcripción como NF- κ B (del inglés, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) y la proteína activadora (AP)-1 promueven la expresión de genes que codifican para citocinas proinflamatorias (*i.e.*, las interleucinas IL-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral, TNF- α) (Ransohoff, 2006); quimiocinas (*i.e.*, CXCL-1, CCL-2 y CCL-5) (Blanco et al., 2015); moléculas de adhesión celular (*i.e.*, MCP-1, ICAM-1, ELAM-1 y p-Selectina) (Malagelada, 2003), así como proteínas de choque térmico (Hsps del inglés, heat shock proteins, *i.e.*, Hsp70 y Hsp27) (Franklin et al., 2005; Tezel et al., 2000). A las pocas horas después de la lesión aumenta la permeabilidad de la barrera hematoneural y se lleva a cabo la infiltración de neutrófilos, y dos días más tarde comienza la infiltración de los macrófagos. De esta manera se mantiene un ambiente inflamatorio que contribuye al proceso

neurodegenerativo y a la desmielinización (Kurimoto et al., 2013; Guimarães et al., 2009).

Por otra parte, el aumento del Ca^{2+} intracelular y la liberación de glutamato resultado del daño produce una desregulación en el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) en neuronas y oligodendrocitos. Este evento genera la formación del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial y conduce a la liberación del citocromo c de la membrana interna de la mitocondria, así como de factores que promueven la activación de las caspasas y proteínas Smac/Diablo (del inglés, second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI) capaces de activar la vía de señalización intrínseca de la apoptosis (Lin y Beal, 2006; Leist y Jäätelä, 2001; Nickells, 1999). Una vez liberado el citocromo c, se une y activa al factor activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1 del inglés, apoptotic protease activating factor-1) en el citoplasma, lo que promueve que Apaf-1 se una a ATP/dATP formando de esta manera el apoptosoma, el cual media la activación de la caspasa-9, y esta a su vez activa a la caspasa efectora, la caspasa-3. Por otro lado, también se activan las proteasas, lipasas y nucleasas (Becerra y Pimienta, 2009; Rojas et al., 2009; Chan, 2004; Cascales, 2003).

La mitocondria también puede generar la formación de radicales libres, especies reactivas de oxígeno y la activación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS del inglés, inducible nitric oxide synthase) para la producción de especies reactivas de nitrógeno. En conjunto, estos eventos conducen a la peroxidación lipídica, a la activación de la caspasa-3 y finalmente a la apoptosis (Wen et al., 2011; Nagley et al., 2009; Jassem et al., 2002; Olanow, 1993).

Otro evento que ocurre en el sitio del daño es la activación de la ciclooxygenasa capaz de promover la síntesis de prostaglandinas, a través de la oxidación del ácido araquidónico (Martínez-Canabal y Rivas-Arancibia, 2005; García y Gómez, 2000). Además, se lleva a cabo la condensación de la cromatina y la expresión de marcadores de fagocitosis en la superficie celular de la microglía, lo que perpetúa los eventos inflamatorios (Leist y Jäätelä, 2001).

A medida que continúa el proceso de licuefacción y fagocitosis, los astrocitos aumentan progresivamente de tamaño en los bordes de la lesión, se dividen y desarrollan una red prominente de extensiones citoplasmáticas que forman la cicatriz glial (Kumar et al., 2010).

La muerte de las CGR comienza a ser evidente a partir del día 4 después de una lesión por compresión del nervio óptico (cuando el 30% de las CGR han muerto), y llega a su máximo entre los días 7 y 14 postlesión cuando mueren entre el 50% y 90% de las CGR (Yin et al., 2003; Berkelaar et al., 1994). Por su parte, la desmielinización también es un proceso activo que ocurre como resultado de la muerte apoptótica de oligodendrocitos, lo que conduce a la pérdida de soporte trófico, además de la evidente alteración en la conducción del impulso nervioso, la desmielinización y la liberación de autoantígenos. Entre estos últimos destacan la proteína proteolipídica (PLP del inglés, proteolipid protein), la proteína básica de mielina (MBP del inglés, myelin basic protein), la glicoproteína asociada a la mielina (MAG del inglés, myelin-associated glycoprotein), la glicoproteína de mielina de los oligodendrocitos (MOG del inglés, myelin-oligodendrocyte glycoprotein) y la 2':3'-ciclo nucleótido-3'-fosfodiesterasa (CNP del inglés, 2':3'-cyclic nucleotide-3-phosphodiesterase) (Morell y Quarles, 1999).

Además de estas proteínas liberadas por los oligodendrocitos en respuesta al daño, existen otras proteínas derivadas de astrocitos (*i.e.*, S100b y neurofilamentos) y neuronas (Gutiérrez-Álvarez, 2006; Méndez, 2005) que pueden ser sensadas como AgN y desencadenar respuestas inmunológicas mediadas por linfocitos T y B. Una vez activados, los linfocitos son capaces de incrementar los procesos de inflamación a través de la liberación de citocinas (*i.e.*, IL-1, IL-6, IFN- γ e IL-17) así como del reclutamiento de neutrófilos y macrófagos (Guimarães et al., 2009). Estos procesos inflamatorios se vuelven crónicos y favorecen el desarrollo de eventos neurodegenerativos (Sobrinho et al., 2013; Glass et al., 2010; Block y Hong, 2005).

Se ha demostrado que MAG y MOG, así como otras proteínas asociadas a la mielina y a la cicatriz glial como proteoglicanos, efrina-B3, semaforina (Sema)5A, Sema4D, netrina-1, Sema3A y Slit-1, inhiben el crecimiento axonal (Abe y Cavalli, 2008; Benowitz y Yin, 2008). Algunas de estas proteínas como PLP, MAG y MOG, entre otras, también están asociadas a enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, el síndrome de Guillain-Barré, la encefalitis experimental autoinmune y la neuritis alérgica experimental, lo que demuestra su potencial encefalitogénico (Guadarrama-Ortiz et al., 2014; Lagumersindez et al., 2009; Ávila-Funes et al., 2002).

Los procesos de reparación tisular comienzan en el tejido a las 2 semanas postlesión mediados por la inducción de linfocitos T reguladores (Treg) capaces de atenuar la inflamación en el sitio del daño (González-Cárdenas, 2018; Sakaguchi et al., 2008). Adicional a ello, se lleva a cabo la polarización de los macrófagos, M1 a M2 y de los neutrófilos de N1 a N2, los cuales promueven la regeneración tisular (Liu et al., 2018; Zhou et al., 2014; David y Kroner, 2011). Esta fase se caracteriza por la eliminación final de todo el tejido necrótico, la pérdida de la estructura normalmente organizada y la formación de la cicatriz glial. Después de varios meses, la respuesta astrocitaria también se desvanece, dejando una red densa de fibras gliales mezcladas con nuevos capilares y tejido conjuntivo perivascular (Kumar et al., 2010).

2.4 Factores neurotróficos y su función en el sistema nervioso central

Los factores neurotróficos o factores de crecimiento conforman un grupo de polipéptidos y proteínas que promueven y regulan el crecimiento, el desarrollo, la proliferación, la migración y la supervivencia de las células neuronales y la glía. Además, intervienen en la plasticidad morfológica y funcional mediante la regulación de la síntesis y liberación de neurotransmisores (Hernández-Muela et al., 2004).

El factor de crecimiento nervioso (NGF del inglés, nerve growth factor) fue el primer factor neurotrófico identificado (Balaratnasingam y Janca, 2012). Actualmente se conocen cuatro grupos de neurotrofinas que se han identificado

en humanos: NGF, BDNF, NT-3 y NT-4, esta última también conocida como NT-4/5. Todas estas proteínas provienen de un gen ancestral en común, y debido a que poseen similitudes en secuencia y estructura colectivamente son nombradas como “neurotrofinas” (Nilsson et al., 1998).

Los efectos de las neurotrofinas están mediados por dos clases de receptores de superficie celular. Todos los miembros de la familia NGF interactúan con un receptor de baja afinidad, una proteína transmembranal de 75 kDa sin función catalítica; p75^{NTR} (NTR del inglés, neurotrophin receptor), y con receptores de alta afinidad, los cuales son distintos miembros de una subfamilia de receptores tirosina quinasas conocidos como Trk (del inglés, tropomyosin related kinase). El NGF es el ligando específico para TrkA, mientras que BDNF y NT-4 activan preferentemente a TrkB, y NT-3 activa a TrkC y en menor medida a TrkB (Tabla 2) (Candalija, 2015; Flórez y Pazos, 2014; Castillo-Padilla y Rivas-Arancibia, 2011).

Tabla 2. Generalidades de las neurotrofinas.

Neurotrofina	Receptor	Ejemplos de células diana en el sistema nervioso
BDNF	TrkB, p75 ^{NTR}	Células ganglionares de la retina, neuronas colinérgicas de los núcleos basales, neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, motoneuronas, estriato-gabaérgicas y sensoriales periféricas pequeñas
NT-3	TrkC, p75 ^{NTR} ↓TrkB	Células ganglionares de la retina, neuronas colinérgicas, núcleos basales, <i>locus coeruleus</i> , dopaminérgicas del mesencéfalo, estriato-gabaérgicas y sensoriales grandes
NT-4	TrkB, p75 ^{NTR}	Células ganglionares de la retina, neuronas colinérgicas, núcleos basales, <i>locus coeruleus</i> , dopaminérgicas del mesencéfalo, estriato-gabaérgicas, motoneuronas, sinápticas y sensoriales periféricas

Se muestra la acción de las neurotrofinas en diferentes estructuras del sistema nervioso. Por medio de sus receptores las neurotrofinas promueven la supervivencia, proliferación, plasticidad neuronal y sináptica así como procesos de apoptosis en sus células diana (Flórez y Pazos, 2014; *modificado*). Una vez que se activan los receptores se lleva a cabo la activación de diferentes cascadas de señalización las cuales pueden promueven la supervivencia o la apoptosis neuronal. Entre ellas encontramos: PI3K/Akt, MEK-1, MEK-2, MEK-5, Jak-1, Jak-2 y Jak-3 (Yin et al., 2006).

Una menor expresión de neurotrofinas en diferentes lugares del cerebro se ha asociado a diferentes patologías neurológicas y neuropsiquiátricas (Nizama, 2011; Armas et al., 2010; Bernhardt, 2005; González-Torres y Armendáriz-Borunda, 2005). En el caso de la vía visual, las neurotrofinas son transportadas de forma continua, retrógradamente desde los centros visuales y el colículo superior del cerebro hasta el soma de las CGR. La interrupción del flujo axoplásmico, con la consiguiente alteración del transporte de las neurotrofinas compromete la supervivencia de las CGR e inicia los procesos apoptóticos (Figura 4) (Almasieh et al., 2012; Von-Bartheld, 1998). Los oligodendrocitos por su parte proporcionan soporte trófico a las CGR pero disminuye a medida que los oligodendrocitos van degenerándose (Meyer-Franke et al., 1995). Las neurotrofinas también son liberadas por las CGR, las células de la lámina cribosa, los astrocitos que se encuentran en la cabeza del nervio óptico y las células de Müller localizadas en la retina, lo que sugiere que estas células son las que favorecen la supervivencia de las CGR debido a que generan un soporte trófico de manera autocrina y paracrina después de una lesión en el nervio óptico (Foldvari et al., 2016; Gallego et al., 2013; Weber et al., 2008; Oku et al., 2002).

