



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología

**Programa Institucional de Maestría en
Ciencias Biológicas**

Área temática: Biotecnología pecuaria

**Efecto neuroprotector de dos estrategias
inmunomoduladoras en ratas con lesión del
nervio óptico.**

**Tesis que para obtener el grado de Maestra en
Ciencias Biológicas presenta:**

Biol. Diana Karina Talavera Carrillo

Director de tesis:

D.C. Esperanza Meléndez Herrera

Morelia, Michoacán, junio de 2019

DEDICATORIA

A mi familia en general:

Mi mamá: Silvia Carrillo Alcantar

Mi papá: Javier Talavera Torres

Mis hermanos: Marco, Gabriela, Cindy, Miguel y Estephani

Mi hija; Leah Alexandra

Mi pareja: Alejandro

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme tener y disfrutar a mi familia, gracias a mi familia por apoyarme en todas mis decisiones. Gracias a la vida porque cada día me demuestra lo hermosa y lo justa que puede llegar a ser.

A mi directora de tesis D. en C. Esperanza Meléndez-Herrera por sus tiempo, conocimientos, asesoría, apoyo y consejos durante durante este y otros proyectos.

A mi comité sinodal conformado por la D. en C. Rosa Elvira Nuñez Anita, la D. en C. Alejandra Ochoa Zarzosa, la D. en C. Naima Lajud-Ávila, el D en C. Daniel Godínez Hernández gracias por sus valiosas observaciones, aportaciones, sugerencias y sobre todo por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo y mi proyecto.

A la D. en C. Rosa Elvira Núñez-Anita Investigadora titular, del centro multidisciplinario de estudios en biotecnología CMEB del departamento de proteómica y bioingeniería celular por su valioso tiempo, por compartir su amplio conocimiento y la asesoría en la técnica ensayo de inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA).

A la M. en C. Sibila Concha-Santos, Técnico asociada al laboratorio nacional de nutrigenómica y microbiómica digestiva animal, por su apoyo técnico en la cuantificación del material genético.

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

A la M. en C. Lorena Martinez Alcantar por compartir sus conocimientos y experiencia durante todo el tiempo que coincidimos en el laboratorio. Agradezco también su amistad, alegría, apoyo y consejos para que esta experiencia fuera aun más grata.

A Q.F.B. Miguel Ávalos Viveros por todo su apoyo y compañía durante toda la etapa de experimentos. Agradezco también por su amistad y la alegría que me apporto en esta etapa.

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT EMH No. 180762 y ALFF No . 258747) por el financiamiento del presente trabajo y por la beca otorgada durante mi estancia (DKTC 814662).

No ha sido sencillo el camino, pero gracias a sus aportes y apoyo tanto económico como laboral, esta meta se cumplió. Les agradezco y les hago presente mi gran afecto.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	VIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
1. Fisiopatología de la lesión traumática del sistema nervioso central y participación del sistema inmunológico	3
2. El eje visual y el nervio óptico como modelo de estudio	8
3. Inmunomodulación como estrategia neuroprotectora	12
3.1. Autoinmunidad protectora	13
3.1.1. Inducción de autoinmunidad protectora y mecanismo de acción	13
3.1.2. Autoinmunidad protectora en lesiones del nervio óptico y la médula espinal	15
3.2. Tolerancia inmunológica	16
3.2.1. Inducción de tolerancia inmunológica y mecanismo de acción	18
3.2.2. Tolerancia inmunológica en lesiones del nervio óptico y médula espinal	20
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
IV. HIPÓTESIS	23
V. OBJETIVOS	23
GENERAL	23
PARTICULARES	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. Animales	24
2. Diseño experimental	24
3. Extracción y cuantificación de antígenos neurales	25
4. Inducción de tolerancia inmunológica a través de desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del ojo (DIACA)	25
5. Inducción de autoinmunidad	26

6. Lesión por compresión del nervio óptico	27
7. Obtención y preservación del tejido	27
8. Técnicas histológicas	28
9. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)	28
10. Análisis estadístico	29
VII. RESULTADOS	31
1. Inducción de tolerancia inmunológica y autoinmunidad	31
2. Perfil inflamatorio en la retina a los 7 días postlesión del nervio óptico	33
3. Expresión de factores de supervivencia y muerte en la retina a los 7 días post-lesión del nervio óptico	35
4. Preservación de la mielina en el sitio de lesión	36
5. Expresión de factores de supervivencia y muerte en la retina a los 14 días post-lesión del nervio óptico	37
VIII. DISCUSIÓN	39
IX CONCLUSIÓN	45
ANEXO	46
X. BIBLIOGRAFÍA	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA

SIGNIFICADO

AgN	Antígenos neurales
Bcl-2	Del inglés, oncogen B-cell lymphoma 2
BDNF	Del inglés, brain-derived neuronal factor
Brn-3a	Del inglés, brain-specific homeobox/POU domain protein
BSA	Del inglés bovine serum antigen
Casp-3	Caspasa 3
CGR	Células ganglionares de la retina
DAMPs	Del inglés, damage-associated molecular patterns
DIACA	Desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo
Foxp3	Del inglés, forkhead box P3
IFN- γ	Interferon γ
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 3
NT-3	Neurotrofina 3
PBS	Del inglés, phosphate buffered saline
SNC	Sistema nervioso central
Th	Linfocitos T helper
TNF- α	Del inglés, tumor necrosis factor
Treg	Linfocito T regulador

RESUMEN

La lesión traumática al sistema nervioso central de los mamíferos desencadena procesos degenerativos secundarios orquestados, en gran parte, por la activación del sistema inmunológico en respuesta al daño. Con la intención de facilitar la reparación tisular y evitar la extensión de la lesión, se han desarrollado dos alternativas terapéuticas inmunomoduladoras (tolerancia inmunológica y autoinmunidad protectora). Ambas estrategias estimulan procesos inmunológicos opuestos y protegen al tejido nervioso de la degeneración secundaria en distintos modelos de daño. Sin embargo, ningún trabajo ha evaluado su potencial neuroprotector usando el mismo modelo de estudio. Con la intención de entender los eventos neuroinmunológicos desencadenados por ambas estrategias en respuesta al trauma, su potencial protector fue evaluado en un modelo de compresión del nervio óptico. La tolerancia inmunológica fue inducida mediante la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo (DIACA) con antígenos neurales (AgN) derivados de la médula espinal, mientras que la autoinmunidad protectora se indujo mediante inoculaciones subcutáneas en flancos con los mismos antígenos neurales emulsificados con adyuvante completo de Freund. Una vez evaluada la inducción de ambos estados de inmunomodulación, el nervio óptico de las ratas tolerantes y autoinmunes fue lesionado y los animales sacrificados 7 o 14 días post lesión (dpl). La inflamación fue evaluada en la retina mediante la expresión de mediadores pro y anti-inflamatorios, mientras que el potencial neuroprotector fue evaluado mediante la expresión de factores de supervivencia (Brn-3a y Bcl-2) y muerte (Casp-3), así como mediante la preservación de la estructura tisular y mielina en el nervio óptico a los 7 dpl. Los resultados del presente estudio muestran que la tolerancia a AgN promueve la expresión de IL-4 ($F_{(5,13)}=10.62, p < 0.001$) e IL-6 ($F_{(5,12)}=4.87, p < 0.01$) en la retina, mientras que la inmunización con AgN promueve la expresión de IFN- γ ($F_{(5,15)}= 3.83, p < 0.05$) y TNF- α ($F_{(5,14)}= 22.57, p < 0.001$). Con respecto al potencial neuroprotector evaluado al día 7 postlesión, los resultados muestran que la tolerancia a AgN incrementa la expresión de Brn-3a ($t_{(1,5)}=7.36, p=0.001$), mientras disminuye la expresión de Casp-3 ($t_{(1,4)}= 35.51, p=0.001$). Por su parte, la

autoinmunidad incrementa tanto la expresión de Bcl-2 ($t_{(1,4)} = -1.13$, $p > 0.05$) como Casp-3 ($t_{(1,4)} = 35.51$, $p < 0.001$). Los análisis histológicos del nervio óptico muestran que la tolerancia a AgN preserva mejor la estructura tisular y la mielina en el epicentro de la lesión, en comparación con el resto de los grupos que muestran pérdida de la continuidad tisular. Al día 14 la expresión de Brn-3a, Bcl-2 y Casp-3 fue evaluada en el grupo tolerante a AgN. Los resultados muestran que esta estrategia únicamente incrementa la expresión de Bcl-2 ($t_{(1,5)} = 2.77$, $p < 0.05$) en la retina. Tomados en conjunto, los resultados sugieren que la tolerancia a AgN es una estrategia capaz de modular la inflamación en la retina y retrasar la pérdida de las células ganglionares de la retina y mielina en el nervio óptico, en comparación con la autoinmunidad.

Palabras clave: Neuroprotección, tolerancia, autoinmunidad, inflamación, lesión

ABSTRACT

Traumatic injury in the central nervous system of mammals triggers secondary degenerative processes orchestrated, largely, by the activation of the immune system in response to damage. With the intention of facilitating the tissue repair and avoiding the extension of the lesion, two therapeutic immunomodulatory alternatives have been developed (immunological tolerance and protective autoimmunity). Both strategies stimulate opposite immunological processes and protect nervous tissue from secondary degeneration in different damage models. However, no work has evaluated its neuroprotective potential using the same study model. With the intention of understanding the neuroimmunological events triggered by both strategies in response to the trauma, its protective potential was evaluated in a compression of the optic nerve model. Immunological tolerance was induced by Anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) with neural antigens (NAg) derived from the spinal cord, while protective autoimmunity was induced by subcutaneous flank inoculations with the same neural antigens emulsified with complete Freund's adjuvant. Once the induction of both immunomodulation states has been evaluated, the optic nerve of the tolerant and autoimmune rats was injured and the animals sacrificed 7 or 14 days post injury (dpi). The inflammation was evaluated in the retina by the expression of pro and anti-inflammatory mediators, while the neuroprotective potential was evaluated by the expression of survival factors (Brn-3a and Bcl-2) and death (Casp-3), as well as by preserving the tissue structure and myelin in the optic nerve at 7 dpi. The results of the present study show that tolerance to NAg promotes the expression of IL-4 ($F(5,13)=10.62, p < 0.001$) and IL-6 ($F(5,12)=4.87, p < 0.01$) in the retina, whereas immunization with NAg promotes the expression of IFN- γ ($F(5,15)= 3.83, p < 0.05$) and TNF- α ($F(5,14)= 22.57, p < 0.001$). With respect to the neuroprotective potential evaluated at 7 day post-injury, the results show that tolerance to NAg increases the expression of Brn-3a ($t(1,5)=7.36, p=0.001$), while decreasing the expression of Casp-3 ($t(1,4)= 35.51, p < 0.001$), Histological analyzes of the optic nerve show that tolerance to NAg preserves better the tissue

structure and myelin in the epicenter of the lesion, in comparison with the rest of the groups that show loss of tissue continuity. At day 14 the expression of Brn-3a, Bcl-2 and Casp-3 was evaluated in the group tolerant to NAg. The results show that this strategy only increases the expression of Bcl-2 ($t(1,5) = 2.77, p < 0.05$) in the retina. Taken together, the results suggest that tolerance to NAg is a strategy capable of modulating inflammation in the retina and delay the loss of ganglion cells of the retina and myelin in the optic nerve, compared with autoimmunity.

Key words: Neuroprotection, tolerance, autoimmunity, inflammation, injury.

I. INTRODUCCIÓN

La lesión traumática al sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados desencadena procesos degenerativos secundarios que extienden el daño hacia regiones sanas no impactadas por el trauma inicial (Ramon y Cajal, 1991). Esta degeneración secundaria es orquestada en buena medida por la acción del sistema inmunológico local y sistémico en respuesta al daño (Faden, 1993; Lynch, 1994; Toscano-Tejeida *et al.*, 2016). Con el objetivo de facilitar los procesos reparativos después de un daño y evitar la extensión de la lesión, se han desarrollado dos estrategias de inmunomodulación en la investigación neurobiológica. La primera de estas estrategias, conocida como autoinmunidad protectora, está orientada a exacerbar la acción del sistema inmunológico (particularmente la respuesta inflamatoria) en un intento por hacer más eficiente la remoción de restos celulares y facilitar los procesos reparativos (Schwartz y Kipnis, 2001). Por el contrario, la segunda estrategia denominada tolerancia inmunológica, promueve la contención de la respuesta inflamatoria después de un trauma al SNC para evitar la degeneración secundaria (Jones *et al.*, 2014). Estas estrategias descansan sobre evidencias científicas diferentes y sin embargo, ambas favorecen los eventos reparativos y protegen al tejido nervioso de la degeneración secundaria después de una lesión (Fisher *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2016). Recientemente nuestro grupo de investigación ha demostrado que una forma eficiente para modular la respuesta inflamatoria, y favorecer la supervivencia de las células ganglionares de la retina (CGR) después de una lesión al nervio óptico, es mediante la inducción de la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo (DIACA) con un coctel de antígenos neurales (Martínez-Alcantar *et al.*, 2019).

Con la intención de entender los eventos neuroinmunológicos desencadenados por ambas estrategias inmunomoduladoras (autoinmunidad e inmunotolerancia) en respuesta al trauma del SNC, en el presente trabajo fue evaluado su potencial neuroprotector en un modelo de compresión del nervio óptico. La inmunotolerancia fue inducida mediante DIACA con AgN (Martínez-Alcantar *et al.*, 2019 Talavera-Carrillo, 2015) y la autoinmunidad inducida mediante la inyección subcutánea de

los mismos antígenos siguiendo protocolos previamente reportados donde un efecto neuroprotector fue observado (Fisher *et al.*, 2001). El perfil inflamatorio desencadenado por cada estrategia inmunomoduladora fue cuantificado en la retina después de la lesión del nervio óptico. El potencial neuroprotector fue evaluado mediante la expresión de factores de supervivencia (Brn-3a y Bcl-2) y muerte (Casp-3) en la retina, así como mediante la preservación de la estructura tisular y mielina en el nervio óptico. Los resultados del presente estudio contribuyen a esclarecer los mecanismos mediante los cuales ambas estrategias promueven la neuroprotección.

II. ANTECEDENTES

1. Fisiopatología de la lesión traumática del sistema nervioso central y participación del sistema inmunológico

Una lesión traumática en el SNC es devastadora debido, entre otros eventos, a que las neuronas dañadas tienen capacidades limitadas para regenerar sus axones y recuperar las conexiones previamente establecidas (Ramón y Cajal, 1969). Además, quedan expuestas a un ambiente poco propicio capaz de extender el daño a regiones vecinas sanas. Así, el resultado de la lesión no sólo es la ruptura en la comunicación entre las neuronas dañadas, sino una cascada de eventos que conducen a procesos inflamatorios, a la degeneración neuronal y a la muerte celular secundaria al trauma (Horner y Gage 2000).

El SNC en condiciones fisiológicas expresa la mayoría de los mediadores inflamatorios en niveles muy bajos. Sin embargo, su expresión se incrementa rápidamente en respuesta a una lesión o infección tisular (Rothwell y Luheshi, 2000). Uno de los procesos que favorecen la fase inflamatoria después de una lesión es el reclutamiento de las células del sistema inmunológico tanto residentes como periféricas.

Las células gliales (p. ej. Astrocitos y microglia) son los macrófagos residentes y las células de vigilancia inmunológica del SNC. En condiciones basales, la microglia es quiescente y tiene una forma estelar con un núcleo pequeño y un cuerpo celular con varios procesos ramificados (Perry *et al.*, 1993). Sin embargo, una de las características más importantes de la microglia es la rapidez con la que modifica su fenotipo al exponerse a un ambiente post-traumático. Este ambiente es rico en residuos que las células liberan después del daño, entre ellos especies reactivas de oxígeno, potasio, y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) como el ADN nuclear o mitocondrial, o el ATP (Guo *et al.*, 2015). Esta interacción de las células microgliales con el ambiente post-traumático las activa, induciendo así el cambio de su fenotipo hacia células migratorias que presentan antígenos y que inducen la expresión de nuevas proteínas (p. ej. citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β y sus receptores). Las

células microgliales activas e hiperreactivas tienen una morfología alterada, pueden sufrir mitosis y convertirse en células fagocíticas con enzimas citotóxicas (Kreutzberg, 1996), e incluso viajar hacia tejidos aledaños como la retina en el caso de la lesión del nervio óptico (Puyang *et al.*, 2016). Por su parte, los astrocitos en su estado normal desempeñan múltiples funciones de mantenimiento de la homeostasis como la formación de la barrera hematoneural, la regulación de iones y neurotransmisores en el espacio sináptico y la vigilancia inmunológica (Kimelberg, 2004). Sin embargo, en respuesta a una lesión / enfermedad, se remodelan y se vuelven reactivos, lo que induce cambios en su morfología, expresión génica y función (Sofroniew y Vinters, 2010). Algunos de estos cambios reactivos incluyen hipertrofia, proliferación, migración, liberación de citocinas y componentes de la matriz extracelular, así como formación de cicatrices (Hernández, 2000; Sun *et al.*, 2010). Estos efectos pueden proteger al tejido nervioso de agentes infecciosos y favorecer eventos reparativos, pero también pueden desencadenar degeneración secundaria (Mohn T. y Koob A. 2015).

Además, cuando la barrera hematoneural está comprometida, el SNC puede verse afectado no sólo por los mediadores inflamatorios producidos en el sitio por las células residentes, sino también por las acciones de mediadores procedentes de la periferia (Jones, 2014). Entre las primeras poblaciones en migrar hacia el sitio de la lesión se encuentran los neutrófilos, los macrófagos derivados de monocitos y las células dendríticas (Donnelly y Popovich, 2008). Estas poblaciones fagocitan los restos celulares y favorecen los eventos reparativos, aunque también incrementan el daño de la barrera hematoneural y causan edema (Rosenberg, 2012). Esta fase inicial después del trauma está caracterizada por la producción de citocinas, quimiocinas y alarminas, las cuales además de incrementar el ambiente pro-inflamatorio continúan el reclutamiento de células periféricas e inducen la activación del sistema del complemento (Bernnan *et al.*, 2012).

Los linfocitos T, por ejemplo, se infiltran al SNC por los altos niveles de quimiocinas y citocinas liberadas después del trauma (Eugenin *et al.*, 2016). Los linfocitos T reconocen a los antígenos presentados por moléculas del complejo

principal de histocompatibilidad tipo I y II y se diferencian en linfocitos citotóxicos (CD8+) y colaboradores (Th, CD4+), respectivamente. Como resultado de la activación del receptor del linfocito T por el antígeno, los linfocitos Th se diferencian en varios subtipos incluyendo Th1, Th2, Th9, Th17 y T reguladores (Tregs). Cada subtipo está caracterizado por la producción de citocinas específicas de linaje, como se muestra en la figura 1. Una vez que los linfocitos T tienen acceso al tejido nervioso dañado, se enfrentan a un ambiente pro-inflamatorio rico en restos celulares y macrófagos presentadores de antígeno, que los conduce a evadir la tolerancia inmunológica de lo propio y a diferenciarse principalmente en linfocitos Th1 autorreactivos. Este cambio de fenotipo los lleva a producir más citocinas, algunas de las cuales actúan como factores neurotróficos y otras como factores que promueven la degeneración axonal, la muerte celular y el deterioro neurológico como se muestra en la figura 2 (Kawami *et al.*, 2005).

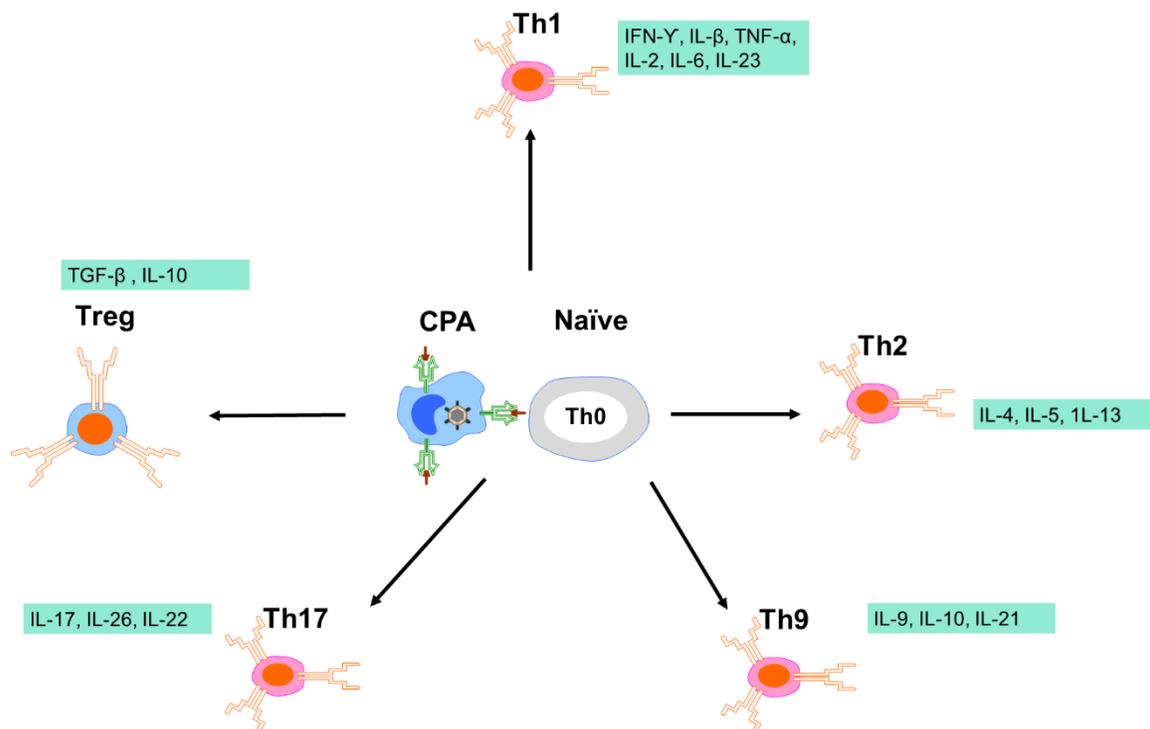
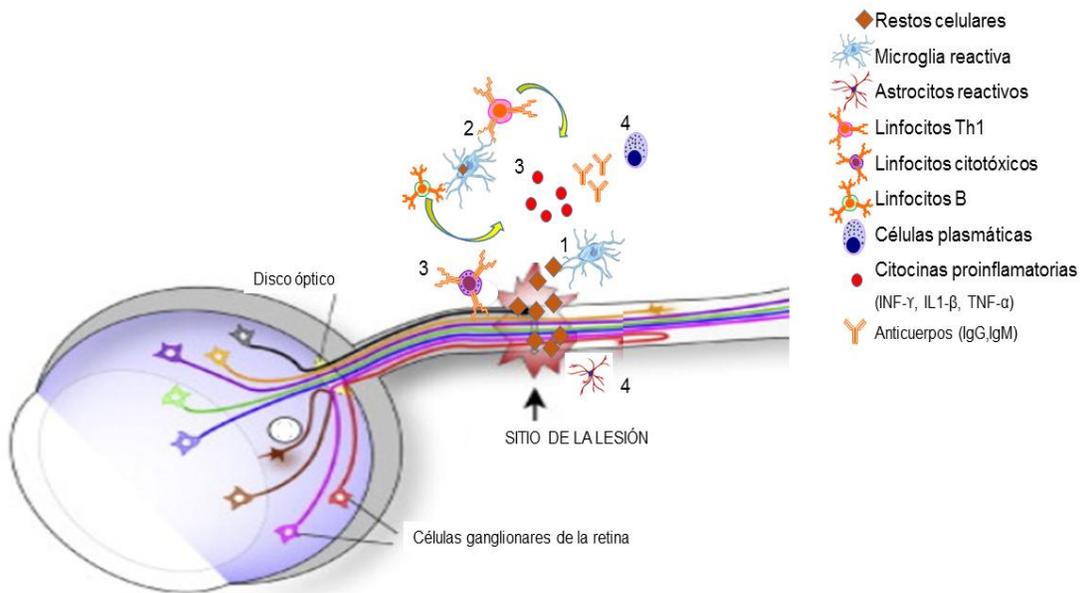


Figura 1. Representación esquemática de los subtipos en los que se diferencian los linfocitos T después de la presentación del antígeno y las principales citocinas que secreta cada uno (Luckheeram *et al.*, 2012; Zhu, 2015; *modificado*). Las CPA hacen referencia a las células presentadoras de antígenos, mientras que Naïve a las células indiferenciadas.

Figura 2. Representación esquemática



ca de los eventos celulares y moleculares después de la lesión del nervio óptico (Pernet y Schwab, 2014; *modificado*). Los números hacen referencia al orden de los eventos en respuesta al daño. 1. La constante presencia de restos celulares y el ambiente pro-inflamatorio modifican el fenotipo de la microglia volviéndola reactiva (secretora de citocinas pro-inflamatorias y presentadora de antígenos). 2. El ambiente pro-inflamatorio y la ruptura de la barrera hematoneural favorecen el reclutamiento de células del sistema inmunológico periférico (linfocitos T y B) al sitio de la lesión y la presentación antigénica. 3. El resultado de esta interacción es la secreción de citocinas pro-inflamatorias y anticuerpos, así como la muerte mediada por linfocitos T citotóxicos. 4. Los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos, mientras que el ambiente favorece el fenotipo de astrocitos reactivos con funciones fagocíticas y la formación de la cicatriz glial.

Otra población que es reclutada al SNC después del trauma son los linfocitos B, los cuales se activan mediante la unión del antígeno al receptor de linfocito B. Esta unión ocurre dentro de los folículos presentes en los nódulos linfáticos o en el bazo (Harwod y Batista, 2010). La segunda señal de activación depende de la unión del antígeno capturado por los linfocitos B al receptor del linfocito T mediante el complejo CD40 (Murphy y Weaver, 2009). Esta unión produce señales co-estimuladoras como citocinas (Hayes *et al.*, 2002).

En ausencia de la segunda señal de activación los linfocitos B producen únicamente anticuerpos IgM, mientras que ambas señales estimulan la recombinación somática y el cambio de isotipo (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) en los

linfocitos B (Zhang y Popovich, 2011). Los diferentes isotipos de anticuerpos tienen distintos efectos como la neutralización del antígeno, la opsonización para favorecer su remoción, así como la activación del complemento (Vidarsson, 2014). Mientras los anticuerpos IgG están principalmente involucrados en la neutralización y la opsonización, los IgM activan intensamente al sistema del complemento y promueven la inflamación y la destrucción tisular (Vidarsson, 2014).

Se ha reportado que la lesión por contusión en la médula espinal libera autoantígenos capaces de disparar además de la expansión de células T, la proliferación de linfocitos B en los nódulos linfáticos y en el bazo (Ankeny *et al.*, 2006). Esta expansión está acompañada de un incremento en los niveles circulantes de anticuerpos de tipo IgG e IgM entre los 7 y 14 dpl (Ankeny *et al.*, 2006). Adicionalmente, este trabajo también han demostrado que los linfocitos B autorreactivos se acumulan alrededor de los sitios de la lesión en forma de nódulos germinales y producen neurotoxicidad e incremento del reclutamiento de macrófagos CD68+ y astrocitos reactivos (Ankeny *et al.*, 2006).

En conjunto, la evidencia presentada anteriormente muestra que la lesión al SNC desencadena una serie de respuestas inflamatorias (inflamación tisular auto-dirigida dominada por el sistema inmunológico innato) y autoinmunes (pérdida de la tolerancia contra sus mismos componentes activada por el sistema inmunológico adaptativo) capaces de incrementar la progresión de la degeneración secundaria al trauma como se observa en la figura 3 (Allison y Ditor, 2015).

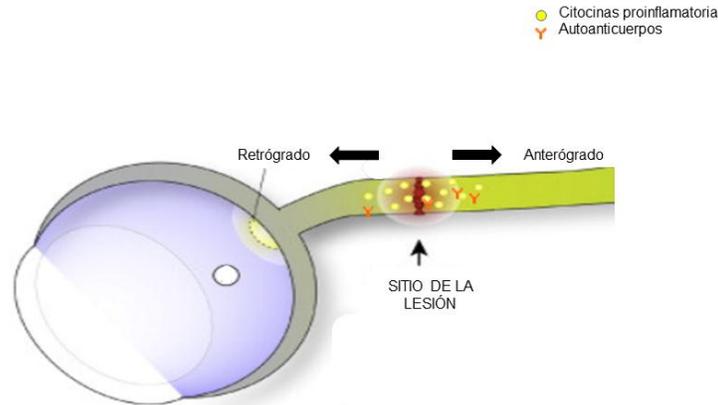


Figura 3. Representación esquemática de la inflamación crónica y la progresión de la lesión secundaria al trauma. La degeneración avanza simultáneamente hacia la retina causando la muerte de las células ganglionares y hacia el quiasma óptico causando la fragmentación y la desmielinización axonal (London *et al.*, 2014; *modificado*).

2. El eje visual y el nervio óptico como modelo de estudio

La retina y el nervio óptico forman parte del SNC. Aunque ambas estructuras se localizan fuera del encéfalo, se desarrollan a partir de tejido diencefálico durante etapas tempranas del desarrollo embrionario. Por lo tanto, las fibras del nervio óptico están cubiertas de mielina producida por oligodendrocitos característicos del SNC (Ono *et al.*, 1997).