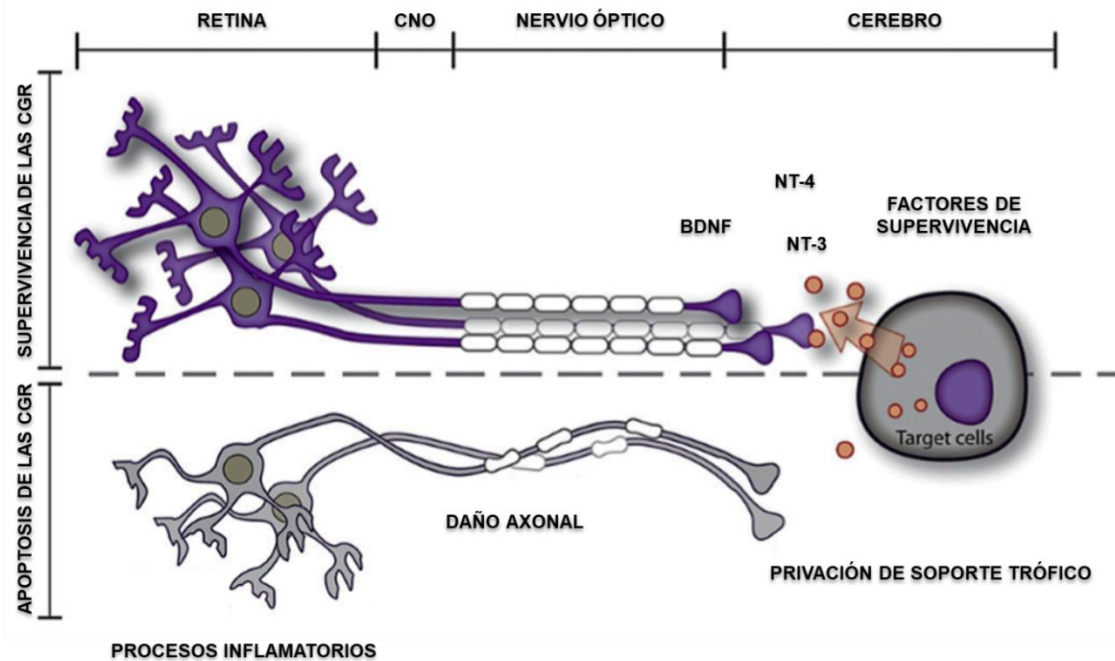


Figura 4. Papel de las neurotrofinas en la supervivencia de las células ganglionares de la retina. Bajo condiciones fisiológicas las neurotrofinas son transportadas de forma retrógrada desde los centros visuales del cerebro hasta la retina (Target cells; panel superior). Sin embargo, cuando este soporte es interrumpido se promueve la apoptosis celular y procesos inflamatorios (panel inferior). CGR, células ganglionares de la retina; CNO, cabeza del nervio óptico (Almasieh, 2012; *modificado*).

Como ya se mencionó anteriormente, los factores neurotróficos ejercen sus acciones a través de un sistema dual de receptores, que comprende el receptor Trk y $p75^{NTR}$. Cuando las neurotrofinas activan a ambos receptores pueden potenciar las vías de transducción de señales generando un efecto trófico y neuroprotector (Bernhardi, 2004). Sin embargo, cuando las neurotrofinas se unen a $p75^{NTR}$ en ausencia del receptor Trk se activan vías de señalización que promueven la muerte celular (Escudero, 2012; Yoon et al., 1998). Este equilibrio entre la interacción y actividad de ambos tipos de receptores es determinante en la supervivencia neuronal. En condiciones de daño Trk puede disminuir, mientras que $p75^{NTR}$ aumentar (Friedman, 2000), lo que conduce a la apoptosis celular mediada por $p75^{NTR}$ (Meeker y Williams, 2015; Ibáñez y Simi, 2012; Marín-Teva et al., 2011; Schecterson y Bothwell, 2010; Teng et al., 2010; Miller y Kaplan, 2001).

Además de lo anterior, ha sido descrito que los factores neurotróficos promueven la proliferación, reparación y la supervivencia celular bajo

condiciones fisiológicas cuando predomina un ambiente en equilibrio de óxido-reducción (REDOX), mientras que un estado constante de estrés oxidativo dará como resultado la muerte de las células. Esto debido a que las cascadas de señalización como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK del inglés, mitogen-activated protein kinase) y la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K del inglés, phosphatidylinositol-3-kinase) pueden ser activadas tanto por especies reactivas de oxígeno como por factores de crecimiento (Castillo-Padilla y Rivas-Arancibia, 2011). Se ha demostrado que las neurotrofinas BDNF, NT-3 y NT-4 son capaces de atenuar la apoptosis así como potenciar la necrosis debido al estrés oxidativo o a la privación de nutrientes (Caviedes, 2011; Giri et al., 2004; Koh et al., 1995).

2.5 Factores de supervivencia y de muerte celular

Además de las neurotrofinas, existen otros factores capaces de promover la supervivencia neuronal como la oncomodulina (OM) o la proteína Bcl-2. La OM, es una proteína de unión al Ca^{2+} de 11.7 kDa que fue nombrada debido a su expresión en varios tumores y su parecido con la calmodulina. La OM presenta un sitio de baja afinidad para el Ca^{2+} y el Mg^{2+} , y un sitio de alta afinidad para el Ca^{2+} (Yin et al., 2006). La OM es un factor promotor del crecimiento para la regeneración del nervio óptico (Nakazawa et al., 2014); en presencia de cAMP elevado, la OM aumenta la capacidad de las RGC para regenerar axones *in vivo* e *in vitro* (Cui et al., 2008). Estudios previos proporcionan evidencia acerca de que los neutrófilos son una fuente importante de OM y pueden promover la regeneración de axones en el SNC (Kurimoto et al., 2013) y la supervivencia de las CGR (Tabla 3) (Yin et al., 2006).

El gen Bcl-2 codifica una familia de proteínas de 25 kDa que se localizan en la membrana externa mitocondrial, en la envoltura nuclear y en el retículo endoplásmico de las células, fue identificado por primera vez como el gen implicado en los linfomas B de células foliculares. Dentro de esta familia y de acuerdo a su estructura química se dividen en dos grupos de proteínas: las proapoptóticas (*i.e.*, Bax, Bad, Bak, Bcl-Xs y Bid) y las antiapoptóticas (*i.e.*, Bcl-

2, Bcl-xl, Mcl-1 y A1) (García et al., 2006; Cory y Adams, 2002). Una mayor expresión en Bcl-2 es eficaz para prevenir la degeneración de las CGR y promover su supervivencia (Bonfanti, 1996).

Así mismo, se ha reportado que los estrógenos tienen un papel neuroprotector debido a que pueden inducir la expresión de neurotrofinas y regular los procesos de apoptosis mediante diversos mecanismos (Simpkins et al., 2010; Angoa y Rivas, 2006; Wise, 2002).

Por otro lado, entre los factores capaces de inducir muerte celular se encuentran las caspasas, las cuales pertenecen a la familia de cisteín-proteasas, siendo la caspasa-3 uno de los principales operadores de la fase de ejecución final de la apoptosis. La forma activa se compone de 2 subunidades con pesos moleculares de 17 kDa y 12 kDa que se derivan de la división de una proenzima de 32 kDa (Zaa et al., 2012). La caspasa-3 tiene un efecto proapoptótico, que participa en una cascada de eventos que culminan en la muerte celular programada, por lo que es considerado un importante mediador de la muerte celular en numerosas enfermedades y daños en el SNC (Figura 5) (Bernhardi, 2004).

Tabla 3. Generalidades de la oncomodulina

Factor	Fuente	Ligando	Activación	Señalización
OM	Es secretada por los neutrófilos y los macrófagos	Posee dos ligandos para el Ca^{2+}	Aumenta su actividad en presencia de AMPc	CaMKII

Se muestran las principales características de la oncomodulina (OM) la cual puede promover la supervivencia y la regeneración neuronal por medio de vías de señalización independientes a la acción de las neurotrofinas. CaMKII, Ca^{2+} /calmodulina dependiente de la proteína quinasa II; AMPc, adenosín monofosfato cíclico (Yin et al., 2006).

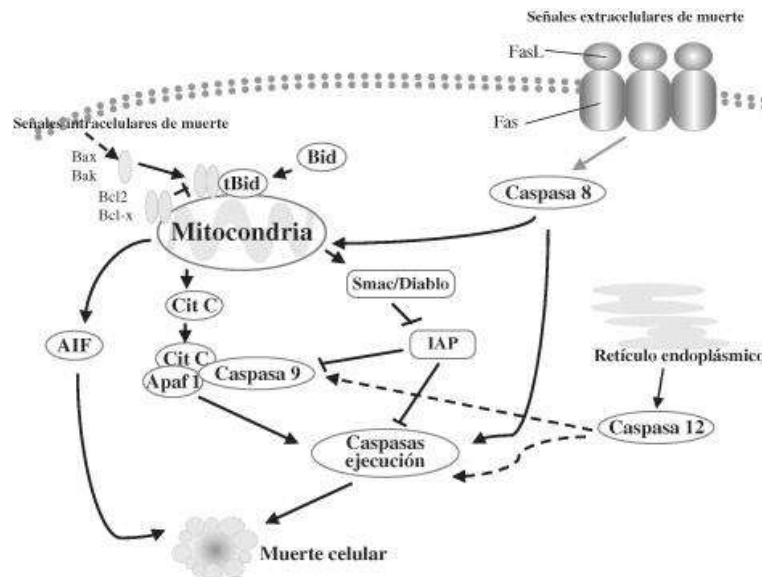


Figura 5. Vías de señalización de Bcl-2 y caspasa-3. Se muestra la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis, proceso desencadenado después de un daño en el sistema nervioso central. Nótese la participación de Bcl-2 (factor antiapoptótico) y de caspasa-3 (caspasa de ejecución, factor proapoptótico) en los procesos de muerte celular (Bernhardi, 2004).

2.6 Inmunotolerancia a los antígenos propios y neuroprotección

Actualmente no se dispone de fármacos que promuevan la supervivencia neuronal después de una lesión en el SNC o durante enfermedades neurodegenerativas que cursen con inflamación crónica; muchos de los medicamentos aún siguen en fase experimental y con otros no se han obtenido resultados concluyentes en estudios realizados en seres humanos (Rumpel, 2018; Chamorro et al., 2016; Xiong et al., 2015; Fernández-Gómez et al., 2008).

El principal objetivo de los tratamientos protectores para las neuropatías ópticas es incrementar la supervivencia de las CGR así como sus axones que sufren un proceso degenerativo y de esta manera, preservar su función (García et al., 2013; Weichsler y Herrera, 2010; Aktas et al., 2007).

Una posible estrategia neuroprotectora es la ACAID, un fenómeno capaz de inducir inmunotolerancia. Experimentalmente la ACAID inicia cuando se inoculan antígenos en la cámara anterior del ojo, los cuales son capturados por células presentadoras de antígeno (CPA F4/80+) y transportados al timo y al bazo, donde son presentados a poblaciones residentes capaces de inducir células Treg específicas de antígeno que limitan la respuesta de los linfocitos T

cooperadores (Th1 y Th2) de manera local como sistémica (Figura 6) (Marinovic, 2010; Hori, 2008; Lin et al., 2005; Faunce et al., 2001).

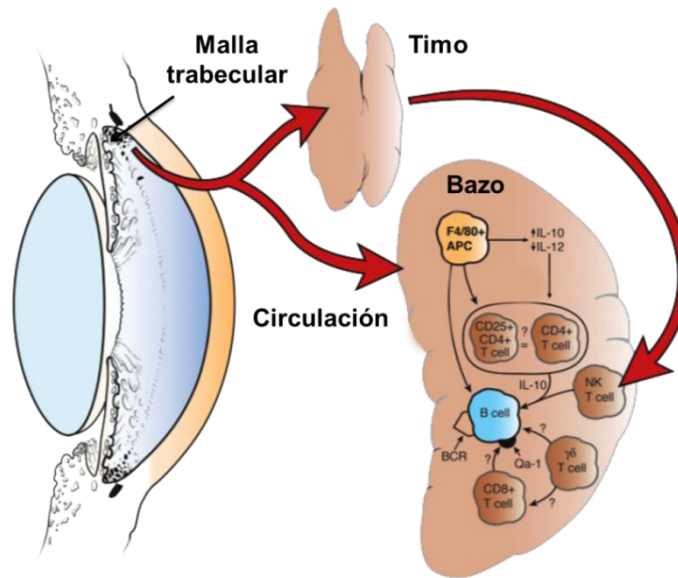


Figura 6. Se muestra el mecanismo de acción de la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo. **Fase ocular:** Después de que los antígenos son inoculados en la cámara anterior del ojo son reconocidos por células presentadoras de antígenos (CPA F4/80+), las cuales salen a través de la malla trabecular y entran en la circulación sanguínea para dirigirse hacia el timo y el bazo. **Fase tímica:** Las CPA F4/80+ inducen la generación de células CD4-, CD8- y NK1.1+ que posteriormente salen del timo y migran hacia el bazo. **Fase esplénica:** En la zona marginal del bazo es donde se lleva a cabo la presentación antigénica por medio de una sinapsis inmunológica entre las CPA F4/80+ y los linfocitos TCD4+, TCD8+, células B, NKT y γδ, en un microambiente regulador generado por la secreción de mediadores antiinflamatorios (i.e., TGF-β, IL-10, IL-12), así como la presencia de quimiocinas (i.e., CXCL2, CCL5) las cuales promueven el reclutamiento de más poblaciones celulares. Finalmente, las células Treg CD4+ inhiben la diferenciación de células Th1 de los nódulos linfoides mientras que las células Treg CD8+ inhiben la respuesta efectora Th1 y Th2 en el ojo. (Nieder Korn, 2012; modificado).

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

Debido a que uno de los principales promotores de la degeneración secundaria es la inflamación desencadenada y mantenida en el sitio del daño por la continua exposición de AgN y por el reclutamiento de poblaciones periféricas, nuestro grupo de trabajo ha propuesto la inducción de inmunotolerancia a AgN inducida mediante la ACAID como estrategia neuroprotectora capaz de evitar la autorreactividad y la muerte de las CGR en un modelo de lesión del nervio óptico (Toscano-Tejeida et al., 2016). El potencial de la ACAID como estrategia de inducción de tolerancia a largo plazo ha sido recientemente descrita (Pelayo et al., 2015).

Los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo muestran que la inducción de la ACAID con AgN previo a una lesión del nervio óptico en ratas, promueve la supervivencia de las CGR a los 7 y 14 días postlesión debido en parte a la polarización del microambiente retinal hacia un perfil predominantemente antiinflamatorio (Martínez-Alcantar et al., *en revisión*). Adicionalmente, los resultados de nuestro grupo sugieren que los efectos de la ACAID con AgN están mediados por el incremento en el reclutamiento de Treg Fox-P3+ y macrófagos CD68+ al sitio del daño, así como por el cambio de fenotipo de los macrófagos hacia un perfil neuroprotector M2 (Martínez-Alcantar et al., *en revisión*). Así, en un intento por entender el mecanismo mediante el cual la inducción de la ACAID con AgN favorece la supervivencia de las CGR, el presente trabajo evaluó su potencial neuroprotector mediante la expresión del mRNA de neurotrofinas (*i.e.*, factor neurotrófico derivado del cerebro, BDNF; y neurotrofinas, NT-3 y 4), factores de supervivencia (*i.e.*, B-cell lymphoma, Bcl-2 y oncomodulina, OM) y muerte (*i.e.*, caspasa-3) en la retina durante los días 2 y 7 postlesión del nervio óptico en ratas. Además, este trabajo evaluó la preservación de la mielina a los 7 y 14 días postlesión.

4. JUSTIFICACIÓN

El SNC tiene una capacidad limitada para repararse después de un daño. Los eventos inflamatorios desencadenados por la continua exposición y presentación de autoantígenos después de una lesión promueven un microambiente degenerativo capaz de promover la muerte celular. Hasta el momento se han probado diferentes estrategias farmacológicas que pretenden disminuir el daño neuronal secundario, sin embargo, ninguna de ellas ha llegado a la práctica clínica, y otras más aún se encuentran en fases de investigación.

Una posible estrategia neuroprotectora es la inducción de inmunotolerancia mediante un fenómeno conocido como ACAID. Recientemente nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la ACAID promueve la supervivencia de las CGR cuando se induce previo a una lesión por compresión del nervio óptico, debido en parte a la disminución de los procesos inflamatorios.

En un intento por determinar el mecanismo de acción de la ACAID inducida con AgN para favorecer la supervivencia de las CGR, el presente trabajo evaluó su potencial neuroprotector mediante el análisis de la expresión del mRNA de neurotrofinas, factores de supervivencia y muerte en la retina, así como mediante la preservación de la mielina en el nervio óptico.

5. HIPÓTESIS

La inducción de desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo con antígenos neurales previo a la lesión del nervio óptico en ratas tiene un efecto neuroprotector caracterizado por la sobreexpresión de factores neurotróficos y de supervivencia, la atenuación de la expresión de factores proapoptóticos en la retina y la preservación de la mielina en el nervio óptico.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto neuroprotector de la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo inducida con antígenos neurales en ratas con lesión del nervio óptico.

6.2 Objetivos particulares

- a) Determinar el efecto de la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo inducida con antígenos neurales sobre la expresión del mRNA de factores neurotróficos, de supervivencia y muerte en la retina de ratas con lesión del nervio óptico.
- b) Evaluar el efecto de la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo inducida con antígenos neurales sobre la preservación de la mielina en el nervio óptico de ratas con lesión.

7. METODOLOGÍA

7.1 Animales de experimentación

Los experimentos se llevaron a cabo con ratas hembra de la cepa Wistar de 4 y 10 semanas de edad, las cuales fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Los animales se mantuvieron en el bioterio en condiciones de luz/oscuridad (12/12 h), una temperatura constante (23 ± 2 °C), alimento granulado y agua disponible *ad libitum*.

El proyecto fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL-UNAM, No. de oficio: INV/B/RGC/184/17). Todos los procedimientos fueron realizados considerando la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 para la disposición final de los Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI).

7.2 Diseño experimental

Para cumplir con los objetivos del presente proyecto se emplearon 30 ratas hembra de la cepa Wistar que fueron seleccionadas al azar para formar un grupo control (PBS = 15) y un grupo experimental (AgN = 15). Cuando los animales cumplieron un mes de nacidos el grupo control fue inoculado en la cámara anterior de ambos ojos con solución PBS y el grupo experimental con una fracción soluble de AgN procedentes de la médula espinal de ratas sin tratamiento. Un mes después, cuando los animales alcanzaron un peso promedio de 220 g y en fase diestro, a ambos grupos se les lesionó el nervio óptico izquierdo y finalmente 2, 7 y 14 días postlesión fueron sacrificados ambos grupos y se les disecó la retina y el nervio óptico para su análisis.

De acuerdo a los procesos fisiopatológicos e inmunológicos que son originados después de un evento traumático en el SNC se consideraron 2, 7 y 14 días posteriores a una lesión del nervio óptico para determinar el posible efecto

neuroprotector de la ACAID por medio de la expresión genética y el análisis histológico (Figura 7).

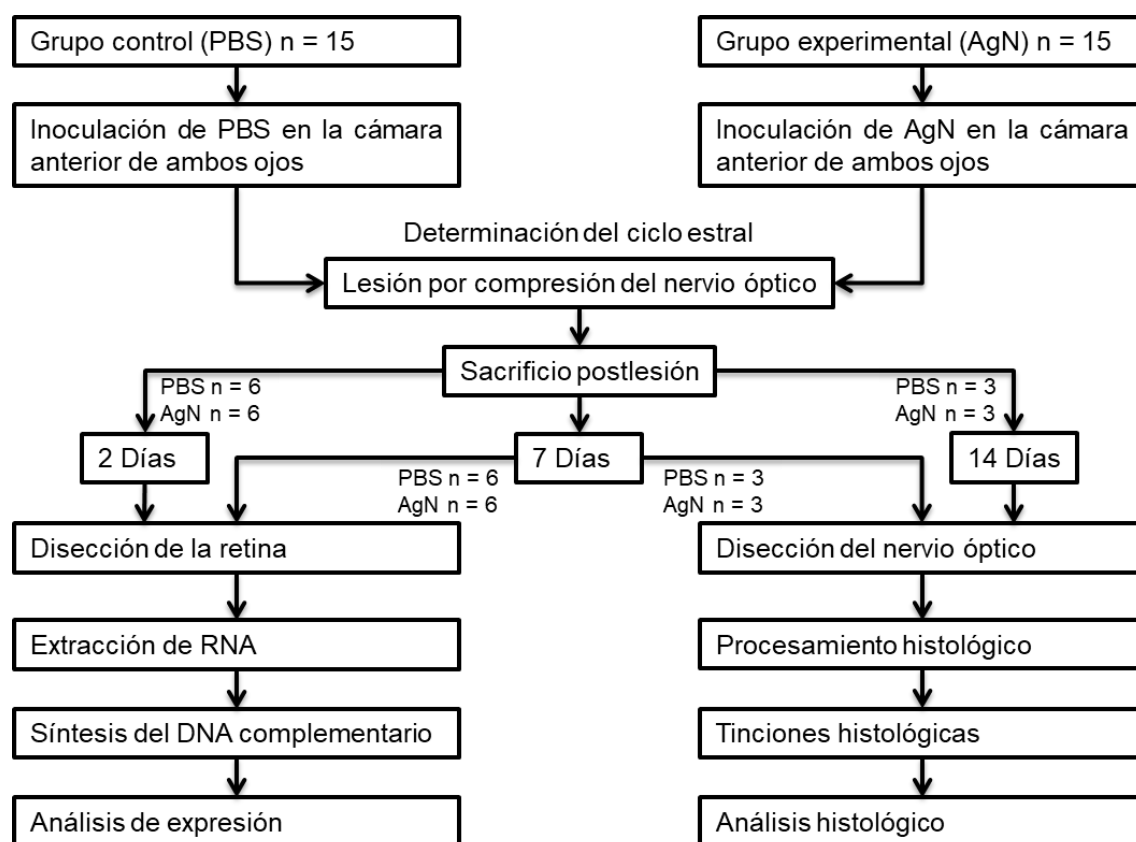


Figura 7. Diagrama de Flujo. Muestra los grupos, procesos y periodos de tiempo evaluados para cumplir con los objetivos del presente proyecto.

7.3 Inoculación de AgN en la cámara anterior del ojo

Para la inducción de la ACAID se utilizaron ratas de cuatro semanas de edad, las cuales fueron anestesiadas sistémicamente mediante una inyección intraperitoneal (I.P.) de ketamina (70 mg kg^{-1}) y xilazina (8 mg kg^{-1}) en solución salina inyectable. Como anestésico local se utilizó solución oftálmica de paracaína-HCl. Las ratas control fueron inoculadas en la cámara anterior de ambos ojos con $10 \text{ }\mu\text{l}$ de vehículo (PBS estéril) mientras que las ratas experimentales fueron inoculadas con $10 \text{ }\mu\text{l}$ de AgN ($6 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$) procedentes de la médula espinal de ratas adultas (Yang et al., 2010; Gil-Dones et al., 2009, *protocolo modificado por Martínez-Alcantar et al., en revisión*), con una microjeringa Hamilton aguja de 33 Gauge (Ga) y utilizando un microscopio

estereoscópico. Los ojos de los animales se mantuvieron hidratados con solución salina estéril (Talavera-Carrillo, 2015).

7.4 Determinación del ciclo estral de las ratas

En un intento por descartar la posible acción neuroprotectora de los estrógenos endógenos previo a la lesión del nervio óptico se tomó una muestra de exudado vaginal de cada uno de los animales empleados, se hizo un frotis en portaobjetos y se fijó con metanol. Posteriormente se realizó una tinción de hematoxilina y eosina, para lo cual las muestras se incubaron durante 40 s en hematoxilina (tinción nuclear), se lavaron, se incubaron 2 min en etanol al 80% y se tiñeron 5 min con eosina (tinción citoplasmática). Después de la tinción se deshidrataron con etanol de concentración creciente (95%, 95%, 100%, 100%, 2 min en cada uno) y por último, se aclararon con xileno. El montaje se realizó con resina, medio soluble en xilol (Prophet et al., 1992; *protocolo modificado*). La determinación del ciclo estrogénico de los animales utilizados se realizó de acuerdo a la morfología celular, así como a la cantidad de células presentes (McLean et al., 2012, *protocolo modificado*).