La retina está formada por capas de neuronas especializadas interconectadas a través de procesos sinápticos. La luz que entra en el ojo es capturada por células fotorreceptoras en la capa más externa de la retina, lo que inicia una cascada de señales que finalmente llegan a las CGR, quienes muestran las propiedades típicas de las neuronas del SNC y comprenden un cuerpo celular, dendritas y un axón. Los axones de estas CGR se unen para formar el nervio óptico, el cual proyecta hasta el núcleo geniculado lateral en el tálamo y el colículo superior mesencefálico, de donde la información es retransmitida a los centros superiores de procesamiento visual que nos permiten percibir una imagen (London *et al.*, 2014).

La retina y el nervio óptico constituyen un modelo de investigación particularmente conveniente por varias razones. Primero, comparado con otras

partes del SNC, el nervio óptico es relativamente accesible para la manipulación. Segundo, como las neuronas en la retina son evidentemente reconocibles, la muerte neuronal puede ser cuantificada directamente. Así, la progresión del daño después de una lesión traumática está bien descrita. Se sabe que la lesión traumática conduce a degeneración retrógrada (hacia la retina) y anterógrada (hacia el tálamo y mesencéfalo) (Figura 3. London *et al.*, 2014). En la retina, la muerte de las CGR comienza a ser evidente desde el tercer día post-lesión y durante los primeros 7 días se pierde alrededor del 50% de la población. Este proceso degenerativo continúa durante los siguientes días, de tal manera que alrededor del día 14 se ha perdido más del 70% de la población de CGR (Agudo-Barriuso *et al.*, 2011). En tercer lugar, la organización única de las capas de la retina permite distinguir entre las distintas neuronas de la retina y sus interacciones. Por estas características, el daño que se observa por la distorsión de la estructura normal es fácilmente detectable (Tang, 2011). Una ventaja extra de este modelo de lesión radica en que es poco invasivo y permite a los animales una pronta recuperación (Agudo-Barriuso *et al.*, 2011). En conjunto, estas características hacen de éste, un modelo muy útil para estudiar los mecanismos moleculares de patologías y traumatismos, así como la respuesta a diversos agentes terapéuticos.

La preservación de la vía visual puede ser evaluada mediante la expresión de factores de supervivencia en la retina como el factor de transcripción brain-specific homeobox/POU domain protein (Brn-3a), el cual es expresado intensamente en neuronas sensoriales durante el desarrollo embrionario y en las CGR a lo largo de la ontogenia (Badea *et al.*, 2009; Lanier y Turner, 2007). En las CGR, Brn-3a actúa presumiblemente como un factor anti-apoptótico (Lanier *et al.*, 2006), y su expresión disminuye después de la lesión del nervio óptico en aparente correlación con la supervivencia de las neuronas ganglionares (Nadal *et al.*, 2009). El oncogen B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) es otro factor de supervivencia ampliamente utilizado para evaluar el efecto de los tratamientos neuroprotectores en modelos de lesión del nervio óptico (Maes *et al.*, 2017). Trabajos previos han mostrado que la degeneración de las CGR subsecuente a la lesión aguda o

crónica del nervio óptico, ocurre principalmente debido a apoptosis intrínseca asociada a disfunción mitocondrial (Grosskreutz *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2017). Debido a que Bcl-2 preserva la integridad de la membrana externa mitocondrial, evita la salida de citocromo C y la activación de factores pro-apoptóticos como caspasas (Bernhardi, 2004; Vila y Przedborski, 2003). De esta manera, el incremento en la expresión de Bcl-2 en la retina después de la lesión del nervio óptico mantiene la supervivencia de las CGR (Porciatti *et al.*, 1996). Por su parte, la Casp-3 es una proteína involucrada en la activación de apoptosis tanto disparada por la vía intrínseca como mediante la vía extrínseca (dependiente de la activación del receptor Fas). La forma activa de esta proteasa coordina la destrucción de elementos celulares como la fragmentación del DNA y la degradación de proteínas del citoesqueleto, entre otros eventos (Porter y Jänicke, 1999; Thomas *et al.*, 2017) como se observa en la figura 4. Estudios previos muestran que la lesión por compresión del nervio óptico incrementa la expresión de Casp-3 en la retina desde las 48 horas post-lesión, y que este incremento está correlacionado con la activación de la proteasa y la muerte apoptótica de las CGR (Sánchez y María, 2016; Thomas *et al.*, 2017).

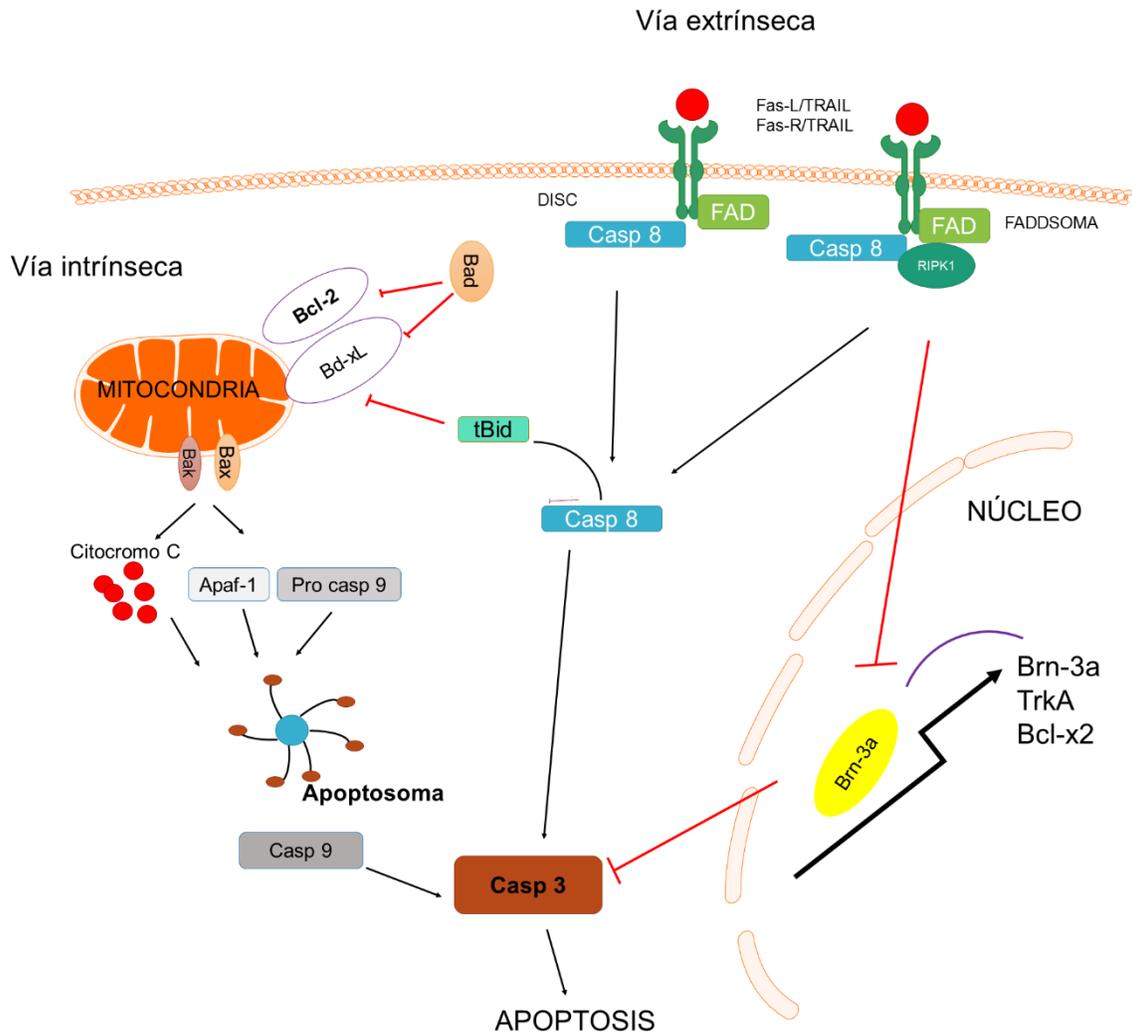


Figura 4. Representación esquemática de los factores de supervivencia (Brn-3a y Bcl-2) y muerte (caspasa 3) y su papel en la muerte celular por apoptosis. Existen dos vías por las cuales una célula muere por apoptosis, la vía extrínseca y la vía intrínseca. La vía extrínseca está asociada a la unión ligando-receptor, la cual favorece una serie de eventos moleculares que promueven la expresión y activación de la proteína caspasa 3 y culmina en la muerte por apoptosis, mientras que la intrínseca o mitocondrial está asociada al daño de las membranas mitocondriales y al desequilibrio metabólico, el cual induce la liberación del citocromo C, la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa 3. Cabe destacar que la presencia de Bcl-2 preserva la integridad de la membrana externa mitocondrial, evita la salida de citocromo C y la activación de factores pro-apoptóticos como caspasas. Por lo tanto, el incremento en la expresión de Bcl2 favorece la supervivencia celular. El factor de supervivencia Brn-3a inhibe la

activación de caspasa 3 por lo tanto evita la muerte celular por apoptosis (Bernhardi, 2004; Vila y Przedborski, 2003; Thomas *et al.*, 2017; *modificado*).

Otra forma de evaluar la viabilidad de la vía visual es mediante la preservación de la estructura del nervio óptico y la mielina. La lesión por compresión en el nervio óptico interrumpe el flujo axonal de factores neurotróficos de los núcleos cerebrales hacia el soma de las CGR y en sentido opuesto (Almasieh *et al.*, 2012; Von-Bartheld, 1998). Este bloqueo, y la disfunción de los oligodendrocitos alrededor de la lesión, inician la degeneración retrógrada y anterógrada. La degeneración es un proceso estereotípico que avanza simultáneamente, como se menciona previamente (Delfino *et al.*, 2011; Guimões, 2009; Horner, 2000). Siete días después de la lesión, mientras aún continúan viables algunas CGR en la retina, los axones en el sitio del daño sufren la máxima desmielinización asociada a la presencia de linfocitos T y B autorreactivos y a los leucocitos efectores de la inmunidad innata (Anderson *et al.*, 2014).

Varias enfermedades pueden interrumpir el procesamiento de la información visual y conducir a ceguera. Entre estas patologías se encuentran el glaucoma (principal causa de pérdida de visión asociada con muerte de las CGR), la retinitis y la uveítis, la degeneración macular relacionada a la edad, la neuropatía óptica traumática y otros traumatismos, así como procesos secundarios asociados a enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, esclerosis múltiple y lateral amiotrófica (London *et al.*, 2012). En este contexto, el empleo del nervio óptico como modelo de estudio reviste particular importancia, debido a que además de representar las características del resto del SNC, cualquier efecto neuroprotector descrito podría evitar la pérdida de la visión asociada a estas patologías.

3. Inmunomodulación como estrategia neuroprotectora

El término neuroprotección se refiere al uso de cualquier estrategia terapéutica capaz de prevenir, retrasar o detener la muerte celular secundaria al trauma o a enfermedades crónicas y degenerativas en el SNC (Estrada-Rojo *et al.*, 2012). En párrafos anteriores se ha destacado que la lesión traumática activa

procesos degenerativos complejos y una respuesta inflamatoria capaz de extender el daño hacia células vecinas sanas. Sin embargo, es conveniente señalar que la inflamación después de un trauma es un proceso homeostático que puede defender al organismo del ataque de patógenos e iniciar la producción de factores que contribuyen a reparar el tejido lesionado (Gurtner *et al.*, 2008). Así, la manipulación de la respuesta inmunológica, particularmente la de tipo efector Th1 y la humoral mediada por anticuerpos, se ha utilizado como estrategia neuroprotectora en distintos modelos experimentales de lesiones traumáticas y enfermedades de tipo neurodegenerativo. A continuación, se presentan las dos principales estrategias de inmunomodulación descritas hasta el momento (autoinmunidad protectora y tolerancia inmunológica):

3.1. Autoinmunidad protectora

El término autoinmunidad protectora se refiere al efecto benéfico de la activación de la respuesta autoinmune desencadenada por el reconocimiento antigénico en el sitio de la lesión (Schwartz *et al.*, 1999). Existe evidencia que muestra que la activación de las células Th1 específicas de AgN favorece procesos de remoción de restos celulares potencialmente dañinos para la supervivencia neuronal después de una lesión del nervio óptico. Como consecuencia, esta limpieza del sitio del daño puede inhibir la progresión de la degeneración secundaria (Ellezam, 2003; Fisher *et al.*, 2001; Kipnis *et al.*, 2000; Kipnis *et al.*, 2002). Por otro lado, un efecto promotor de la remielinización y la supervivencia neuronal ha sido relacionado con un incremento en los niveles de anticuerpos naturales tipo IgM e IgG (Warrington *et al.*, 2001).

Sin embargo, de acuerdo con esta propuesta, la autoinmunidad en el SNC está limitada por diferentes mecanismos intrínsecos al tejido reclutamiento de linfocitos Th2 y Tregs, por lo que es necesario exacerbarla mediante el empleo de vacunas o inmunizaciones (Siegrist, 2013).

3.1.1. Inducción de autoinmunidad protectora y mecanismo de acción

La inmunización es el proceso mediante el cual un organismo es expuesto de manera deliberada a antígenos o patógenos con el fin de estimular la respuesta

inmunológica específica de antígeno y generar una activación más rápida y eficiente ante una segunda exposición. Una vez que el organismo es inmunizado, los antígenos son capturados por células dendríticas presentadoras de antígeno. Posteriormente, dichas células abandonan el sitio de la inmunización para migrar a órganos linfáticos y así presentar los antígenos a los linfocitos T. Por medio de este mecanismo los linfocitos T específicos se activan, expanden sus clonas y se diferencian a un fenotipo Th1 caracterizado por la producción de citocinas como IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e IL-23, capaces de reclutar a otras células efectoras (Rodríguez, 2007). Por su parte, los linfocitos B también reconocen a los antígenos, proceso que conduce a la expansión de las clonas y a la producción de anticuerpos específicos, para así colaborar en la eliminación de los antígenos en el sitio del daño (figura 5).