7.5 Lesión por compresión del nervio óptico

La lesión del nervio óptico se realizó cuando los animales cumplieron dos meses de edad, con un peso promedio de 220 g y en fase de diestro. Para ello, ambos grupos experimentales fueron anestesiados como se menciona previamente, así como con anestesia oftálmica local. Los ojos se mantuvieron hidratados con solución salina estéril durante y después de la cirugía. Se realizó una cantotomía ocular del lado izquierdo, posterior a ello el nervio óptico se separó del suministro vascular levantándolo dorso-lateralmente. Una vez expuesto, el nervio fue lesionado a 3 mm distales a la copa óptica ejerciendo presión con unas pinzas de autocierre durante 5 s. Después de la lesión del nervio óptico se administró ungüento oftálmico de politriacina (neomicina, 4.5 mg; polimixina, 5550ul y bacitracina, 400ul; Laboratorio Santgar) de uso veterinario así como una dosis diaria de analgésico vía oral (paracetamol 200 mg kg⁻¹; Tempra pediátrico) (Pineda, 2017).

7.6 Procesamiento histológico del nervio óptico

A los 7 y 14 días después de la lesión del nervio óptico, las ratas fueron anestesiadas con una dosis terminal de pentobarbital sódico y sus nervios ópticos fueron disecados, fijados en paraformaldehído al 4% en solución PBS durante 24 h. Las muestras se lavaron con solución PBS, se deshidrataron en series crecientes de etanol (95%, 95%, 100%, 100%, 30 min en cada uno), se aclararon (en xileno durante 15 min), se impregnaron (12 h a 60 °C) y se incluyeron en parafina (Prophet et al., 1992; *protocolo modificado*). Se realizaron cortes histológicos en un micrótopo rotatorio (LEICA, Modelo RM2125RTS), las secciones del tejido fueron cortadas de manera longitudinal a 7 µm. Los cortes fueron colocados en portaobjetos electrocargados y gelatinizados, y teñidos con luxol fast blue (azul de luxol rápido MBS, Hycel, Cat. No.: 2653) para identificar los fosfolípidos de la mielina. Para ello, los cortes fueron desparafinizados en una estufa a 60 °C durante 2 h, se incubaron en xileno 15 min y el tejido fue hidratado utilizando una serie decreciente de etanol (100%, 100%, 95%, 95%, 2 min en cada uno). Los cortes de nervio óptico fueron incubados en el colorante luxol fast blue durante 12 h a 60 °C, y posteriormente la tinción fue aclarada con carbonato de litio (Li_2CO_3 0.03%) durante 1 h (Goto, 1987; *protocolo modificado*). Adicional a ello, se realizó una segunda tinción con hematoxilina y eosina. Después de esto, la deshidratación, el aclaramiento así como el montaje de las muestras se llevó a cabo como se describe anteriormente. El análisis histológico se realizó en un microscopio óptico con cámara digital incorporada (LEICA, Modelo: DM3000). Para la captura de imágenes se utilizó el Software *Leica Application Suite* versión 3.8 (LAS V3.8).

7.7 Extracción de RNA de la retina

A los 2 y 7 días posteriores a la lesión del nervio óptico, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico vía I.P., sus ojos fueron enucleados e inmediatamente se extrajo la retina del ojo lesionado. Los

tejidos fueron incubados por separado en 300 µl de *RNAlater*® (Sigma-Aldrich, Cas: 7783-20-2) y se mantuvieron a -70 °C hasta su procesamiento.

El RNA total de la retina se obtuvo mediante el método de extracción por TRIzol® siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los tejidos se incubaron en 500 µl de TRIzol, se homogeneizaron y se incubaron por 5 min a una temperatura de 4 °C. Se agregaron 100 µl de cloroformo, se homogeneizó y se incubó 3 min a temperatura ambiente, centrifugando luego a 12,000 *g* por 15 min a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un vial, se agregaron 250 µl de isopropanol frío, se homogeneizó en un vortex durante unos segundos, se incubó durante 10 min y se centrifugó a 12,000 *g* por 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla de RNA se lavó dos veces con 500 µl de etanol 75%, se homogeneizó y se centrifugó a 7,500 *g* durante 5 min a 4 °C, en cada lavado. Se descartó el sobrenadante, se dejó secar el pellet 5 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µl de agua libre de RNAsas y DNAsas (Thermo Fischer Scientific, 2016; *protocolo modificado*). La concentración del RNA obtenido se cuantificó con el espectrofotómetro *Nanodrop Lite* (Thermo Fisher Scientific, Modelo: 3A-186DN06). La pureza del RNA en cada una de las muestras se determinó por medio de la relación de absorbancia A260/A280.

7.8 Síntesis del DNA complementario (cDNA)

La retrotranscripción de cada muestra se realizó con el Kit de síntesis de cDNA (Bio-Rad, iScrip™ Adv cDNA Kit for RT-qPCR, Cat. No.: 172-5038) siguiendo el protocolo del fabricante (Tabla 4) en un termociclador (Bio-Rad, Modelo: CFX96™), bajo condiciones de tiempo y temperatura que se señalan en la Tabla 5. Como control negativo se utilizó una reacción con agua libre de RNAsas y DNAsas (Bio-Rad Laboratories).

Tabla 4. Reactivos utilizados para la síntesis de cDNA.

Componente	Volumen por reacción
Mix de reacción 5X iScript Advanced	4 µl
Retrotranscriptasa iScript Advanced	1 µl
RNA (100 fg - 7.5 µg)	Variable
Agua libre de RNAsas cbp	20 µl

Tabla 5. Protocolo de reacción para la síntesis de cDNA.

Condición	Temperatura	Tiempo
Retrotranscripción	46 °C	20 min
Inactivación de la RT	95 °C	1 min

7.9 Análisis de la expresión

El análisis de la expresión génica de las neurotrofinas BDNF, NT-3 y NT-4, así como de los factores de supervivencia/apoptosis OM, Bcl-2 y caspasa-3, se realizó por medio de PCR en tiempo real, para lo cual se preparó la mezcla de reacción que se indica en la Tabla 6 conforme a las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories). Las reacciones fueron realizadas por duplicado para cada gen y por cada muestra de retina en un termociclador (Bio-Rad, Modelo: CFX96™). Los oligonucleótidos utilizados (Tabla 7) fueron validados previamente en retinas de ratas sin tratamiento y las condiciones del ciclado se indican en la Tabla 8.

Tabla 6. Reactivos utilizados para la amplificación del cDNA.

Componente	Volumen por reacción
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (2X)	5 µl
Forward Primer [10 ng/µl]	1 µl
Reverse Primer [10 ng/µl]	1 µl
cDNA [250 ng/µl]	1 µl
Agua libre de RNAsas	2 µl

Tabla 7. Oligonucleótidos de los genes utilizados.

Gen	Dirección y secuencia	Pb	Tm
GAPDH ¹	F CACGGCAAGTTCAACGGCACAGT	400 ^a	60 °C
	R TCAGCGGAAGGGGCGGAGAT		
BDNF ²	F TCCCTGGCTGACACTTTTGAG	465	60 °C
	R ATTGGGTAGTTCGGCATTGC		
NT-3 ³	F GGTCAGAATTCCAGCCGATGATTGC	484	69 °C
	R CAGCGCCAGCCTACGAGTTTGTTGT		
NT-4 ⁴	F CTCCTGAGTGGGACCTCTTG	207	60 °C
	R CACTCACTGCATCGCACAC		
OM ⁵	F ATGAGCATCACGGACATCCT	330 ^b	60 °C
	R TTAAGAGTGCACCATTTCCTGG		
Bcl-2 ⁶	F CCTGAGAGCAACCGAACGCCC	433	69 °C
	R CCACAAAGGCATCCCAGCCTC		
Caspasa-3 ⁷	F AATTCAAGGGACGGGTCATG	180 ^c	60 °C
	R TGACACAATACACGGGATCTG		

¹Roque et al., 2016; ²Seki et al., 2003; ³Seki et al., 2004; ⁴Krishnamoorthy et al., 2001; ⁵Hauk et al., 2007; ⁶Chaudhary, et al., 1999; ⁷Hua et al., 2015. ^aNCBI Gen ID: 24383, Referencia de la secuencia: NC_005103.4; ^bNCBI Gen ID: 25503, Referencia de la secuencia: NM_012995.1; ^cNCBI Gen ID: 25402, Referencia de la secuencia: NC_005115.4. F, Forward; Pb, pares de bases; R, Reverse; Tm, temperatura de alineación, extensión y lectura.

Tabla 8. Protocolo de amplificación para las reacciones de PCR.

Activación de la polimerasa	Amplificación			Curva de Melt
	Desnaturalización	Alineación, Extensión y Lectura	No. de ciclos	
30 s a 95 °C	15 s a 95 °C	30 s a 60 °C*	39	65-95 °C 0.5 °C aumentando 2-5 s/step

*La temperatura de alineación, extensión y lectura se ajustó de acuerdo a cada uno de los oligonucleótidos utilizados.

El nivel de expresión de los factores neurotróficos, de supervivencia y muerte se cuantificó en relación a la expresión del C_T obtenido de cada uno de los genes de interés con el del gen constitutivo (control interno): gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los resultados se presentan respecto de los niveles de expresión del grupo PBS; para ello, se utilizó la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Schmittgen y Livak, 2008) donde: $\Delta C_T = (C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control interno})$, por lo tanto,

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = [(C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control interno})_{\text{PBS}} - (C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control interno})_{\text{AgN}}]$$

Los resultados obtenidos de AgN ($2^{-\Delta CT}$) fueron normalizados respecto al $2^{-\Delta CT}$ del PBS (PBS = 1) y posteriormente se promedió la réplica de cada una de las muestras por cada gen analizado.

7.10 Análisis estadístico

Para determinar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de *Shapiro-Wilk*, se determinó la igualdad de varianza y se utilizó la prueba *t de Student*. Para los datos que no cumplieron con la igualdad de varianza se utilizó la prueba *U de Mann-Whitney*. El análisis estadístico fue realizado mediante el Software *SigmaPlot 12.0*, para la representación gráfica de los resultados se utilizó el Software *GraphPad Prism 7*. Los resultados son expresados como promedios $\pm$ el error estándar de la muestra, mientras que los datos que no cumplieron la igualdad de varianza son representados como la mediana con el valor mínimo y máximo de acuerdo con la prueba *U de Mann-Whitney*. Los valores $p \leq 0.05$ son considerados estadísticamente significativos.

8. RESULTADOS

Para cumplir con el objetivo de determinar el efecto de la ACAID inducida con AgN sobre la expresión de neurotrofinas y factores de supervivencia y muerte en la retina de ratas con lesión del nervio óptico, quince ratas de cada condición experimental fueron lesionadas y sacrificadas 2, 7 y 14 días postlesión. Los resultados muestran que la inoculación de AgN en la cámara anterior del ojo incrementa la expresión de BDNF ($t_{(6)} = -2.48$, $p < 0.05$. Figura 8A) a los 2 días postlesión, sin cambios en la expresión de NT-3 ($t_{(4)} = 2.65$, $p > 0.05$. Figura 8B) y NT-4 ($t_{(4)} = -0.12$, $p > 0.05$. Figura 8C). Este escenario cambia a los 7 días postlesión, donde la inducción de la ACAID con AgN incrementa significativamente la expresión de NT-4 ($t_{(4)} = -7.46$, $p < 0.01$. Figura 8F), mientras decremента BDNF ($t_{(4)} = 8.83$, $p < 0.001$. Figura 8D) y no modifica la expresión de NT-3 ($t_{(4)} = -2.31$, $p > 0.05$. Figura 8E).

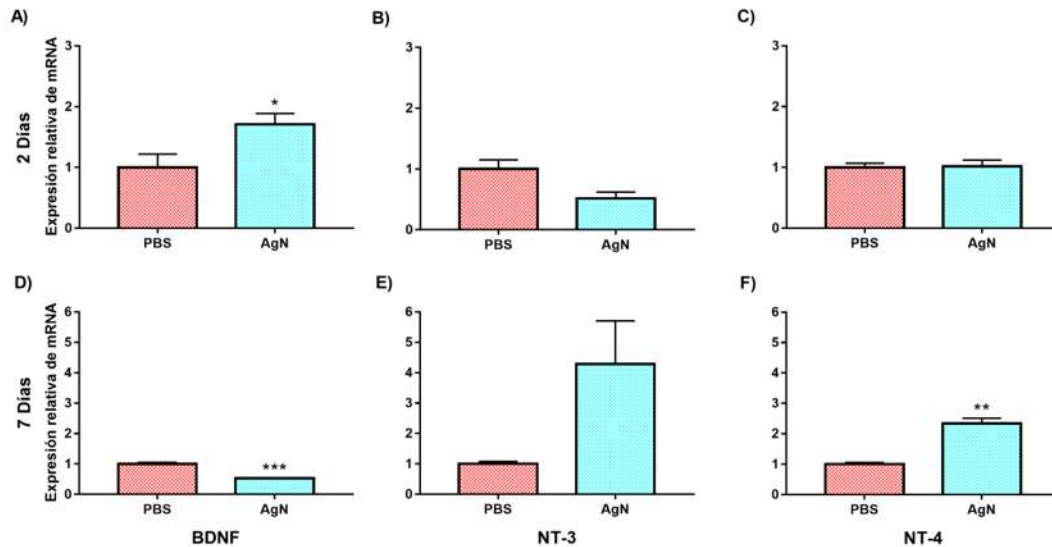


Figura 8. La inducción de desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo modula la expresión de neurotrofinas en ratas con lesión del nervio óptico. Los gráficos muestran la expresión de las neurotrofinas BDNF (A y D), NT-3 (B y E) y NT-4 (C y F) en ratas inoculadas con PBS como vehículo y con antígenos neurales (AgN) a los 2 (PBS, $n = 3-4$; AgN, $n = 3-4$) y 7 días después de la lesión del nervio óptico (PBS, $n = 3$; AgN, $n = 3$). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes. Se grafican los promedios $\pm$ el error estándar de la muestra. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Por su parte, la ACAID a AgN no cambia la expresión de los factores de supervivencia y muerte a los 2 días postlesión (OM: $U = 3.0$, $p > 0.05$. Figura 9A; Bcl-2: $U = 0$, $p > 0.05$. Figura 9B; caspasa-3: $t_{(4)} = -0.07$, $p > 0.05$. Figura 9C). Sin embargo, a los 7 días postlesión es posible observar que la ACAID con AgN decrementa la expresión de OM ($t_{(4)} = 24.88$, $p < 0.001$. Figura 9E) y caspasa-3 ($t_{(4)} = 5.80$, $p < 0.01$. Figura 9D), mientras que en Bcl-2 no se aprecian cambios estadísticamente significativos ($t_{(4)} = -1.353$, $p > 0.05$. Figura 9F).

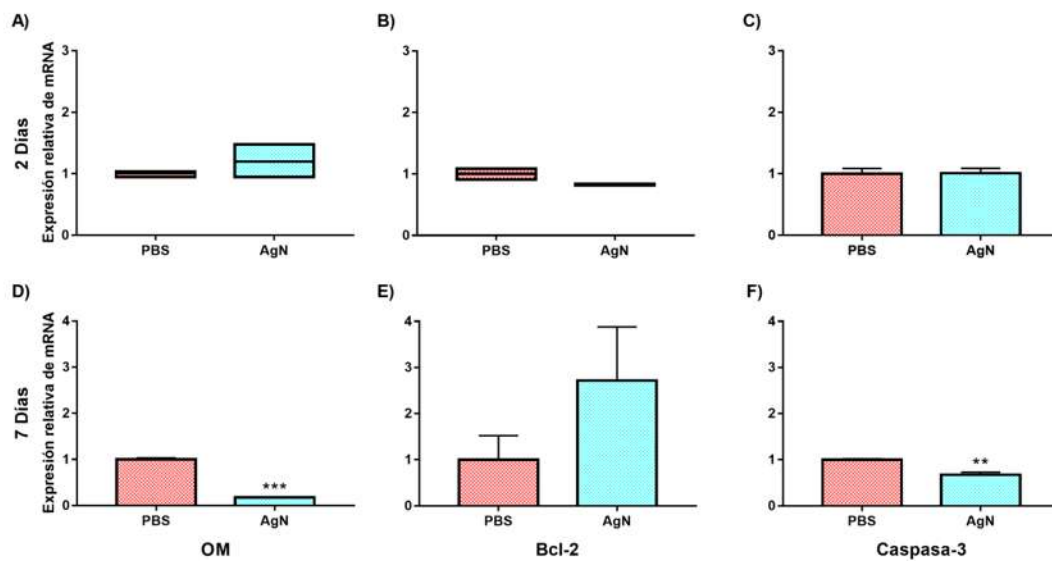


Figura 9. La inducción de desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo modula la expresión de factores de supervivencia en ratas con lesión del nervio óptico. Los gráficos muestran la expresión de Oncomodulina (OM; A y D), del factor antiapoptótico Bcl-2 (B y E), y del proapoptótico caspasa-3 (C y F) en ratas inoculadas con PBS como vehículo y con antígenos neurales (AgN) a los 2 (PBS, $n = 3$; AgN, $n = 3$) y 7 días después de una lesión del nervio óptico (PBS, $n = 3$; AgN, $n = 3$). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes. Para A y B se grafica la mediana con el valor mínimo y máximo, mientras que para el resto se grafican los promedios $\pm$ el error estándar de la muestra. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la ACAID inducida con AgN sobre la preservación de la mielina en ratas a los 7 y 14 días después de la lesión, los nervios ópticos fueron seccionados y teñidos. Los resultados muestran que la inducción de la ACAID preserva mejor la estructura del nervio óptico tanto en el sitio de la lesión (epicentro) como en las regiones distales y proximales, como puede ser observado en los cortes teñidos con luxol fast blue y contrateñidos

con hematoxilina y eosina (Figuras 10A y 10B). La figura 10 muestra una mejor organización de las vainas de mielina en los axones de ratas inoculadas con AgN a los 7 días postlesión. Adicionalmente, es posible observar una menor cantidad de núcleos teñidos en las ratas inoculadas con AgN, lo que sugiere una menor infiltración leucocitaria al sitio de la lesión. Aunque los linajes celulares no pudieron ser cuantificados debido a la alta densidad celular, es posible observar un menor número de leucocitos en los axones de ratas inoculadas con AgN, en comparación con el grupo PBS (Figura 10A). Este efecto es más obvio a los 14 días postlesión, periodo en el cual es posible observar la continuidad del tejido nervioso, la preservación de la mielina y la menor infiltración leucocitaria en los nervios ópticos de ratas inoculadas con AgN (Figura 10B).

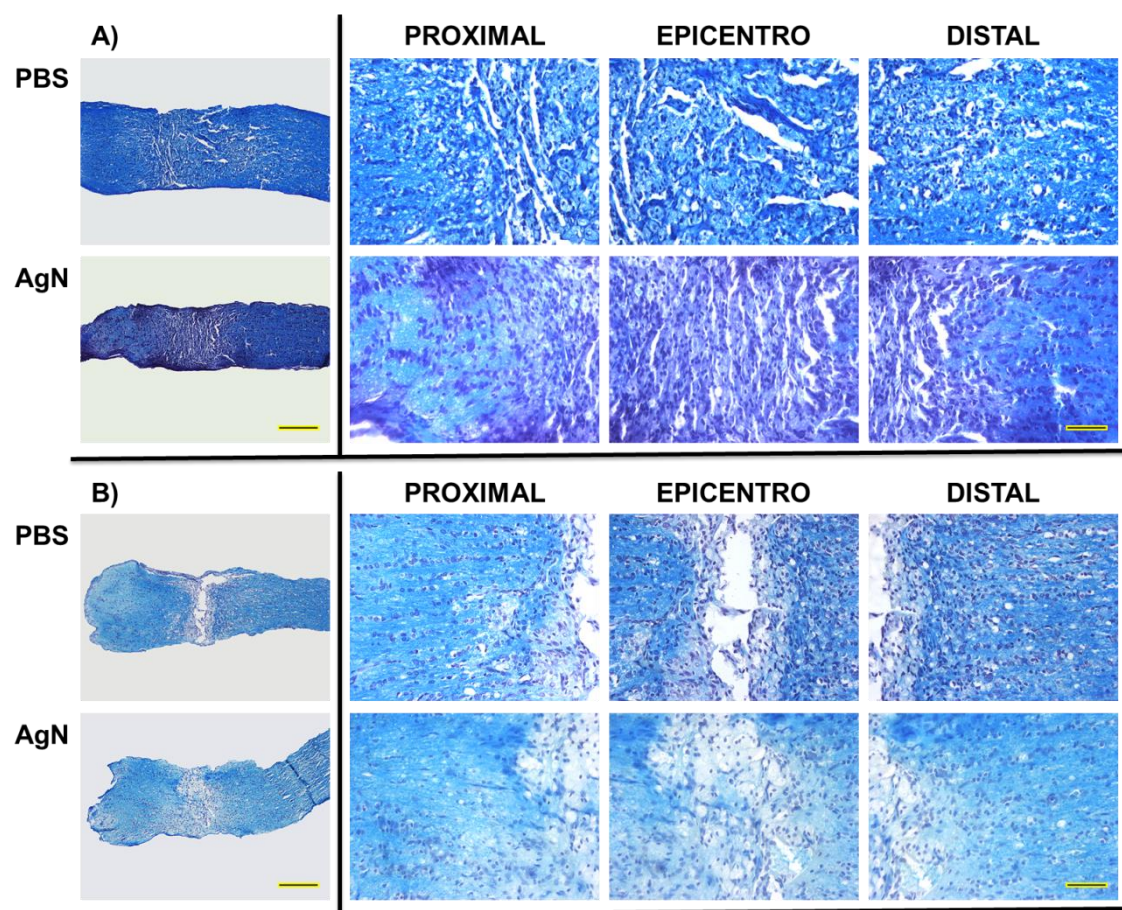


Figura 10. La inoculación de antígenos neurales preserva la estructura tisular en el nervio óptico de ratas con lesión por compresión cuando se induce previo al daño. Las microfotografías muestran cortes representativos de nervio óptico de ratas inoculadas con PBS y antígenos neurales (AgN) a los 7 (A) y 14 días después de la lesión (B). El panel de la izquierda muestra

fotografías de baja magnificación, mientras los paneles de la derecha muestran fotografías de mayor aumento de las regiones proximal, epicentro y distal a la lesión. Nótese la mejor preservación de la estructura tisular en los organismos inoculados con AgN (menos espacios blancos), y el menor número de leucocitos en todas las regiones evaluadas en los animales inoculados con AgN, en comparación con aquéllos inoculados con PBS. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes. Barra de escala = 200 μ m en fotografías de baja magnificación y 50 μ m en aquéllas de alta magnificación.

Finalmente, en un intento por descartar el efecto neuroprotector de las hormonas estrogénicas en nuestro modelo de estudio, se evaluó la fase del ciclo estral de todos los animales al momento de la lesión. Los resultados muestran que ninguno de los animales evaluados se encontró en proestro, fase caracterizada por un incremento en el número de células epiteliales en el frotis vaginal. La mayoría de las ratas se encontraron en diestro (73% de la población), una pequeña proporción en estro (20%) y una menor proporción en metestro (7%), fases caracterizadas por el aumento de corneocitos y de leucocitos en el frotis vaginal (Imágenes no mostradas).

9. DISCUSIÓN

Con el objetivo de entender el mecanismo mediante el cual la inducción de inmunotolerancia hacia AgN por la ACAID favorece la supervivencia de CGR después de una lesión del nervio óptico, este trabajo evaluó la expresión de neurotrofinas, factores de supervivencia y muerte en la retina de ratas inoculadas con AgN y PBS a los 2 y 7 días postlesión. Adicionalmente, se evaluó la preservación de la mielina en el nervio óptico a los 7 y 14 días después de la lesión. En conjunto, los resultados obtenidos muestran que la ACAID hacia AgN incrementa la expresión de algunas neurotrofinas, mientras que disminuye la expresión del factor inductor de la apoptosis caspasa-3, lo cual se correlaciona con la supervivencia de las CGR. Además, la ACAID hacia AgN también preserva la mielina y la estructura axonal después de una lesión del nervio óptico.