Los linfocitos T y B de memoria son la progenie de células naïve específicas de antígeno que se han expandido clonalmente en el curso de una respuesta inmunológica y sobreviven una vez que se ha eliminado el antígeno. Las células de memoria confieren protección inmediata y generan respuestas secundarias que son más rápidas y de mayor magnitud en comparación con las respuestas primarias. En el sistema de linfocitos B, la protección inmediata está mediada por células plasmáticas de vida larga que están presentes en la médula ósea y secretan anticuerpos de una manera independiente del antígeno, manteniendo así niveles constantes en suero y fluidos corporales (Sallusto *et al.*, 2004). La memoria inmunológica en respuesta a la estimulación antigénica conduce a la rápida diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas y a una elevación marcada pero transitoria en los anticuerpos séricos. Una respuesta semejante se observa en los linfocitos T, los cuales mantienen poblaciones de células de memoria en circulación o residentes en el tejido que están en busca de patógenos y muestran la función efectora inmediata tras el reconocimiento del antígeno (Murphy y Weaver, 2009).

Existen muchas vías de presentación antigénica para exacerbar la respuesta inmunológica con antígenos exógenos (p. ej., ovoalbúmina o albúmina de suero bovina, BSA), pero la forma más eficiente es la administración

subcutánea (Murphy y Weaver, 2009; Waren, 2000). Algunos estudios han estimulado la autoinmunidad protectora mediante esta vía utilizando diversos auto-antígenos en modelos animales (Fisher *et al.*, 2001, Bakalash *et al.*, 2003). Sin embargo, en pocos estudios se ha caracterizado la autorreactividad mediada por linfocitos Th1 (Moalem *et al.*, 1999) y en menos estudios la autorreactividad humoral desencadenada por linfocitos B (Kerschensteiner *et al.*, 1999). Recientemente, algunos trabajos han evidenciado la dificultad para desarrollar una enfermedad autoinmune mediante la exposición a antígenos propios, demostrando que existe un control activo y riguroso que evita la pérdida de la tolerancia para auto-antígenos (Saupe *et al.*, 2015; Ono *et al.*, 2017; Ferry *et al.*, 2003; Mor y Cohen, 2005). Uno de los trabajos más interesantes muestra que los auto-antígenos liberados por células apoptóticas pancreáticas no induce diabetes autoinmune aún en presencia de citocinas pro-inflamatorias (Ono *et al.*, 2017). Varios estudios sugieren que la pérdida de la tolerancia a antígenos es evitada mediante el secuestro de los anticuerpos en regiones como el propio SNC (Gunasekaran *et al.*, 2018; Imperato, 2019).

3.1.2. Autoinmunidad protectora en lesiones del nervio óptico y la médula espinal

Estudios previos han demostrado que la inmunización activa a través de la proteína básica de mielina y la inmunización pasiva con el copolímero 1 (COP-1) tienen un efecto neuroprotector en un modelo de lesión traumática de médula espinal (Hauben *et al.*, 2000; Kipnis *et al.*, 2000). Adicionalmente, también se ha demostrado que la inmunización activa con péptidos derivados de mielina como la proteína proteolipídica (PLP), la glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG) o el homogenado retiniano tiene un efecto neuroprotector sobre la supervivencia de las CGR después de una lesión por compresión del nervio óptico (Bakalash *et al.*, 2003; Fisher *et al.*, 2001). Por su parte Ellezam *et al.* (2003) demuestran que la inmunización subcutánea con homogenado total de médula espinal estimula la regeneración de los axones después de una lesión por compresión del nervio óptico, pero falla para promover la supervivencia de las

CGR. Además del número de neuronas viables, algunos de estos trabajos han evaluado también la expresión de factores neurotróficos como BDNF y NT-3, demostrando que éstos se regulan a la alza como resultado de la exacerbación inmunológica (Barouch y Schwartz, 2002; Ono *et al.*, 2017).

Es importante destacar que, si bien la autoinmunidad protectora es una estrategia terapéutica capaz de proteger el tejido nervioso después de una lesión traumática o de tipo neurodegenerativo en modelos animales, también puede desencadenar una enfermedad autoinmune y encefalitis (Fisher *et al.*, 2001).

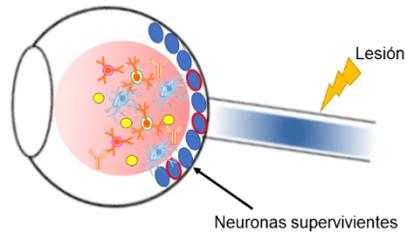
3.2. Tolerancia inmunológica

Para que la inflamación favorezca los eventos reparativos después de un trauma en cualquier órgano, debe ser de inicio agudo, de alta intensidad y de rápida resolución (Eming *et al.*, 2009; Reinke y Sorg 2012). Como se menciona previamente, el SNC como tejido inmuno-privilegiado posee un ambiente inmunosupresor capaz de limitar el inicio y la intensidad de la respuesta inflamatoria después de un daño (Galea, 2006). Este hecho, sumado a la continua exposición de restos celulares y al reclutamiento (limitado pero constante) de las diversas poblaciones de leucocitos al sitio del daño, mantiene la respuesta inflamatoria local y evita su resolución, con la consecuente extensión de la lesión y pérdida del potencial reparador (Laspas *et al.*, 2011; Popovich y Jones, 2003). Se ha reportado que después de un trauma al SNC la mayor pérdida neuronal está asociada a los procesos neurodegenerativos (apoptosis) que inician poco tiempo después del daño primario (Springer, 2001). Más aún, varias líneas de evidencia muestran que es precisamente la respuesta inmunológica adaptativa estimulada por la presencia de AgN la que promueve esta pérdida masiva de neuronas (Ankeny *et al.*, 2006; Laspas *et al.*, 2011; Popovich y Jones, 2003). En este contexto, si bien la exacerbación de la autorreactividad a AgN ha mostrado un efecto neuroprotector en diferentes modelos de lesión, existe evidencia que apoya que la atenuación de esta respuesta puede ser un blanco terapéutico más eficiente (Martínez-Alcantar *et al.*, 2019; Pineda-Rodriguez *et al.*, 2017; Yan *et al.*,

2016) y definitivamente más seguro (Pelayo-Gómez *et al.*, *en revisión*) para favorecer la supervivencia neuronal después de un daño (figura 5).

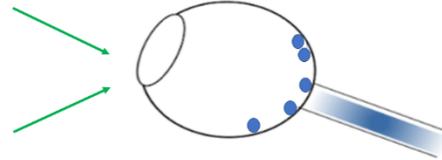
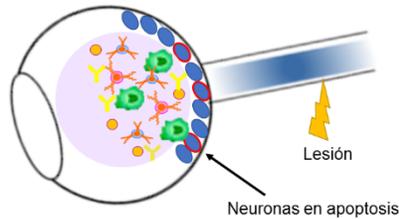
Una forma de evitar la autorreactividad de los linfocitos T y la inflamación crónica es mediante la inducción de tolerancia inmunológica. La tolerancia por definición, es una serie compleja de mecanismos que atenúan la respuesta inmunológica específica de antígeno. La tolerancia inmunológica es adquirida de forma natural a los componentes de nuestro organismo desde etapas tempranas de la ontogenia, sobre todo a aquellos componentes con los que el sistema inmunológico mantiene un contacto más frecuente (p. ej., componentes extracelulares) (Murphy y Weaver, 2009). Sin embargo, puede ser perdida después de un trauma, infección o enfermedades degenerativas que cursen con procesos inflamatorios crónicos (De Groot *et al.*, 2006). La tolerancia inmunológica puede ser experimentalmente inducida por la administración de antígenos exógenos o bien restablecida a auto-antígenos (Farooq y Ashour, 2013). Aunque existen varias vías de presentación antigénica capaces de inducir tolerancia, DIACA es la forma más completa y permanente (Waldmann, 2014; Pelayo-Gómez *et al.*, *en revisión*).

A. Autoinmunidad protectora



NEUROPROTECCIÓN

B. Tolerancia inmunológica



Microambiente	Microglia	Linfocitos	Citocinas y anticuerpos
 Pro-inflamatorio	 Reactiva (M1)	 Efectores	 Pro-inflamatorias y fijadores del complemento
 Anti-inflamatorio	 Reguladora (M2)	 Reguladores	 Anti-inflamatorias y no fijadores del complemento

Figura 5 Representación esquemática de los mecanismos de acción de las dos estrategias neuroprotectoras (autoinmunidad protectora y tolerancia inmunológica). Cada uno de los mecanismos muestra el microambiente, el tipo celular y las biomoléculas presentes en cada proceso.

3.2.1. Inducción de tolerancia inmunológica y mecanismo de acción

La DIACA es una forma de tolerancia sistémica caracterizada por la supresión específica de antígeno de la respuesta Th1 (hipersensibilidad de tipo retardada, DTH por sus siglas en inglés). Esta tolerancia es generada por dos poblaciones de Tregs: CD4+ y CD8+ (Lei *et al.*, 2008). La DIACA involucra tres fases diferenciales y secuenciales en el ojo, el timo y el bazo. Dentro del ojo, el antígeno es capturado por macrófagos residentes F4/80+, los cuales actúan como células presentadoras de antígeno que migran hasta el timo, donde inducen la proliferación de células T NK1.1+ CD4- CD8-, las cuales a su vez migran al bazo. Es importante destacar que algunos macrófagos viajan directamente del ojo al bazo sin pasar por el timo. Una vez que los macrófagos han llegado al bazo

secretan el MIP-2, un factor quimioatrayente de células NKT CD4+ residentes. Las células NKT interactúan con macrófagos provenientes del ojo y secretan la quimiocina RANTES, la cual recluta otras células en la zona marginal del bazo. En esta región los macrófagos F4/80+, las células NKT, las B, las Th y el microambiente inmunosupresor rico en TGF- β e IL-10, colaboran para generar las Tregs. Las Tregs CD8+ son las células efectoras que inhiben la inflamación mediada por las respuestas Th1 y la producción de anticuerpos fijadores del complemento como se muestra en la figura 6 (Kyle, 2002; Niederkorn, 2006; Streilein, 1990).

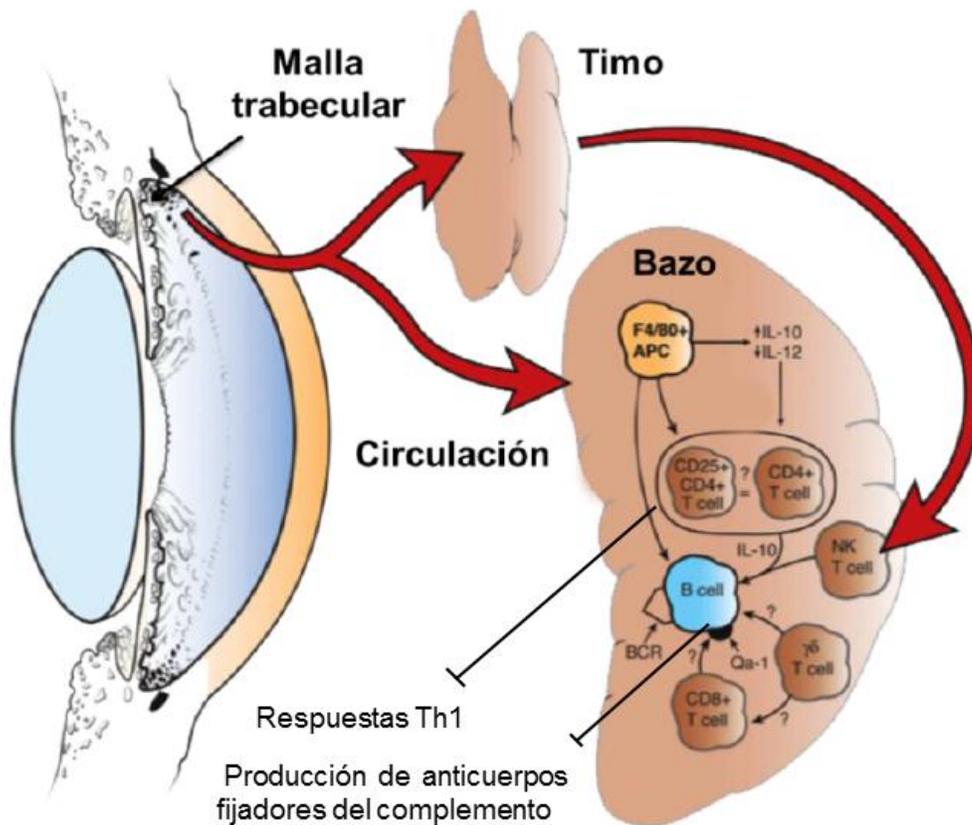


Figura 6. Representación esquemática del mecanismo de acción de la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo (DIACA) inducida experimentalmente. **Fase ocular:** Después de que los antígenos son inoculados en la cámara anterior del ojo son reconocidos y capturados por células presentadoras de antígenos (CPA F4/80+), las cuales viajan por 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 viajan

del timo al bazo. **Fase esplénica:** La zona marginal del bazo es donde se lleva a cabo la presentación antigénica por medio de una interacción inmunológica entre las CPA F4/80+ y los linfocitos T CD4+, T CD8+, B, NKT y $\gamma\delta$, en un microambiente regulador generado por la secreción de mediadores anti-inflamatorios (*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, los linfocitos T reguladores (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; por otra parte DIACA también inhibe la producción de anticuerpos fijadores del complemento (Nieder Korn, 2012; *modificado*).

3.2.2. Tolerancia inmunológica en lesiones del nervio óptico y médula espinal

Recientemente el potencial neuroprotector de la DIACA con AgN se ha evaluado en la lesión traumática de la médula espinal (Pineda-Rodríguez *et al.*, 2017) y en la lesión por compresión del nervio óptico (Martínez-Alcantar *et al.*, 2019). Ambos trabajos han reportado un efecto protector de la DIACA con AgN sobre las neuronas motoras y las CGR, respectivamente, así como un incremento en la expresión de citocinas anti-inflamatorias (*i.e.*, TGF- β , IL-4 e IL-10) en la médula espinal y en la retina en etapas tempranas (2 y 7 dpl; retina) y en etapas posteriores (15 dpl; médula espinal) (figura 5).

Muy probablemente la atenuación de la inflamación inducida por DIACA al día 7 postlesión está mediada por el reclutamiento de Tregs y macrófagos tipo M2 a la retina, en tanto DIACA incrementa la expresión del marcador de Tregs Foxp3 y del marcador de macrófagos M2 arginasa 1. Otra posibilidad es que DIACA incremente las poblaciones de linfocitos Th2. Esta posibilidad es apoyada por los altos niveles de IL-4 inducidos por DIACA en la retina después de la lesión. Por su parte, el efecto neuroprotector de la DIACA puede ser explicado mediante el incremento en la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la neutrotrofina 4 (Martínez-Alcantar *et al.*, 2019).