Los resultados muestran que la ACAID hacia AgN incrementa la expresión de BDNF en etapas tempranas después de la lesión y disminuye su expresión al día 7 postlesión. Así mismo, al día 7 postlesión también se observó un incremento en la expresión de NT-4, mientras la expresión de NT-3 no mostró cambios estadísticamente significativos. Se ha reportado que BDNF se expresa de manera constitutiva bajo condiciones fisiológicas en la retina (Perez y Caminos, 1995) y su expresión se incrementa en respuesta al daño en células gliales (Parrilla-Reverter et al., 2009). El incremento de BDNF y NT-4 en los primeros siete días postlesión está relacionado con un incremento en la supervivencia de las CGR (Harada et al., 2015) y promueven la regeneración axonal después de una lesión en el nervio óptico (Niwa et al., 2016). Además, BDNF y NT-4 activan varias vías de señalización por medio del receptor de alta afinidad TrkB. Una de estas vías activa GTPasas, Ras, Rap1 y MAPK y promueve la supervivencia y la diferenciación neuronal (Weber et al., 2008; Deogracias, 2007; Cheng et al., 2002). Otra vía de señalización es por medio de PI3K el cual fosforila a Akt generando la inactivación de proteínas apoptóticas. Finalmente otra vía de señalización que siguen las neurotrofinas es por medio

del receptor de baja afinidad p75^{NTR}, en donde su principal blanco es la vía de apoptosis (Sánchez, 2014; Escudero, 2012). En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la inoculación de AgN previo a una lesión por compresión del nervio óptico promueve la supervivencia de las CGR incrementando la expresión de BDNF después del daño (2 días postlesión) y posteriormente regula a la baja su expresión (7 días postlesión), muy probablemente para evitar la apoptosis asociada a la activación del receptor p75^{NTR}. De manera interesante, incrementa la expresión de NT-4, neurotrofina capaz de mantener la supervivencia de las CGR en ausencia de BDNF (Sánchez, 2014; Weber et al., 2008).

Debido a que en etapas tempranas después de la lesión únicamente se encuentran neutrófilos, microglía y células de Müller en la retina, probablemente sean estas poblaciones las responsables del incremento en la expresión de BDNF. Aunque al día 7 postlesión se encuentran más poblaciones celulares en el sitio de la lesión como macrófagos procedentes de la periferia, linfocitos Th y neutrófilos, el incremento en NT-4 posiblemente también esté relacionado con estas células (Foldvari et al., 2016; Gallego et al., 2013; Guimarães et al., 2009; Weber et al., 2008; Oku et al., 2002; Martínez-Alcantar et al., *en revisión*).

Los resultados de este trabajo también muestran que la expresión de OM disminuye a los 7 días postlesión en el grupo de ratas inoculadas en la cámara anterior con AgN. La OM es una proteína de unión al calcio, y su incremento en respuesta a la punción del iris previo a una lesión del nervio óptico favorece la supervivencia de las CGR y la regeneración axonal (Nakazawa et al., 2014; Kurimoto et al., 2013). Se ha identificado que los neutrófilos y macrófagos proinflamatorios tipo N1 y M1, respectivamente, son una fuente importante de OM (Liu et al., 2018; David y Kroner, 2011). Por esta razón, en el presente trabajo la OM se empleó como un marcador indirecto de estos fenotipos. En el día 2 postlesión la población predominante son los macrófagos residentes y los neutrófilos. Sin embargo, al día 7 postlesión las células predominantes son los macrófagos procedentes de la periferia y neutrófilos, además de los linfocitos T.

Así, el hecho que la expresión de OM se reduzca significativamente en la retina al día 7 postlesión apoya los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación que señalan que la ACAID hacia AgN promueve un fenotipo antiinflamatorio asociado a un incremento en la presencia de macrófagos de fenotipo M2 y Treg. Estos resultados concilian los efectos neuroprotectores de estrategias de inmunomodulación opuestas como la inducción de autoinmunidad protectora cuyo mecanismo promueve la inflamación (Benowitz y Popovich, 2011; Donnelly y Popovich, 2007; Barouch y Schwartz, 2002; Yoles et al., 2001; Moalem et al., 2000; Schwartz y Cohen, 2000) y nuestra estrategia, la cual promueve la regulación de la inflamación (Pineda, 2017; Martínez-Alcantar et al., *en revisión*; Pelayo et al., 2015; Talavera-Carrillo, 2015; Zhao et al., 2006).

Finalmente, los resultados muestran que la inducción de la ACAID hacia AgN disminuye la expresión del marcador apoptótico caspasa-3 a los 7 días postlesión del nervio óptico pero no induce cambios en la expresión del factor antiapoptótico Bcl-2. La caspasa-3 es una proteína que liga las dos vías de inducción de apoptosis, tanto aquella mediada por el ligando Fas (*i.e.*, extrínseca) como la mediada por la liberación del citocromo c (*i.e.*, intrínseca) (Nickells, 1999). La apoptosis de las CGR alcanza sus máximos niveles durante los primeros 7 días postlesión, en esta etapa solo el 50% de las neuronas permanecen con vida (Almasieh et al., 2012; Sapieha, 2005). El hecho que la inducción de la ACAID hacia AgN disminuya la expresión de caspasa-3 únicamente al día 7 postlesión sugiere que el incremento en los mediadores antiinflamatorios y en las neurotrofinas observado en etapas tempranas de la lesión puede tener un efecto regulador de la apoptosis hasta el día 7 postlesión. Este decremento, aunque tardío, evita la muerte por apoptosis de las CGR al día 14 postlesión observado por nuestro grupo de trabajo (Pineda, 2017; Martínez-Alcantar et al., *en revisión*).

Por otro lado, en las microfotografías del nervio óptico de ratas inoculadas con AgN a los 7 y 14 días postlesión se aprecia que existe una mayor preservación

y continuidad en la estructura tisular, así como un menor número de leucocitos en el epicentro de la lesión, contrario a los grupos de PBS en donde se observa que los procesos de degeneración son más avanzados. Adicional a ello, si la estructura del tejido no está preservada de manera adecuada no se puede realizar un transporte retrógrado de neurotrofinas por lo que el cuerpo de las CGR así como el axón continuarán degenerándose (Almasieh et al., 2012; Raff et al., 2002; Leist y Jäättelä, 2001). Así, aunque en el presente trabajo no se documentó con marcadores específicos la identidad de los tipos celulares presentes en el sitio del daño, la morfología de las células en el epicentro de la lesión de AgN sugiere que son macrófagos. Esta observación, en conjunto con la continuidad del tejido sugiere que al día 14 postlesión la inoculación de AgN preserva la mielina y favorece eventos de reparación tisular debido a un cambio de fenotipo de neutrófilos, macrófagos y Treg capaces de promover un microambiente más adecuado para estos procesos (Liu et al., 2018; Zhou et al., 2014; Lawrence y Natoli, 2011; Martínez-Alcantar et al., *en revisión*).

Finalmente, es importante destacar que el efecto neuroprotector observado en los grupos inoculados con AgN es específico del tratamiento y no puede ser atribuido a un efecto de los estrógenos endógenos, debido a que ningún animal se encontró en la fase estrogénica de proestro (McLean et al., 2012; Simpkins et al., 2010; Angoa y Rivas, 2006; Wise, 2002).

Todos estos resultados contribuyen al enriquecimiento del proyecto, sin embargo, es necesario realizar más investigación y experimentos que permitan ir describiendo con mayor precisión los mecanismos de acción así como las vías de señalización que activa la ACAID para promover e incrementar la supervivencia de las CGR así como su posible potencial terapéutico en las enfermedades neurodegenerativas que cursen con inflamación crónica.

10. CONCLUSIÓN

Los resultados sugieren que la inducción de la ACAID por medio de la inoculación de AgN en la cámara anterior del ojo previo a una lesión por compresión del nervio óptico, promueve la supervivencia de las CGR mediante la regulación diferencial de la expresión de neurotrofinas, una disminución en la expresión de caspasa-3 y OM así como la preservación de la mielina y la estructura tisular en el nervio óptico.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, N., & Cavalli, V. (2008). Nerve injury signaling. *Current Opinion in Neurobiology*, 18, 276-283.
- Abril, M. A., Ticó, N., & Garreta, R. (2004). Enfermedades neurodegenerativas. *Rehabilitación*, 38 (6), 318-324.
- Aktas, Z., Gürelík, G., Akyürek, N., Öñol, M., & Hasanreisoglu, B. (2007). Neuroprotective effect of topically applied brimonidine tartrate 0.2% in endothelin-1-induced optic nerve ischaemia model. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 35, 527-534.
- Almasieh, M., Wilson, A. M., Morquette, B., Cueva, J. L., & Di, A. (2012). The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research*, 31, 152-181.
- Angoa, M. & Rivas, S. (2006). Acciones protectoras de los estrógenos en el sistema nervioso central. *Medigraphic*, 49 (6), 248-251.
- Armas, G., Pezoa, R. E., & Vásquez, J. A. (2010). Factor neurotrófico derivado del cerebro en el trastorno depresivo mayor. *Medigraphic*, 5 (1), 19-21.
- Ávila-Funes, J. A., Mariona-Montero, V. A., & Melano-Carranza, E. (2002). Guillain-Barré syndrome: etiology and pathogenesis. *Revista de Investigación Clínica*, 54 (4), 357-363.
- Balaratnasingam, S., & Janca, A. (2012). Brain derived neurotrophic factor: a novel neurotrophin involved in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacology and Therapeutics*, 134, 116-124.
- Barouch, R., & Schwartz, M. (2002). Autoreactive T cells induce neurotrophin production by immune and neural cells in injured rat optic nerve: implications for protective autoimmunity. *The FASEB Journal*, 16 (10), 1304-1306.
- Barranco, J. L. (2016). *Enfermedad de Alzheimer, Pákinson y café: revisión sistemática* (Tesis doctoral). Universidad de Córdoba, Córdoba, España.
- Becerra, L. V., & Pimienta, H. J. (2009). Apoptosis neuronal: la diversidad de señales y de tipos celulares. *Colombia Médica*, 40 (1), 124-133.

- Benowitz, L. I. & Popovich, P. G. (2011). Inflammation and axon regeneration. *Trauma and Rehabilitation*, 24, 577-583.
- Benowitz, L., & Yin, Y. (2008). Rewiring the injured CNS: Lessons from the optic nerve. *Experimental Neurology*, 209, 389-398.
- Berkelaar, M., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M., & Aguayo, A. J. (1994). Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *The Journal of Neuroscience*, 14 (7), 4368-4374.
- Bernhardi, R. (2004). Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis? *Revista Chilena de Neuropsiquiatría*, 42 (4), 281-292.
- Bernhardi, R. (2005). Envejecimiento: Cambios bioquímicos y funcionales del sistema nervioso central. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*, 43 (4), 297-304.
- Bio-Rad Laboratories. iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-PCR. Recuperado de: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10000070791.pdf>
- Bio-Rad Laboratories. SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix. Recuperado de: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10000076382.pdf>
- Blanco, V. M., Soto, G., González, J. A., Beltrán, O., Martínez, D., & León, B. A. (2015). Acción neuroinflamatoria y neurotrófica de las quimiocinas durante un proceso isquémico cerebral. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 20 (2), 184-192.
- Block, M. L., & Hong, J. S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology*, 76 (2), 77-98.
- Bonfanti, L., Strettoi, E., Chierzi, S., Cenni, M. C., Liu, X. H., Martinou, J. C., ... & Rabacchi, S. A. (1996). Protection of retinal ganglion cells from natural and axotomy-induced cell death in neonatal transgenic mice overexpressing bcl-2. *The Journal of Neuroscience*, 16 (13), 4186-4194.