De manera interesante, aún cuando el perfil inducido en la retina por DIACA con AgN es predominantemente anti-inflamatorio, la expresión de algunos mediadores pro-inflamatorios también es incrementada moderadamente (IL- β e iNOS; Martínez-Alcantar *et al.*, 2019). Un caso especial es el de IL-6, cuya

expresión se incrementa muy marcadamente en ratas inoculadas en la cámara anterior con AgN (Martínez-Alcantar *et al.*, 2019). Si bien IL-6 es una citocina característica de linfocitos Th1, en el SNC su incremento después de una lesión está asociado tanto a efectos neurodegenerativos, pro-inflamatorios (Fisher *et al.*, 2001; Rothaug y Rose-Jone, 2016) como neuroprotectores (Sánchez *et al.*, 2003) y anti-inflamatorios (Erta *et al.*, 2012). Este papel dual de IL-6 en la patología del SNC ha llevado incluso a considerarla como una citocina característica de linfocitos Th2 (Diehl y Rincón, 2002).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dos de las principales alternativas terapéuticas que se han desarrollado hasta el momento en lesiones traumáticas del SNC mejoran la supervivencia neuronal usando estrategias inmunomoduladoras opuestas (autoinmunidad vs. tolerancia). Hasta el momento ningún trabajo ha evaluado el potencial de ambas estrategias usando los mismos antígenos, el mismo modelo animal ni los mismos periodos de evaluación postlesión. Así, en un intento por entender los mecanismos que subyacen al efecto observado estimulando respuestas inmunológicas opuestas, el presente proyecto tiene como objetivo principal comparar el potencial neuroprotector de ambas estrategias inmunomoduladoras en un modelo de lesión por compresión del nervio óptico. Debido a que la tolerancia induce un perfil predominantemente anti-inflamatorio en la retina desde etapas tempranas de la lesión, se espera que este perfil se mantenga en etapas posteriores y promueva la expresión de factores de supervivencia en mayor medida que aquéllos inducidos por la autoinmunidad. Así mismo, se espera que la inducción de inmuno-tolerancia preserve mejor la estructura tisular y la mielina en el sitio de lesión. Los resultados del presente estudio contribuirán a esclarecer los mecanismos mediante los cuales ambas estrategias promueven la neuroprotección y permitirán avanzar en el desarrollo de alternativas preventivas para evitar la degeneración secundaria a lesiones traumáticas.

IV. HIPÓTESIS

La tolerancia a antígenos neurales es una estrategia neuroprotectora más eficiente que la autoinmunidad en ratas con lesión del nervio óptico, debido a que induce un perfil anti-inflamatorio, incrementa la expresión de factores de supervivencia en la retina y preserva la mielina en el sitio de lesión.

V. OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto neuroprotector de dos estrategias inmunomoduladoras (tolerancia inmunológica vs. autoinmunidad protectora) en ratas con lesión de nervio óptico.

PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de la tolerancia inmunológica y la autoinmunidad a antígenos neurales sobre la expresión de citocinas anti-inflamatorias y pro-inflamatorias en la retina de ratas con lesión del nervio óptico.
2. Evaluar el efecto de la tolerancia inmunológica y la autoinmunidad a antígenos neurales sobre la expresión de factores de supervivencia y muerte en la retina de ratas con lesión del nervio óptico.
3. Evaluar el efecto de la tolerancia inmunológica y la autoinmunidad a antígenos neurales sobre la preservación de la mielina en el nervio óptico de ratas con lesión.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Se usaron ratas hembra juveniles y adultas (4-15 semanas de edad) de la cepa *Wistar*. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones *ad libitum* de agua y alimento, y bajo un ciclo de 12 h luz -12 h oscuridad. La manipulación y el cuidado de los animales fueron realizados por el personal especializado del bioterio del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL. N° de oficio: INV/B/RGC/184/17).

2. Diseño experimental

Para cumplir con los objetivos de este trabajo se emplearon 98 ratas, de las cuales 5 fueron utilizadas para la extracción de AgN y el resto seleccionadas de forma aleatoria para formar cuatro condiciones experimentales: 1) inoculación de PBS (n=23) o AgN (n=24) en la cámara anterior del ojo; 2) inducción de autoinmunidad mediante la inoculación subcutánea de PBS (n=16), AgN (n=16) o BSA (n=4) en flancos; 3) control lesión del nervio óptico (n=6), 4) control sham (n=4). La figura 7 muestra el diseño experimental empleado en este trabajo.

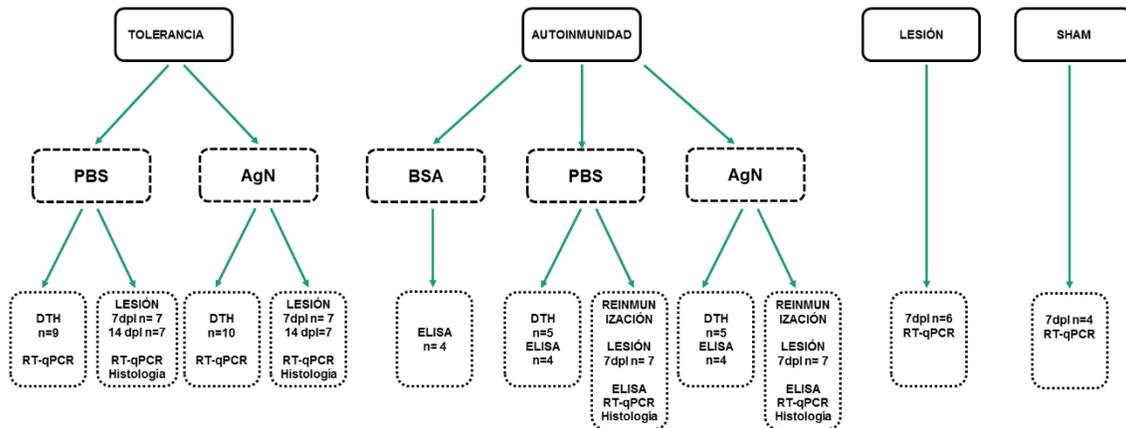


Figura 7. Representación del diseño experimental y la distribución de grupos.

3. Extracción y cuantificación de antígenos neurales

Se sacrificaron ratas adultas sanas (peso \geq 300 g) con sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg de peso). Posteriormente se extrajo la médula espinal y el tejido se lavó con solución salina (0.9%). Una vez libre de impurezas el tejido se congeló con nitrógeno líquido y posteriormente se pulverizó en un mortero. El polvo obtenido se resuspendió en 300 μ l de buffer de extracción (10 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.1 % Triton X-100, 1% β -mercaptoetanol). El homogenado obtenido fue sonificado durante 5 min y centrifugado a 19,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, las muestras se dejaron reposar durante 30 minutos a 4°C (Gil-Dones *et al.*, 2009). La concentración de proteína se determinó usando un ensayo basado en los métodos de Bradford y Lowry de Bio-Rad® (Ríos, 2005; Martínez-Alcantar *et al.*, 2019).

4. Inducción de tolerancia inmunológica a través de desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del ojo (DIACA)

Para la inducción de DIACA se utilizaron ratas de 30 días de nacidas, las cuales fueron pesadas y anestesiadas profundamente con una mezcla de ketamina/xilazina (75 μ g/kg y 8 μ g/kg de peso corporal, respectivamente) e inoculadas en la cámara anterior de ambos ojos con AgN en un volumen de 10 μ L (6 μ g/ μ L). Como control se inoculó un grupo de ratas en ambos ojos con 10 μ L de vehículo (PBS). La inyección en la cámara anterior del ojo se realizó bajo microscopio estereoscópico mediante el uso de una jeringa Hamilton® y el volumen fue liberado manualmente con una velocidad aproximada de 1 μ L/seg. Durante toda la manipulación los ojos de las ratas fueron protegidos de la desecación con solución salina 0.9% (Farooq *et al.*, 2013).

La inducción de DIACA se evaluó mediante la prueba DTH en un subgrupo de ratas inoculadas con PBS o AgN. Esta prueba se realizó mediante una inyección vía intradérmica (250 μ g/20 μ l; emulsificado 1:1 con adyuvante completo de Freund, CFA) en la región interescapular. Catorce días después de la inoculación en la cámara anterior los animales se inyectaron en el pabellón de la oreja izquierda con AgN (500 μ g/10 μ l), mientras que la oreja derecha se inyectó con PBS. El grosor de ambas orejas fue medido antes de realizar las inyecciones

para establecer la línea base (medida a las 0 horas), así como a las 24 y 48 horas después del reto. Se calculó la diferencia de inflamación (Δ) restando el valor de línea base de los valores de 24 y 48 horas por oreja (Farooq y Ashour, 2013). Para garantizar la inducción de DIACA, las ratas fueron sacrificadas durante la máxima respuesta inflamatoria y el bazo fue disecado para cuantificar la expresión del factor de transcripción forkhead box P3 (Foxp3), marcador de Tregs mediante RT-qPCR (esta técnica se describirá posteriormente).

5. Inducción de autoinmunidad

Para esta fase del experimento, se inyectaron subcutáneamente (en los 4 flancos torácicos) 300 μ l de AgN (1 μ g/ μ l) o de PBS emulsificados 1:1 en CFA en ratas adultas. La inducción de autoinmunidad se evaluó mediante la prueba DTH como se describe previamente, y se corroboró mediante ensayos de inmunoabsorbencia ligada a enzimas (ELISA) para cuantificar los niveles de IgGs en suero. Para ello, antes de la inoculación y catorce días después, 1 ml de sangre de la vena cava craneal fueron obtenidos bajo anestesia por rata. Las muestras fueron centrifugadas durante 3 minutos a 3000 rpm a temperatura ambiente para obtener suero, el cual fue almacenado a -70°C hasta su posterior procesamiento. El primer día del ELISA se realizó el forrado de la placa con 1 μ l de suero en solución amortiguadora de carbonatos (0.1M, pH 9.6) a 4°C durante 12 h. Posteriormente se realizó el bloqueo de marcas inespecíficas mediante la incubación con 100 μ l de BSA al 0.1% en PBS Tween 0.05%, durante 2 h a temperatura ambiente y entonces se incubó con el anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a HRP (1:1000 en PBS Tween 0.05%), durante 2 h a temperatura ambiente. La reacción se reveló con 100 μ l del sustrato de peroxidasas 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) de amonio (ABTS. 9.1 mM, pH 5.0) y las lecturas se realizaron a 415 nm. Se utilizaron IgGs recombinantes de humano como curva de calibración estándar de 0 a 500 ng/ μ l.

Como control, dos grupos adicionales de ratas fueron inoculadas en los flancos con PBS o BSA y el suero de cada animal fue obtenido 14 días después de la inoculación, empleado para forrar la placa y para cuantificar la concentración de IgGs como se refiere previamente.

Otros dos grupos de ratas fueron inoculados en los flancos con PBS o AgN y re-inmunizados 45 días más tarde mediante una inyección vía intradérmica de los mismos componentes (250 µg/20 µl de AgN o 20 µl de PBS; emulsificados 1:1 con adyuvante completo de Freund) en la región interescapular. Catorce días más tarde todos los animales fueron sometidos a lesión del nervio óptico como se describe en la siguiente sección. El suero de estos animales fue colectado previo a la lesión y siete días post-lesión, y empleado para cuantificar la concentración de IgGs mediante ELISA.

6. Lesión por compresión del nervio óptico

Para realizar este procedimiento, al alcanzar los 250 g de masa corporal, las ratas fueron profundamente anestesiadas con ketamina/xilazina (75 µg/kg y 8 µg/kg de peso corporal) y posteriormente sometidas a una cantotomía lateral del ojo izquierdo para exponer el nervio óptico, el cual fue comprimido durante 5 segundos con pinzas de auto-cierre a una distancia de 1 a 3 mm del ojo (Walsh, 2014). Una vez terminada la cirugía, los ojos de las ratas fueron protegidos con lubricante y antibiótico, y durante los 3 días siguientes recibieron analgésico oral paracetamol (20 mg/kg de peso corporal). Adicionalmente, se trabajó con un grupo sham, el cual fue sometido a los mismos procedimientos que el resto de los grupos hasta la exposición del nervio óptico pero éste no fue lesionado. A menos que se indique lo contrario, los grupos utilizados para la evaluar la inducción de las estrategias inmunomoduladoras fueron independientes de los lesionados.

7. Obtención y preservación del tejido

A los 7 o 14 días después de la lesión del nervio óptico los animales recibieron una dosis terminal de pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso) y se enuclearon los ojos para obtener la retina, la cual se almacenó con agua libre de RNAsas a -70°C para su posterior empleo en la técnica de RT-qPCR. Adicionalmente, el nervio óptico fue disecado y fijado por inmersión en paraformaldehído al 4% en PBS (0.1 M) durante 24 horas a 4°C y crioprotegido en sacarosa al 30% a 4°C hasta su posterior empleo.

8. Técnicas histológicas

Con la finalidad de evaluar la homogeneidad de la lesión se realizaron cortes de nervio óptico de 10 μm en criostato. Los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados y teñidos con hematoxilina/eosina (Goto, 1987; Protocolo modificado). Esta técnica permite observar la morfología del tejido lesionado, mediante la tinción de los núcleos (color azul) y el citoplasma (color rosa). Cortes adyacentes fueron teñidos con luxol fast blue para evaluar la preservación de la mielina, para lo cual fueron incubados en el colorante durante 12 h a 60°C y se realizó un aclaramiento con carbonato de litio (Li_2CO_3 0.03%) durante 1 h (Goto, 1987; Protocolo modificado). Los tejidos teñidos fueron protegidos con cubreobjetos y resina epóxica y fotografiados en un microscopio leica DM3000® usando el programa Leica Application Suite®.

9. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)

Se extrajo el RNA de la retina y el bazo con TRizol®™ (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Posteriormente se corroboró la pureza e integridad del RNA en NanoDrop Lite® (ThermoScientific). Por último, se sintetizó el cDNA mediante el kit Bio-rad iScript Advanced cDNA Synthesis Kit® for RT-qPCR según las especificaciones del fabricante. La cuantificación de la expresión se hizo mediante el kit Bio-rad SsoAdvanced®™ Universal SYBR® Green Supermix en el termociclador CFX96 Real-Time System, según el protocolo del fabricante. Para calcular la expresión relativa de los genes de interés se utilizó la fórmula $\Delta\Delta\text{C}_q$ (Haimes, 2013), y se utilizó como gen de referencia GAPDH (los oligonucleótidos empleados para la amplificación de este gen fueron amablemente obsequiados por la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa). Las secuencias de todos los oligonucleótidos empleados, y las temperaturas de fusión se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la cuantificación de la expresión mediante qPCR.