- Candalija, A. (2015). *Interacción de las neurotoxinas clostridiales con los receptores de neurotrofinas: identificación de TrkB como receptor proteico de la toxina tetánica* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Cascales, M. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 69 (1), 36-64.
- Castillo-Padilla, D. V., & Rivas-Arancibia, S. (2011). Interacción entre factores neurotróficos y especies reactivas de oxígeno en los mecanismos de muerte y proliferación celular. *Arch Neurocién (Mex)*, 16 (1), 26-32.
- Caviedes, A. A. (2011) *Caracterización de una vía neuroprotectora mediada por la neurotrofina BDNF y óxido nítrico* (Tesis). Universidad De Chile, Santiago, Chile.
- Chamorro, Á., Dirnagl, U., Urra, X., & Planas, A. M. (2016). Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *The Lancet Neurology*, 15 (8), 869-881.
- Chan, P. H. (2004). Mitochondria and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *Neurochemical Research*, 29 (11), 1943-1949.
- Chaudhary, P., Ahmed, F., Quebada, P., & Sharma, S. C. (1999). Caspase inhibitors block the retinal ganglion cell death following optic nerve transection. *Elsevier*, 37, 36-45.
- Chen, Y., & Swanson, R. A. (2003). Astrocytes and brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 23, 137-149.
- Cheng, L., Sapieha, P., Kittlerová, P., Hauswirth, W. W., & Di, A. (2002). TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death *in vivo*. *The Journal of Neuroscience*, 22 (10), 3977-3986.
- Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2 (9), 647-656.
- Cui, Q., Benowitz, L., & Yin, Y. (2008). Does CNTF mediate the effect of intraocular inflammation on optic nerve regeneration? *Letter to the Editor*, 131 (e96), 1-2.

- David, S., & Kroner, A. (2011). Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 12 (7), 388-399.
- De la Torre, A., & Núñez, M. X. (2002). Inmunología ocular: síndromes de ojo seco. *Colombia Médica*, 33 (3), 113-122.
- Delfino, D., Matos, D., Gamboa, D., & Rodríguez, D. (2011). Alteraciones del campo visual en enfermedades neurooftalmológicas y retinianas. *Revista Información Científica*, 69 (1), 1-6.
- Deogracias, R. (2007). *Regulación de la expresión del receptor de neurotrofinas TrkB en células nerviosas. Mecanismos moleculares e implicaciones biológicas* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
- Diekmann, H., & Fischer, D. (2013). Glaucoma and optic nerve repair. *Cell and Tissue Research*, 353 (2), 327-337.
- Donnelly, D. J., & Popovich, P. G. (2007). Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 209, 378-388.
- Drake, R. L., Wayne, A., & Mitchell, A. W. M. (2010). *Gray anatomía para estudiantes*. España. Elsevier, 874-901.
- Escudero, C. (2012) *Rol funcional de la internalización y transporte retrógrado del receptor de neurotrofinas p75 en neuronas simpáticas* (Tesis doctoral). Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
- Faunce, D. E., Sonoda, K. H., & Stein-Streilein, J. (2001). MIP-2 recruits NKT cells to the spleen during tolerance induction. *The Journal of Immunology*, 166, 313-321.
- Fernández-Gómez, F. J., Hernández, F., Argandoña, L., Galindo, M. F., Segura, T., & Jordán, J. (2008). Farmacología de la neuroprotección en el ictus isquémico agudo. *Revista de Neurología*, 47 (5), 253-260.
- Fitch, M., & Silver, J. (2008). CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Experimental Neurology*, 209, 294-301.

- Flórez, J. & Pazos, A. (2014). *Neurotransmisión en el sistema nervioso central*. In: *Farmacología Humana* (407-427). Barcelona, España: Elsevier Masson.
- Foldvari, M., & Chen, D. W. (2016). The intricacies of neurotrophic factor therapy for retinal ganglion cell rescue in glaucoma: a case for gene therapy. *Neural Regeneration Research*, 11 (6), 875-877.
- Fortoul, T. I. (2013). *Histología y biología celular*. México, D. F.: McGraw-Hill Interamericana.
- Franklin, T. B., Krueger-Naug, A. M., Clarke, D. B., Arrigo, A. P., & Currie, R. W. (2005). The role of heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 in cellular protection of the central nervous system. *International Journal of Hyperthermia*, 21 (5), 379-392.
- Friedman, W. J. (2000). Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *The Journal of Neuroscience*, 20 (17), 6340-6346.
- Gallego, B., Ramírez, A., Salazar, J., de Hoz, R., Rojas, B., García, E., ... & Ramírez, J. (2013). Fisiopatología y progresión de la neurodegeneración glaucomatosa. *Revista Española de Glaucoma e Hipertensión Ocular*, 3 (2), 197-211.
- García, J. A., & Gómez, J. J. (2000). Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Revista Española de Reumatología*, 27 (1), 33-35.
- García, J., Honrubia, F. M., García, J., & Júlvez, L. P. (2013). *El glaucoma y las ciencias básicas*. En Diagnóstico y tratamiento del glaucoma de ángulo abierto (69-89 y 97-111). España: Sociedad Española de Oftalmología.
- García, V., González-Moles, M. A., & Bascones, A. (2006). Expresión de bcl-2, ki-67 y caspasa-3 en lesiones cancerosas de la mucosa oral. Resultados preliminares. *Avances en Odontoestomatología*, 22 (5), 263-269.
- Gil-Dones, F., Alonso-Orgaz, S., Avila, G., Martin-Rojas, T., Moral-Darde, V., Barroso, G., ... & Barderas, M. G. (2009). An optimal protocol to analyze the rat spinal cord proteome. *Libertas Academica*, 4, 135-164.
- Giri, S., Rattan, R., Singh, A. K., & Singh, I. (2004). The 15-Deoxy- δ 12, 14-prostaglandin J_2 inhibits the inflammatory response in primary rat

- astrocytes via down-regulating multiple steps in phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt-NFκB-p300 pathway independent of peroxisome proliferator-activated receptor γ. *The Journal of Immunology*, 173, 5196-5208.
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140 (6), 918-934.
- Gomes-Leal, W., Corkill, D. J., Freire, M. A., Picanço-Diniz, C. W., & Perry, V. H. (2004). Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 190, 456-467.
- González-Cárdenas, L. F. (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). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.
- González-Torres, L. C., & Armendáriz-Borunda, J. (2005). Aspectos inmunológicos en la enfermedad de Parkinson. *Arch Neurocién (Mex)*, 10 (3), 168-174.
- Goto, N. (1987). Discriminative staining methods for the nervous hematoxylin triple stain and subsidiary staining methods system Luxol Fast-Blue-Periodic Acid-Schiff. *Stain Tecxnouxy*, 62 (5), 1-11.
- Guadarrama-Ortiz, P., Regalado-Guerra, X., Castillo-Rangel, C., & Ángeles-Castellanos, M. (2014). Esclerosis múltiple: enfermedad neurológica de alto impacto social. De vuelta al antiguo tratamiento. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 57 (6), 5-10.
- Guimarães, J. S., Freire, M. A. M., Lima, R. R., Souza-Rodrigues, R. D., Costa, A. M. R., dos Santos, C. D., ... & Gomes-Leal, W. (2009). Mecanismos de degeneración secundaria en el sistema nervioso central durante los trastornos neuronales agudos y el daño en la sustancia blanca. *Revisión en Neurociencia*, 48 (6), 304-310.
- Gutiérrez-Álvarez, A. M. (2006). Esclerosis múltiple: evidencias y controversias. *Revista Ciencias de la Salud*, 4 (1), 52-58.

- Harada, C., Azuchi, Y., Noro, T., Guo, X., Kimura, A., Namekata, K., & Harada, T. (2015). TrkB signaling in retinal glia stimulates neuroprotection after optic nerve injury. *The American Journal of Pathology*, 185 (12), 3238-3247.
- Hauk, T., Müller, A., Lee, J., Schwendener, R., & Fischer, D. (2007). Neuroprotective and axon growth promoting effects of intraocular inflammation do not depend on oncomodulin or the presence of large numbers of activated macrophages. *Experimental Neurology*, 209, 469-482.
- Hernández-Muela, S., Mulas, F., & Mattos, L. (2004). Plasticidad neuronal funcional. *Revista de Neurología*, 38 (Supl 1), S58-S68.
- Hori, J. (2008). Mechanisms of immune privilege in the anterior segment of the eye: what we learn from corneal transplantation. *Journal of Ocular Biology, Diseases, and Informatics*, 1 (2-4), 94-100.
- Hua, P., Liu, J., Tao, J., Liu, J., & Yang, S. (2015). Influence of caspase-3 silencing on the proliferation and apoptosis of rat bone marrow mesenchymal stem cells under hypoxia. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8 (2), 1624-1633.
- Ibáñez, C. F., & Simi, A. (2012). p75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: paradox and opportunity. *Trends in Neurosciences*, 35 (7), 431-440.
- Jassem, W., Fuggle, S. V., Rela, M., Koo, D. D. H., & Heaton, N. D. (2002). The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*, 73 (4), 493-499.
- Jordán, J. (2003). Avances en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. *Offarm*, 22 (3), 102-112.
- Kiernan, J. A. (2006). *Introducción y neurohistología*. En BARR. El sistema nervioso humano: un punto de vista anatómico (33-36). México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
- Koh, J. Y., Gwag, B. J., Lobner, D., & Choi, D. W. (1995). Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science*, 268, 573-575.

- Krishnamoorthy, R. R., Agarwal, P., Prasanna, G., Vopat, K., Lambert, W., Sheedlo, H. J., ... & Agarwal, N. (2001). Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. *Molecular Brain Research*, 86, 1-12.
- Kumar, A. & Loane, D. J. (2012). Neuroinflammation after traumatic brain injury: Opportunities for therapeutic intervention. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26 (8), 1191-1201.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., & Aster, J. C. (2010). *Patología estructural y funcional*. Barcelona, España: Elsevier.
- Kurimoto, T., Yin, Y., Habboub, G., Gilbert, H. Y., Li, Y., Nakao, S., ... & Benowitz, L. I. (2013). Neutrophils express oncomodulin and promote optic nerve regeneration. *The Journal of Neuroscience*, 33 (37), 14816-14824.
- Lagumersindez, N., Oviedo, M. E., & Martínez, G. (2009). Esclerosis múltiple: aspectos generales y abordaje farmacológico. *Revista Cubana de Farmacia*, 43 (2), 1-14.
- Latarjet, M., & Ruíz-Liard, A. (1999). *Anatomía humana*. Madrid, España: Panamericana.
- Lawrence, T., & Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature Reviews Immunology*, 11 (11), 750-761.
- Leist, M., & Jäättelä, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews*, 2, 1-10.
- Lima-Gómez, V. (2002). Traumatismo ocular. Comparación entre las lesiones evaluadas por el ATLS y las de una serie nacional. ¿Utilidad de una clasificación estandarizada? *Mediagraphic*, 70 (1), 36-39.
- Lin, H. H., Faunce, D. E., Stacey, M., Terajewicz, A., Nakamura, T., Zhang-Hoover, J., ... & Stein-Streilein, J. (2005). The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *The Journal of Experimental Medicine*, 201 (10), 1615-1625.

- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443, 787-795.
- Liu, Y. W. Li, S. & Dai, S. S. (2018). Neutrophils in traumatic brain injury (TBI): friend or foe? *Journal of Neuroinflammation*, 15 (146), 1-18.
- Llibre, J. J., & Guerra, M. A. (1999). Enfermedad de Alzheimer. Situación actual y estrategias terapéuticas. *Revista Cubana de Medicina*, 38 (2), 134-142.
- Malagelada, A. (2003). *Estudio inmunológico en la esclerosis múltiple familiar: citocinas, moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas* (Tesis doctoral). Universidad de Barcelona, Barcelona, España.
- Marinovic, M. A. (2010). Inmunología ocular. *Revista Chilena de Reumatología*, 26 (3), 222-241.
- Marín-Teva, J. L., Cuadros, M. A., Martín-Oliva, D., & Navascués, J. (2011). Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biology*, 7 (01), 25-40.
- Martínez-Alcantar, L. Neural antigen-specific immunotolerance as a neuroprotective strategy for traumatic spinal injury in rats. [En revisión].
- Martínez-Canabal, A., & Rivas-Arancibia, S. (2005). Funciones de las prostaglandinas en el sistema nervioso central. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 48 (5), 210-216.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: A renewed sense of self. *Science*, 296, 301-305.
- McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., & Bennett, S. A. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J. Vis. Exp.* (67), e4389. 1-6.
- Meeker, R. B., & Williams, K. S. (2015). The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death. *Neural Regeneration Research*, 10 (5), 721-725.
- Méndez, L. S. (2005). Esclerosis múltiple: un problema neuroinmunológico (Monografía). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D. C.