Gen	Secuencia	Tm
GAPDH	Forward: 5'-CACGGCAAGTTCAACGGCACAGT-3' Reverse: 5'-TCAGCGGAAGGGGCGGAGAT-3'	60°C
IL-4 ¹	Forward: -5'-ACCTTGCTGTCACCCTGTTC-3' Reverse: -5'-TTGTGAGCGTGGACTCATTC-3'	60°C
IL-6 ²	Forward: 5'-AGCCACTGCCTTCCCTACTTCA-3' Reverse: 5'-GCCATTGCACAACCTCTTTTCTCA-3'	59°C
IFN-γ ³	Forward: 5'-AGGCCATCAGCAACAACATAAGTG-3' Reverse: 5'-GACAGCLTTGTGCTGGATCLGTG-3'	60 °C
TNF-α ²	Forward: 5'-TGGCGTGTTTCATCCGTTCTCTACC-3' Reverse: 5'-CCCGCAATCAGGCCACTACTT-3'	62 °C
Brn3-a ⁴	Forward: 5-CAGGAGTCCCATGTAAGA-3' Reverse: 5'-ACAGGGAAACACTTCTGC-3'	60°C
Bcl-2 ⁵	Forward: 5'-CCTGAGAGCAACCGAACGCCC-3' Reverse: 5'-CCACAAAGGCATCCCAGCCTC-3'	69 °C
Casp-3 ⁶	Forward: 5'-AATTCAAGGGACGGGTCATG-3' Reverse: 5'-TGACACAATACACGGGATCTG-3'	60 °C

¹Bai *et al.*, 2012; ²Roque *et al.*, 2016; ³Ito *et al.*, 2017; ⁴Agudo-Barriuso *et al.*, 2013; ⁵Chaudhary *et al.*, 1999; ⁶Hua *et al.*, 2015

10. Análisis estadístico

Los resultados de las pruebas de DTH, expresión de Foxp3, Brn-3a, Bcl-2 y Casp-3 (PBS vs. AgN) fueron comparados mediante una prueba t de Student para muestras independientes. Los niveles séricos de las IgGs fueron comparados mediante una prueba t de Student para muestras dependientes (grupos pre vs. post-inmunización) y mediante una prueba t de Student para muestras independientes (grupos PBS vs. AgN post-inmunización). La expresión de citocinas fue comparada mediante un ANOVA de una vía. Las comparaciones múltiples entre grupos fueron realizadas con la prueba post-hoc de Tukey. Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico SigmaStat®, y graficados con el programa GraphPad Prism® versión 5.01. El criterio para considerar

significancia fue $p \leq 0.05$. Los resultados de los análisis estadísticos se presentan en las tablas 2-5.

VII. RESULTADOS

1. Inducción de tolerancia inmunológica y autoinmunidad

Se obtuvieron 800 μ l de homogenado de AgN a una concentración de 124 μ g/ μ l. Este homogenado fue empleado para todos los procedimientos experimentales cuyos resultados se describen a continuación.

La inducción de inmunotolerancia a AgN fue evaluada mediante la prueba DTH y la expresión del mRNA del marcador de Tregs Foxp3 en bazo. Los resultados muestran que la inoculación de AgN atenúa la inflamación sistémica y específica de antígeno con respecto al grupo control en la prueba DTH ($U_{(1,17)}=0.0$, $p<0.001$. Figura 8A), e incrementa la expresión del mRNA de Foxp3 ($t_{(1,10)}=-4.955$, $p<0.001$. Figura 8B). En conjunto, estos resultados sugieren que la tolerancia a AgN fue inducida eficientemente mediante DIACA.

Por su parte, la inducción de autoinmunidad protectora se evaluó mediante la prueba de DTH y la cuantificación de los niveles séricos de las IgGs. Los resultados muestran que la inmunización subcutánea de AgN incrementa la respuesta inflamatoria en oreja con respecto a la inyección de PBS por la misma vía ($t_{(1,8)}=-2.71$, $p<0.05$. Figura 9A), pero no incrementa los niveles séricos con respecto al grupo PBS ($t_{(1,6)}=1.18$, $p>0.05$. Figura 9B) ni con respecto a los niveles previos a la inmunización (PBS $t_{(1,6)}=0.87$, $p>0.05$; AgN: $W_{(1,6)}=8.00$, $p>0.05$. Figura 9B). Este efecto es específico para los antígenos derivados de tejido medular, debido a que la proteína BSA inoculada bajo el mismo procedimiento, logra incrementar significativamente los niveles séricos de IgGs en otro grupo de animales tanto en comparación con el grupo control ($t_{(1,6)}=-16.73$, $p<0.001$. Figura 9C) como con respecto a los niveles pre-inmunización (PBS: $t_{(1,6)}=-16.76$, $p<0.001$; BSA: $t_{(1,6)}=-12.25$, $p=0.001$. Figura 9C).

Con el objetivo de garantizar el desarrollo de una respuesta autoinmunitaria más robusta, otro grupo de ratas fueron re-inmunizadas con AgN 45 días después de la primera inmunización y sus niveles séricos cuantificados. Los resultados muestran que la re-inmunización no incrementa los niveles séricos de IgGs con respecto al control ($t_{(1,6)}=1.99$, $p>0.05$; Figura 9D) ni con respecto a los niveles basales (PBS: $t_{(1,6)}=0.62$, $p>0.05$; AgN: $t_{(1,6)}=0.96$, $p>0.05$. Figura 9D). Finalmente,

estos animales fueron sometidos a una lesión por compresión del nervio óptico y siete días después de la lesión fueron sacrificados y se cuantificaron sus niveles séricos de IgGs nuevamente. Los resultados muestran que la lesión incrementa los niveles de IgGs en el suero de los animales inmunizados con AgN en comparación con el grupo control ($t_{(1,6)} = -3.86$, $p < 0.01$. Figura 9E) y con respecto a los niveles basales previos a la inmunización ($t_{(1,6)} = -8.63$, $p < 0.01$. Figura 9E). Por el contrario, el grupo PBS no muestra diferencias entre los valores previos y posteriores a la inmunización ($t_{(1,6)} = 1.00$, $p > 0.05$. Figura 9E). En conjunto, los resultados muestran que la inoculación de AgN en flancos incrementa la respuesta autoinmune celular y humoral únicamente después de dos inmunizaciones y la lesión del nervio óptico.

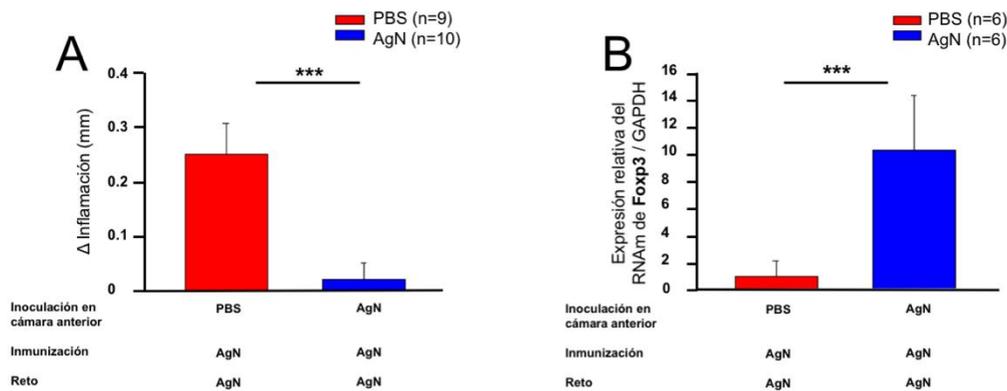


Figura 8. Efecto de la inoculación de antígenos neurales en la cámara anterior. La gráfica A muestra la diferencia (Δ) de inflamación en orejas medida a las 48 horas después del reto en la prueba de hipersensibilidad retrasada. La gráfica B muestra la expresión relativa del mRNA de Foxp3 con respecto al gen constitutivo GAPDH en el bazo a las 48 horas después del reto. Debajo de cada gráfico se presentan los tratamientos a los que fueron sometidos los animales. Las barras representan los promedios \pm el EEM. Los resultados fueron analizados con la prueba estadística *t de Student no pareada*; * $p < 0.05$.

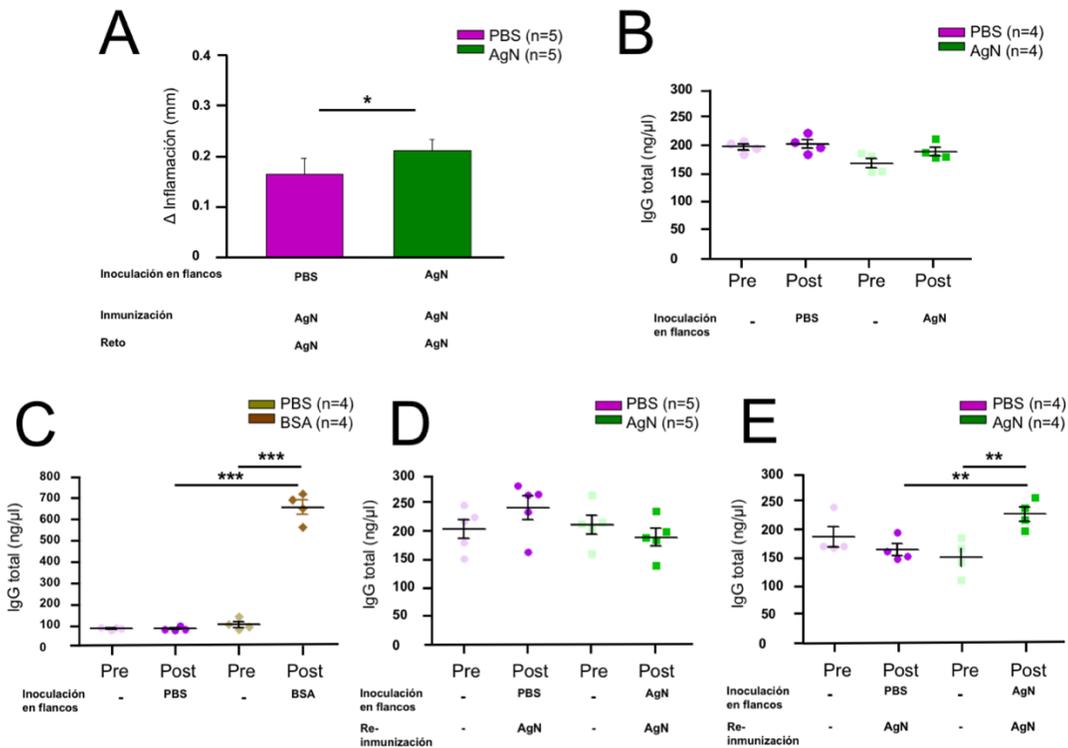


Figura 9. Efecto de la inoculación subcutánea de antígenos neurales en los flancos. La gráfica A muestra la diferencia (Δ) de inflamación en orejas medida a las 48 horas después del reto en la prueba de hipersensibilidad retrasada. Las gráficas B-E muestran la cuantificación de IgGs totales en suero previo y posterior a la inmunización subcutánea. Debajo de cada gráfico se presentan los tratamientos a los que fueron sometidos los animales. Se grafican los promedios \pm el EEM. Las comparaciones entre grupos fueron realizadas mediante la prueba *t de Student no pareada*, y las comparaciones pre y post-inmunización mediante la prueba *t de Student pareada*. * $p < 0.05$.

2. Perfil inflamatorio en la retina a los 7 días postlesión del nervio óptico

La expresión de las citocinas más representativas de la tolerancia inmunológica (IL-4, IL-6) y la autoinmunidad (INF- γ y TNF- α) fue cuantificada a los 7 dpl en la retina en ambos modelos de inmunomodulación y comparada con la expresión presentada por un grupo de ratas lesionado y un grupo sham. Los resultados muestran que la expresión de IL-4 e IL-6 es incrementada considerablemente en el grupo tolerante a AgN con respecto al resto de los grupos

($F_{(5,13)}=10.62$, $p<0.001$ y $F_{(5,12)}=4.87$, $p<0.01$, respectivamente. Figuras 10A y 10B). Por su parte, una diferencia de expresión para $\text{INF-}\gamma$ es también observada ($F_{(5,15)}=3.83$, $p<0.05$, Figura 10C), siendo los grupos inoculados en la CA con PBS e inmunizados con PBS estadísticamente diferentes en la prueba *post-hoc*. Finalmente, la expresión de $\text{TNF-}\alpha$ muestra diferencias significativas entre los grupos ($F_{(5,14)}=22.57$, $p<0.001$, Figura 10D), siendo mayor en los grupos inmunizados con PBS y AgN con respecto al resto de los grupos, sin diferencias entre ellos (Figura 10D).

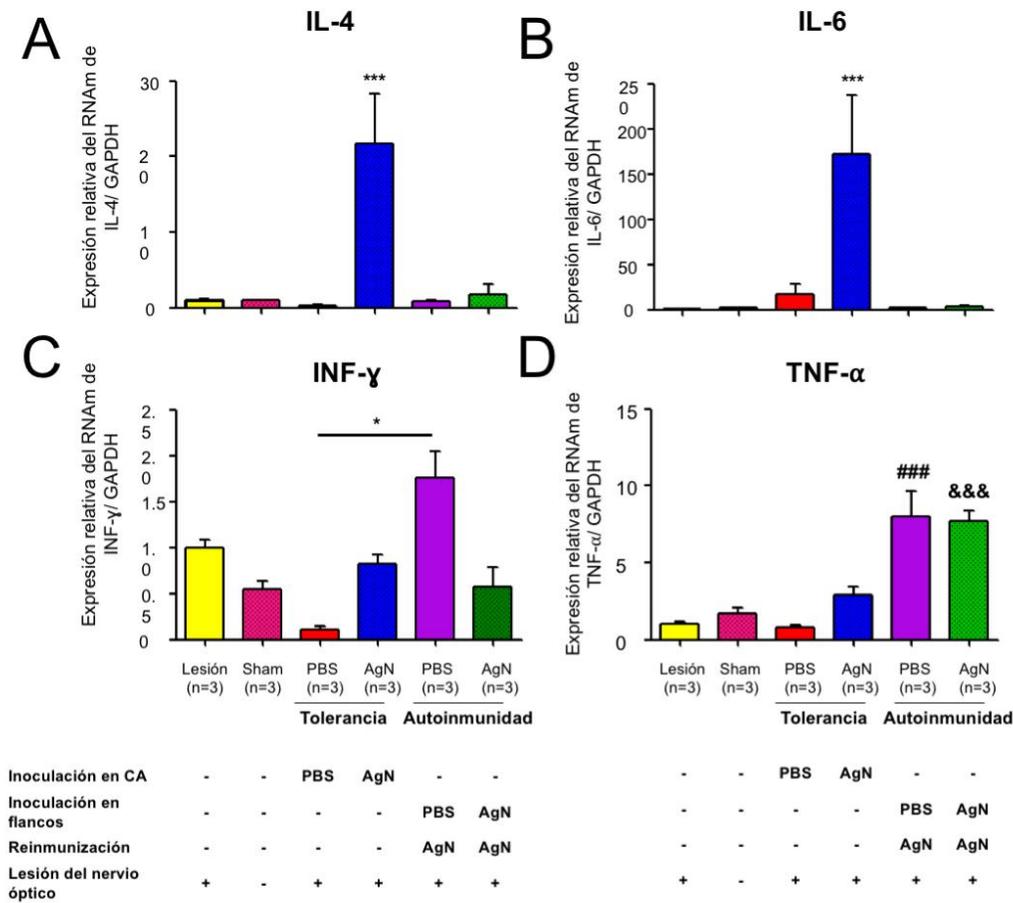


Figura 10. Efecto de la inducción de tolerancia y autoinmunidad sobre la expresión de citocinas en la retina al día 7 post-lesión del nervio óptico. Las gráficas A-D muestran la expresión relativa del mRNA de las citocinas IL-4, IL-6, $\text{INF-}\gamma$ y $\text{TNF-}\alpha$ con respecto al gen constitutivo GAPDH en la retina de ratas sometidas a lesión del nervio óptico y en ratas control. Se utilizó el grupo lesión como referencia para la cuantificación de la expresión. Debajo de los gráficos se presentan los tratamientos a los que fueron sometidos los animales y el número de animales por grupo. Los

resultados son representativos de dos experimentos independientes. Se grafican los promedios \pm el EEM. Las comparaciones fueron realizadas mediante la prueba estadística ANOVA de una vía. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ AgN tolerancia vs. todos los grupos. ### $p < 0.001$ PBS autoinmunidad vs. lesión, sham, PBS y AgN tolerancia, &&& $p < 0.001$ AgN autoinmunidad vs. lesión, sham, PBS y AgN tolerancia.