- Mesa-Villanueva, M., & Patiño, P. J. (2006). Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. *Inmunología*, 25 (2), 115-130.
- Meyer-Franke, A., Kaplan, M. R., Pfeiffer, F. W., & Barres, B. A. (1995). Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron*, 15 (4), 805-819.
- Miller, F. D., & Kaplan, D. R. (2001). Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58 (8), 1045-1053.
- Moalem, G., Gdalyahu, A., Shani, Y., Otten, U., Lazarovici, P., Cohen, I. R., & Michal Schwartz, M. (2000). Production of neurotrophins by activated t cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 15, 331-345.
- Morell, P., & Quarles, R. (1999). *Characteristic composition of myelin*. In: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects (1-9). Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Nagley, P., Higgins, G. C., Atkin, J. D., & Beart, P. M. (2009). Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurones. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802, 167-185.
- Nakazawa, T., Kitaoka, Y., & Harada, T. (2014). *Optic Nerve Regeneration*. En Neuroprotection and Neuroregeneration for Retinal Diseases (341-356). Tokyo: Springer.
- Nickells, R. W. (1999). Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: An update of the molecular pathways involved in cell death. *Survey of Ophthalmology*, 43 (1), S151-S161.
- Niederkorn, J. Y. (2012). Ocular immune privilege and ocular melanoma: Parallel universes or immunological plagiarism? *Frontiers in Immunology*, 3, 1-10.

- Nilsson, A. S., Fainzilber, M., Falck, P., & Ibáñez, C. F. (1998). Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Letters*, 424, 285-290.
- Niwa, M., Aoki, H., Hirata, A., Tomita, H., Green, P. G., & Hara, A. (2016). Retinal cell degeneration in animal models. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (110), 1-16.
- Nizama, M. (2011). Suicidio. *Revista Peruana de Epidemiología*, 15 (2), 81-85.
- NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.
- NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental, salud ambiental, Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo.
- Oku, H., Ikeda, T., Honma, Y., Sotozono, C., Nishida, K., Nakamura, Y., ... & Kinoshita, S. (2002). Gene expression of neurotrophins and their high-affinity trk receptors in cultured human Müller cells. *Ophthalmic Research*, 34 (1), 38-42.
- Olanow, C. W. (1993). A radical hypothesis for neurodegeneration. *Tins*, 16 (11), 439-444.
- O'Rahilly, R. (2000). *Anatomía de Gardner*. México: Interamericana McGraw-Hill.
- Ortega-Aznar, A., Romero-Vidal, F. J., & Salvadó, J. (2000). Encefalomiелitis aguda diseminada de evolución fatal: estudio clínico patológico. *Revista de Neurología*, 31 (1), 42-45.
- Parrilla-Reverter, G., Agudo, M., Sobrado-Calvo, P., Salinas-Navarro, M., Villegas-Pérez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (2009). Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after a complete intraorbital nerve crush injury: A quantitative *in vivo* study. *Experimental Eye Research*, 89, 32-41.

- Pelayo, A. L., Talavera, D. K., Martínez, L., Marcelino, J., Pineda, J. U., Fuentes, A. L., & Meléndez, E. (2015). Inducción de inmunotolerancia sistémica como estrategia preventiva o terapéutica para trastornos degenerativos que cursan con inflamación crónica. *Acta Universitaria*, 25 (NE-1), 39-43.
- Perez, M. T. R., & Caminos, E. (1995). Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neuroscience Letters*, 183 (1-2), 96-99.
- Pineda, J. U. (2017). *Efecto neuroprotector de la inmunotolerancia a antígenos neurales en ratas con lesión por compresión del nervio óptico* (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.
- Prophet, E. B., Mills, B., Arrington, J. B., Sobin, L. H., Heffess, C. S., & Mullick, F. G. (1992). *Métodos Histotecnológicos*. Washington, D. C.: Registro de Patología de los Estados Unidos de América.
- Quesada-Yamasaki, D., Arce-Soto, E., Ramírez, K., Fornaguera-Trías, J., & Mora-Gallegos, A. (2016). El papel de la microglía en la señalización neuroinflamatoria y la respuesta neuroinmune. *Revista eNeurobiología*, 7 (16): 101016, 1-13.
- Quiroz, F. (2004). *Tratado de anatomía humana*. México: Porrúa.
- Raff, M. C., Whitmore, A. V., & Finn, J. T. (2002). Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science*, 296, 868-871.
- Ransohoff, R. M. (2006). *Cytokines and the CNS*. United States of America: Taylor and Frances Group.
- Rojas, M., Salmen, S., & Berrueta, L. (2009). Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa - ULA*, 4 (3), 92-106.
- Rumpel, S. (2018). Supporting recovery from brain injury. A window of therapeutic opportunity could widen beyond the initial phase of brain injury. *Science*, 360 (6384), 30-31.

- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133, 775-787.
- Sánchez, G. (2014). *Contribución de la regulación del receptor de neurotrofinas TrkB a la muerte neuronal en isquemia cerebral* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
- Sanz, S. (2012). *Estudio de la función de Apolipoproteína D en la interacción microglía – astrogliá ante el estrés oxidativo y la inflamación* (Tesis de maestría). Instituto de Biología y Genética Molecular. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología, Universidad de Valladolid-CSIC, España.
- Sapieha, P. (2005). *Neuroprotection and regeneration of adult lesioned retinal ganglion cells by the modulation of fibroblast growth factor-2 and receptor tyrosine phosphatase-sigma* (Tesis doctoral). Université de Montréal, Quebec, Canadá.
- Schecterson, L. C., & Bothwell, M. (2010). Neurotrophin receptors: Old friends with new partners. *Developmental Neurobiology*, 332-338.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3 (6), 1101-1108.
- Schwartz, M. & Cohen, I. R. (2000). Autoimmunity can benefit self-maintenance. *Immunology Today*, 21 (6), 265-268.
- Seki, M., Fukuchi, T., Tanaka, T., Nawa, H., Takei, N., & Abe, H. (2004). Quantitative analyses of mRNA and protein levels of neurotrophin-3 in the rat retina during postnatal development and aging. *Japanese Ophthalmological Society*, 48, 460-464.
- Seki, M., Nawa, H., Fukuchi, T., Abe, H., & Takei, N. (2003). BDNF is upregulated by postnatal development and visual experience: Quantitative and immunohistochemical analyses of BDNF in the rat retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44 (7), 3211-3218.
- Simpkins, J. W., Yi, K. D., Yang, S. H., & Dykens, J. A. (2010). Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800, 1113-1120.

- Sobrino, C., Peinares, A., Puebla, L., & Arilla, E. (2013). Efecto de la queleritrina y de la ciclosporina sobre la peroxidación lipídica y receptores de somatostatina en hipocampo de rata con encefalomiелitis autoinmune experimental. *dianas*, 2 (2): e20130906, 1-11.
- Suárez-Morales, M. (2008). Protección cerebral en el traumatismo craneoencefálico. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 31 (1), S150-S154.
- Talavera-Carrillo, D. K. (2015). *Inducción de inmuno tolerancia sistémica con proteínas derivadas de la médula espinal a través de desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del ojo en ratas juveniles* (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.
- Teng, K. K., Felice, S., Kim, T., & Hempstead, B. L. (2010). Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Developmental Neurobiology*, 350-359.
- Tezel, G., Hernandez, M. R., & Wax, M. B. (2000). Immunostaining of heat shock proteins in the retina and optic nerve head of normal and glaucomatous eyes. *Archives of Ophthalmology*, 118 (4), 511-518.
- Thermo Fisher Scientific. (2016). TRizol™ Reagent User Guide. Recuperado de: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf
- Toscano-Tejeda, 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.
- Von-Bartheld, C. S. (1998). Neurotrophins in the developing and regenerating visual system. *Histol Histopathol*, 13, 437-459.
- Weber, A. J., Harman, C. D., & Viswanathan, S. (2008). Effects of optic nerve injury, glaucoma, and neuroprotection on the survival, structure, and function of ganglion cells in the mammalian retina. *The Journal Physiology*, 586 (18), 4393-4400.

- Weber, A. J., Harman, C. D., & Viswanathan, S. (2008). Effects of optic nerve injury, glaucoma, and neuroprotection on the survival, structure, and function of ganglion cells in the mammalian retina. *The Journal of Physiology*, 586 (18), 4393-4400.
- Weichsler, N., & Herrera, H. D. (2010). Neuroprotección: nuevas estrategias para la terapia de asociación en el glaucoma canino. *Consulta de difusión veterinaria*, 18 (173), 59-61.
- Wen, Y., Li, W., Poteet, E. C., Xie, L., Tan, C., Yan, L. J., ... & Yang, S. H. (2011). Alternative mitochondrial electron transferase novel strategy for neuroprotection. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (18), 16504-16515.
- Wise, P. M. (2002). Estrogens and neuroprotection. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 13 (6), 229-230.
- Xiong, Y., Zhang, Y., Mahmood, A., & Chopp, M. (2015). Investigational agents for treatment of traumatic brain injury. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 24 (6), 743-760.
- Yang, S., Ding, Q., Guo, Y., Zhao, C., Jia, Y., Que, H., ... & Liu, S. (2010). Gel-based proteomic characterization of soluble and insoluble fraction proteins in rat spinal cord. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 3 (3), 074-081.
- Yin, Y., Cui, Q., Li, Y., Irwin, N., Fischer, D., Harvey, A. R., & Benowitz, L. I. (2003). Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *The Journal of Neuroscience*, 23 (6), 2284-2293.
- Yin, Y., Henzl, M. T., Lorber, B., Nakazawa, T., Thomas, T. T., Jiang, F., ... & Benowitz, L. I. (2006). Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells. *Nature Neuroscience*, 9 (6), 843-852.
- Yoles, E., Hauben, E., Palgi, O., Agranov, E., Gothilf, A., Cohen, A., ... & Schwartz, M. (2001). Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *The Journal of Neuroscience*, 21 (11), 3740-3748.

- Yoon, S., Casaccia, P., Carter, B., & Chao, M. V. (1998). Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *The Journal of Neuroscience*, 18 (9), 3273-3281.
- Zaa, C., Valdivia, M., & Marcelo, A. (2012). Efecto neuroprotector del extracto hidroalcohólico de *Piper aduncum* “matico” en un modelo *in vitro* de neurodegeneración. *Revista Peruana de Biología*, 19 (3), 235-240.
- Zhao, H., Sapolsky, R. M., & Steinberg, G. K. (2006). Phosphoinositide-3-kinase/Akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke. *Molecular Neurobiology*, 34 (3), 249-269.
- Zhou, D., Huang, C., Lin, Z., Zhan, S., Kong, L., Fang, C., & Li, J. (2014). Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cellular Signalling*, 26 (2), 192-197.

Imágenes tomadas de internet:

Figura 1. Recuperada de: <https://www.familyhealthchiropractic.com/chiropractic-adjustment-can-boost-metabolism-reduce-muscle-fatigue-increase-strength/attachment/19588/> (2018).

Figura 2. Recuperada de: http://www.picstopin.com/optische-ger-amp-228te-mdash-grundwissen-physik_qG8Se1u*rg04Tm9NJb43ilYpbZFO7c5WaX2XObWcsJWLr%7C6hCIG7JAVEDy8WgE*DII8Mpw1SQhIYn0OfGKbU2Q/*RD4D2Q4EztoFuAap6caHGJe2q*FdRFclerFbRdiv6Rs4BVv*ch9IO6%7CUznsZxPI4J9FyhPBhuN%7CxujiYjWU4g/ (2018).