3. Expresión de factores de supervivencia y muerte en la retina a los 7 días post-lesión del nervio óptico

La expresión del factor de supervivencia específico para neuronas ganglionares, Brn-3a, fue evaluada en los mismos grupos en los que se evaluó la expresión de citocinas. El análisis estadístico muestra que la expresión de Brn-3a es significativamente mayor en el grupo sham con respecto al resto de los grupos ($F_{(5,14)}=7.86$ $p \leq 0.001$), los cuales no presentan diferencias entre sí, (resultados no mostrados). Este análisis también muestra que el grupo inoculado en la cámara anterior del ojo y lesionado presenta la expresión más baja de Brn-3a en comparación con el resto de los grupos (Resultados no mostrados). Estos resultados, en conjunto con evidencia previa que muestra que la inoculación en la cámara anterior del ojo causa una muerte neuronal más severa que la inducida solo por la lesión del nervio óptico (Martínez-Alcantar et al., 2019), condujo a realizar comparaciones por separado de los grupos tolerancia y autoinmunidad con sus respectivos controles inoculados con PBS. Los resultados muestran que la inoculación de AgN en la cámara anterior del ojo incrementa la expresión de Brn-3a en la retina al día 7 post-lesión, en comparación con el grupo inoculado con vehículo ($t_{(1,5)}=7.36$, $p \leq 0.001$. Figura 11A), mientras los grupos inmunizados no presentan diferencias en la expresión de este factor de transcripción ($t_{(1,5)}=0.32$, $p > 0.05$. Figura 11A). Con respecto al marcador anti-apoptótico Bcl-2, los análisis muestran que la inmunotolerancia a AgN no incrementa su expresión ($t_{(1,4)}=-1.13$, $p > 0.05$. Figura 11B) mientras la autoinmunidad si lo hace ($t_{(1,5)}=2.77$, $p < 0.05$; Figura 11B). Por su parte, la inmunotolerancia disminuye la expresión de Casp-3 ($t_{(1,4)}=35.51$, $p=0.001$, Figura 11C) y la autoinmunidad la incrementa ($t_{(1,4)}= 2.99$, $p < 0.05$ Figura 11C).

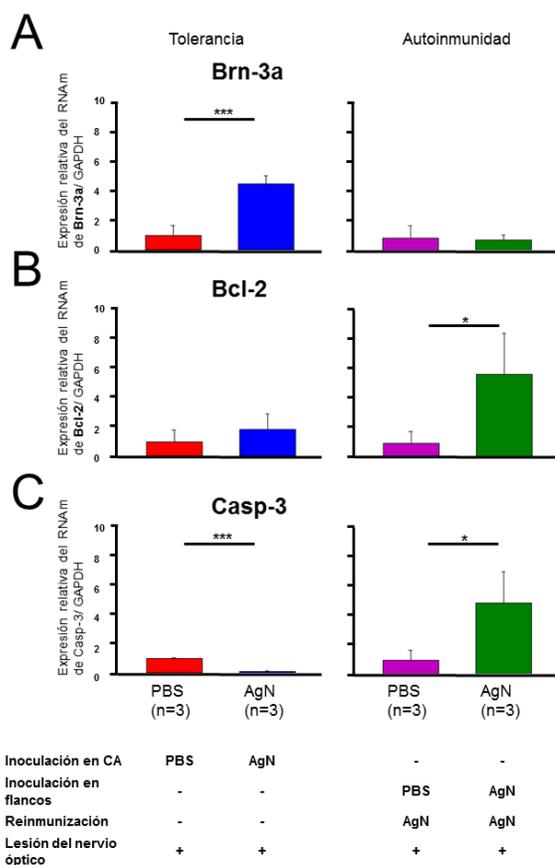


Figura 11. Efecto de la inducción de tolerancia y autoinmunidad sobre la expresión de factores supervivencia y muerte al día 7 post-lesión del nervio óptico. Las gráficas A-C muestran la expresión relativa del mRNA de Brn-3a, Bcl-2 y Casp-3 con respecto al gen constitutivo GAPDH en la retina de ratas sometidas a lesión del nervio óptico. Debajo de los gráficos se presentan los tratamientos a los que fueron sometidos los animales y el número de animales por grupo. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes. Las barras representan los promedios \pm el EEM. Las comparaciones entre grupos fueron realizadas mediante la prueba *t de Student no pareada*. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

4. Preservación de la mielina en el sitio de lesión

La estructura tisular y la preservación de la mielina fueron evaluadas en el nervio óptico tanto en el epicentro de la lesión como en una región contigua distal a la copa óptica. Los resultados muestran que en el epicentro de la lesión todos los grupos presentan desarreglos en la estructura tisular. Sin embargo, el grupo inoculado en la cámara anterior con AgN presenta una estructura tisular mejor

preservada que el resto de los grupos tanto en el epicentro de la lesión (Figura 12A) como en la región contigua (Figura 12B).

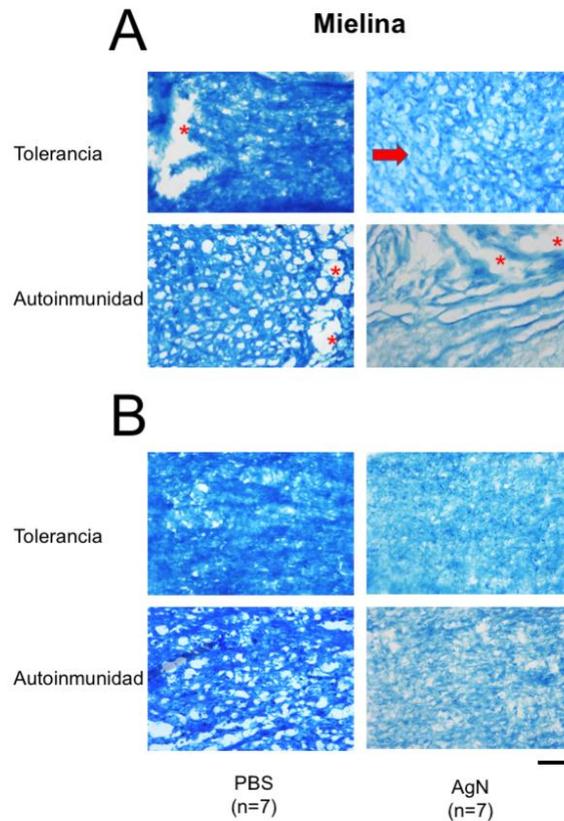


Figura 12. Efecto de la inducción de tolerancia y autoinmunidad sobre la estructura tisular al día 7 post-lesión del nervio óptico. El panel A presenta microfotografías representativas del epicentro de la lesión en cortes de nervio óptico teñidos con luxol fast blue. Los asteriscos muestran sitios libres de mielina y pérdida de la continuidad de los axones. La flecha señala la preservación de la mielina y la continuidad axonal. El panel B presenta microfotografías representativas de la región contigua a la lesión en cortes de nervio óptico teñidos con luxol fast blue. Barra de escala=50 μ m.

5. Expresión de factores de supervivencia y muerte en la retina a los 14 días post-lesión del nervio óptico

Debido a que los resultados previos sugieren que autoinmunidad no preserva ni la supervivencia de las CGR ni la estructura tisular del nervio óptico, al día 14 postlesión únicamente fue evaluada la expresión de los factores Brn-3a, Bcl-2 y Casp-3. Los resultados muestran que la tolerancia a AgN incrementa la

expresión de Bcl-2 con respecto al control (Brn-3a: $t_{(1,4)}=-1.33$, $p>0.05$; Bcl-2: $t_{(1,6)}=-3.40$, $p<0.05$; Casp 3: $t_{(1,4)}=-1.50$, $p>0.05$. Figura 13).

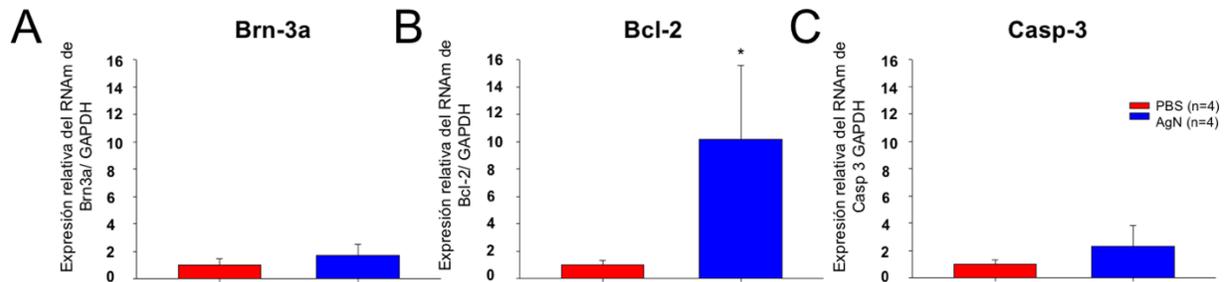


Figura 13. Efecto de la inducción de tolerancia sobre la expresión de factores de supervivencia y muerte en la retina al día 14 post-lesión del nervio óptico. A-C. Las gráficas muestran la expresión relativa del mRNA de Brn3a, Bcl-2 y Casp-3 con respecto al gen constitutivo GAPDH en la retina de ratas sometidas a lesión del nervio óptico. Se grafican los promedios \pm el EEM. Las comparaciones entre grupos fueron realizadas mediante la prueba *t de Student no pareada*. * $p<0.05$.

VIII. DISCUSIÓN

No existe un tratamiento eficaz que evite la pérdida significativa de neuronas después de una lesión traumática al SNC. Debido a que esta pérdida neuronal está relacionada con la activación del sistema inmunológico, dos estrategias opuestas de inmunomodulación han sido propuestas (tolerancia vs. autoinmunidad). Paradójicamente, ambas estrategias parecen evitar la muerte secundaria al trauma disminuyendo la respuesta inflamatoria (tolerancia) o incrementándola (autoinmunidad). Hasta el momento, ningún trabajo ha comparado el efecto neuroprotector de ambas estrategias de modulación usando el mismo modelo de lesión ni el mismo coctel de antígenos. Con el objetivo de identificar los mecanismos que subyacen a los efectos neuroprotectores reportados, este trabajo compara dos estrategias previamente descritas usando como modelo la lesión por compresión del nervio óptico en ratas.

Los resultados obtenidos muestran que la inoculación de AgN en la cámara anterior del ojo induce inmunotolerancia sistémica, medida mediante su capacidad para atenuar la respuesta Th1 en la prueba DTH y para incrementar la expresión del marcador de Tregs en el bazo, como ha sido descrito en la literatura previamente (Farooq et al., 2013; Martínez-Alcantar *et al.*, 2019).

Por su parte, la inmunización subcutánea con AgN a la concentración y la forma de administración reportada en la literatura incrementa la respuesta inflamatoria Th1 en la prueba de DTH, pero no incrementa los niveles séricos de IgGs ni 14 días después de la inmunización con AgN ni 14 días después de la re-inmunización. El hecho que la inmunización con la proteína exógena BSA logre incrementar los niveles séricos de IgGs desde la primera inmunización sugiere que existen mecanismos endógenos estrictos capaces de regular la respuesta autoinmune mediada por anticuerpos IgGs. Esta posibilidad es apoyada por trabajos recientes que muestran que la tolerancia inmunológica para auto-antígenos es fuertemente mantenida, además de por diversos mecanismos centrales y periféricos previamente descritos (p. ej., anergia clonal y edición de receptores) (Pelanda y Torres, 2012), por mecanismos novedosos como el secuestro de auto-anticuerpos (Gunasekaran *et al.*, 2018). Para el caso particular

de los neuroantígenos, ha sido reportado que existen poblaciones de neuronas, como las del ganglio de la raíz dorsal, capaces de secuestrar los auto-anticuerpos en sus somas, evitando la respuesta autoinmune (Gunasekaran *et al.*, 2018; Imperato, 2019).

En conjunto, estos mecanismos mantienen la respuesta autoinmune en control a menos que la barrera hematoneural se encuentre comprometida, que exista una reactividad cruzada, que existan linfocitos T y B poliespecíficos de memoria reactivados por bacterias comensales (capaces de translocarse del intestino a la circulación. Bansal *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2004) o que existan patógenos capaces de destruir el tejido neural y liberar DAMPs y neuroantígenos (Blander *et al.*, 2012). Un factor común a estos eventos que desencadenan la respuesta autoinmune mediada por anticuerpos es la activación de receptores de patrones moleculares (o PPRs, por sus siglas en inglés). Estos receptores pueden ser activados tanto por DAMPs como por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés), lo que sugiere que se requiere más de una señal molecular para activar la respuesta contra antígenos propios. Para probar esta posibilidad, en este trabajo un grupo de ratas re-inmunizadas con AgN fue sometido a la lesión del nervio óptico. Reportes previos muestran que la lesión traumática de la médula espinal libera DAMPs (Kiger y Popovich, 2009) y estimula la respuesta humoral periférica favoreciendo la producción de auto-antígenos (Hanke y Kielian, 2011). Nuestros resultados muestran que la lesión del nervio óptico es capaz de incrementar los niveles séricos de IgGs en ratas inmunizadas en dos ocasiones con respecto a los niveles pre-lesión y con respecto al grupo control, lo que apoya que la liberación de moléculas asociadas al daño tisular y la liberación de componentes neurales puede vulnerar los mecanismos de control y desencadenar la respuesta humoral mediada por IgGs. De manera interesante, la lesión del nervio óptico *per se* no logra incrementar los niveles de IgGs a los 7 dpl. Ha sido reportado que la lesión por contusión de la médula espinal logra incrementar los niveles séricos de IgG2 a partir del día 14 post-lesión (Ankeny *et al.*, 2016), por lo que probablemente la lesión del nervio óptico incremente los niveles séricos también en esta ventana de tiempo.

Una vez establecidos los modelos de inmunomodulación, su capacidad para regular la respuesta inflamatoria y desencadenar eventos neuroprotectores en el sitio del daño fue evaluada mediante la cuantificación de la expresión relativa de los mRNA de citocinas seleccionadas. Los resultados muestran perfiles de citocinas congruentes con reportes previos. Esto es, incremento en la expresión de la IL-4 y 6 en la retina en el modelo de tolerancia inducida mediante DIACA (Martínez-Alcantar *et al.*, en revisión) e incremento en la expresión de INF- γ y TNF- α en el caso de autoinmunidad (Pollard *et al.*, 2013; Moudgil y Choube, 2011).

La tolerancia a AgN incrementó intensamente la expresión de IL-4 y 6 en comparación con los niveles del grupo sham, el grupo lesión y los grupos de autoinmunidad. Debido a que IL-6 es una citocina cuya función ha sido relacionada tanto con una respuesta Th1 (Fisher *et al.*, 2001) como con Th2 (Sánchez *et al.*, 2003; Erta *et al.*, 2012), podría estar detrás de los efectos neuroprotectores reportados por ambas estrategias inmunomoduladoras. Sin embargo, los resultados de este proyecto sugieren que la IL-6 inducida por la tolerancia en la retina tiene efectos anti-inflamatorios y potencialmente neuroprotectores/reparativos después de una lesión del nervio óptico. Por su parte, IL-4 es una citocina característica de los linfocitos Th2 (Luckheeram *et al.*, 2012; Zhu, 2015). Ha sido reportado previamente que la DIACA incrementa la expresión de Arg-1, un marcador de macrófagos activados alternativamente (M2) capaces de regular la inflamación mediante el cambio de fenotipo de Th1 hacia Th2 y disparar la producción de factores neurotróficos (Martínez-Alcantar *et al.*, 2019). En conjunto, los resultados sugieren que los efectos de DIACA muy probablemente sean debidos a la inducción de linfocitos Th2 y Tregs en la retina.

En el caso de las citocinas pro-inflamatorias INF- γ y TNF- α , el escenario inducido por ambas estrategias inmunomoduladoras es más intrincado. Por una parte, únicamente la inmunización con PBS es capaz de incrementar la expresión de INF- γ , mientras la inoculación de AgN en la cámara anterior del ojo parece disminuir su expresión. Por su parte, la expresión de TNF- α es incrementada en ambos grupos de autoinmunidad en la retina en comparación con el resto de las

condiciones experimentales. Resultados previos de nuestro grupo de trabajo muestran que la inducción de tolerancia mediante DIACA incrementa la expresión de ambas citocinas en la retina después de la lesión del nervio óptico en comparación con el grupo control PBS (Martínez-Alcantar *et al.*, 2019). Sin embargo, la comparación entre los distintos grupos presentados en el presente proyecto permiten interpretar los resultados de una manera más completa al identificar que no existen diferencias entre la expresión de los grupos lesión y sham con el grupo tolerante a AgN. Así, más bien resulta interesante identificar qué es lo que disminuye la expresión de ambas citocinas en el grupo inoculado en la cámara anterior con PBS.

Con el objetivo de evaluar el potencial de la tolerancia y la autoinmunidad para favorecer la supervivencia de las CGR en un modelo de lesión del nervio óptico, la expresión del RNAm de Brn-3a fue cuantificada en la retina de ratas a los 7 dpl. Siguiendo con el diseño experimental propuesto, la expresión de Brn-3a fue cuantificada en los seis grupos experimentales. Los resultados muestran que las ratas del grupo sham presentan una expresión incrementada de este marcador, que coincide con la supervivencia de las CGR. Sin embargo, la comparación de los grupos de tolerancia y autoinmunidad no muestran diferencias en la expresión de Brn-3a en la retina. Reportes previos de nuestro grupo de trabajo muestran que la inducción de tolerancia a AgN preserva el número de CGR Brn-3a+ en la retina a los 7 y 14 dpl en comparación con el grupo inoculado con PBS, pero no en comparación con el grupo sometido solo a lesión del nervio óptico (Martínez-Alcantar *et al.*, 2019). Estos resultados, en conjunto con experimentos que muestran que la inoculación *per se* no altera el número de CGR Brn-3a+ (Benozzi *et al.*, 2002; Urcola *et al.*, 2006), sugieren que la inoculación y la lesión producen un detrimento potenciado sobre la supervivencia de las CGR. Por ello, la comparación entre los seis grupos fue descartada, y se tomó la decisión de comparar cada estrategia inmunomoduladora con su respectivo control PBS.

Los resultados muestran que el mRNA de Brn-3a incrementa en los animales inmunotolerantes a AgN con respecto al control PBS. Por su parte, la inducción de autoinmunidad a AgN no produce cambios en la expresión de Brn-3a

en comparación con el grupo control. El hecho de que la expresión de Brn-3a no se incremente en los animales autoinmunes a AgN sugiere que este tratamiento no tiene un efecto neuroprotector. Este resultado es apoyado por los análisis histológicos realizados en el nervio óptico al día 7 post-lesión, los cuales muestran que las ratas inoculadas en la cámara anterior con AgN presentan una mayor preservación de la estructura tisular y la mielina en el epicentro de la lesión en comparación con el resto de los grupos. De hecho, las microfotografías del nervio óptico muestran espacios libres de mielina y axones en las ratas inoculadas en la cámara anterior con PBS, así como aquéllas inmunizadas con PBS y AgN (figura 12). Los datos obtenidos apoyan parcialmente los resultados de un reporte previo que muestra que la inmunización con homogenado completo de médula espinal no preserva la supervivencia de las CGR después de una lesión por compresión del nervio óptico pero si incrementa la regeneración axonal (Ellezam *et al.*, 2003). Una de las principales diferencias entre los dos estudios es el homogenado empleado. Mientras en este trabajo empleamos homogenado enriquecido en proteínas citosólicas, en el reporte previo usaron homogenado total de médula espinal, el cual no induce un efecto neuroprotector tampoco en nuestro modelo de inmunomodulación (Martínez-Alcantar *et al.*, 2019).

Brn-3a es un factor de transcripción vital para la supervivencia de las CGR (Badea *et al.*, 2009), cuya expresión está en estrecha correlación con la presencia de la proteína e inversamente correlacionado con la presencia de marcadores apoptóticos (Martínez-Alcantar *et al.*, 2019; Nadal-Nicolás *et al.*, 2009; Sánchez-Migallón *et al.*, 2016). En el caso del factor de supervivencia Bcl-2 los resultados muestran que el grupo de tolerancia inmunológica a AgN no presenta cambios en la expresión de este gen con respecto a su grupo control, mientras que el grupo con autoinmunidad protectora a AgN si muestra un incremento con respecto a su grupo control. Adicionalmente, para el marcador pro-apoptótico Casp-3, los resultados muestran diferencias significativas para ambas estrategias inmunomoduladoras. En el caso de la inmunotolerancia se observa una disminución, mientras que en la autoinmunidad es posible observar un incremento. Tomados en conjunto, los resultados sugieren que mientras la tolerancia

inmunológica promueve la supervivencia de las CGR, la autoinmunidad promueve la muerte apoptótica extrínseca (independiente de citocromo C).

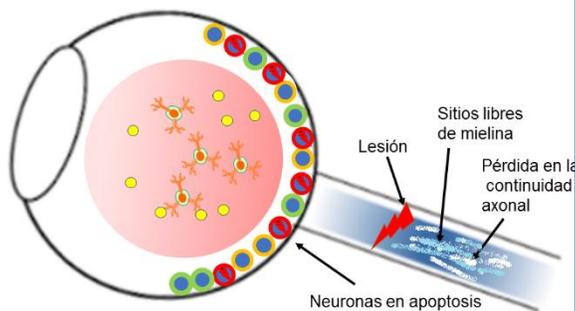
Debido a que los resultados del presente trabajo no muestran un efecto neuroprotector de la autoinmunidad (medido indirectamente mediante la expresión de Brn-3a y mediante la estructura tisular del nervio óptico a los 7 dpl), se decidió evaluar únicamente el efecto neuroprotector de la tolerancia inmunológica a los 14 dpl a través de los mismos marcadores moleculares (Brn-3a, Bcl-2 y Casp-3). Los resultados muestran que la tolerancia a los 14 dpl únicamente incrementa la expresión de Bcl-2, lo que sugiere que esta estrategia logra retardar la muerte celular al día 7 post-lesión pero no mantiene la supervivencia de las CGRs en el tiempo. Probablemente el hecho de que Bcl-2 se encuentre incrementado a los 14 dpl es suficiente para evitar un incremento en la muerte celular por apoptosis (medida indirectamente mediante la expresión de Casp-3) pero no para preservar la supervivencia de las CGRs.

Deberán ser realizados más estudios para esclarecer y completar el mecanismo molecular mediante el cual DIACA promueve la supervivencia de las células ganglionares de la retina después de una lesión del nervio óptico. Particularmente, será necesario evaluar la presencia de Casp-3 activada en la retina para verificar su contribución en el mecanismo de acción de cada estrategia inmunomoduladora después de la lesión del nervio óptico.

IX CONCLUSIÓN

Los resultados sugieren que la tolerancia inmunológica a AgN es una estrategia que promueve la supervivencia de las CGRs, favorece la estructura tisular y la disminución de la pérdida de la mielina en el nervio óptico, en comparación con la autoinmunidad a AgN. En conjunto, dichas evidencias sugieren que la tolerancia inmunológica a AgN tiene un efecto neuroprotector y la autoinmunidad a AgN no (Figura 14).

A. Autoinmunidad protectora



B. Tolerancia inmunológica

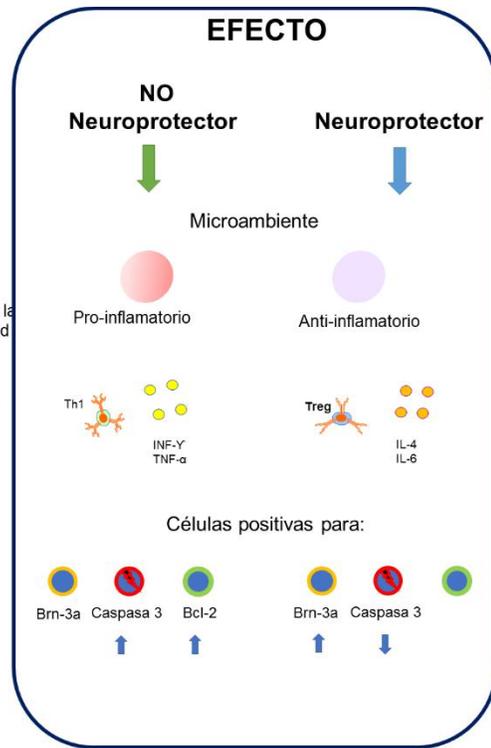
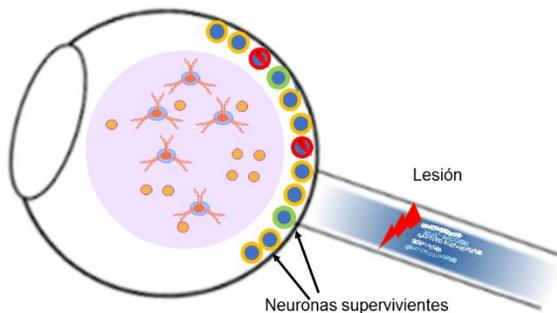


Figura 14. Representación esquemática de los mecanismos de acción de las dos estrategias inmunomoduladoras (autoinmunidad protectora y tolerancia inmunológica) y su efecto protector 7 días después de una lesión del nervio óptico. Se muestra el microambiente, el tipo celular y las biomoléculas presentes en cada uno de los procesos de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

ANEXO

Resumen de los procedimientos y análisis estadísticos.

Tabla 2. Inducción de tolerancia inmunológica y autoinmunidad protectora.

PROCEDIMIENTO	GRUPO DE ANIMALES	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	GEN	n	RESULTADOS ESTADÍSTICOS	Fig.
Inoculación en cámara anterior del ojo, prueba de hipersensibilidad de tipo retardada	PBS y AgN	t de Student	---	9-10	$U_{(1,17)}=0.0, p < 0.001$	8 A
Inoculación en cámara anterior del ojo, cuantificación del RNAm en bazo	PBS y AgN	t de Student	Foxp3	5	$t_{(1,8)}=-4.95, p = 0.001$	8 B
Inoculación en flancos, prueba de hipersensibilidad de tipo retardada	PBS y AgN	t de Student	---	5	$t_{(1,8)}=-2.71, p < 0.05$	9 A
Inoculación flancos, cuantificación de IgGs en suero 14 días pos inoculación	PBS y AgN (previo y posterior al procedimiento)	t de Student no pareada * t de Student pareada	---	4	Pre PBS vs Post AgN $t_{(1,6)}=0.87, p > 0.05$ Post PBS vs Post AgN $t_{(1,6)}=1.18, p > 0.05$ *Pre PBS vs Post PBS $t_{(1,6)}=-1.50, p > 0.05$ *Pre AgN vs Post AgN $W_{(1,6)}= 8.00, p > 0.05$	9 B
Inoculación flancos, cuantificación de IgGs en suero 14 días pos inoculación	PBS y BSA (previo y posterior al procedimiento)	t de Student no pareada * t de Student pareada	---	4	Pre PBS vs Post BSA $t_{(1,6)}=-16.76, p = 0.001$ Post PBS vs Post AgN $t_{(1,6)}=-16.73, p > 0.001$ *Pre PBS vs Post PBS $t_{(1,6)}= 0.35, p > 0.05$ *Pre AgN vs Post AgN $t_{(1,6)}=-12.25, p = 0.001$	9 C
Inoculación flancos, cuantificación de IgGs en suero después de la reinmunización	PBS y AgN (previo y posterior al procedimiento)	t de Student no pareada * t de Student pareada	---	5	Pre PBS vs Post AgN $t_{(1,6)}=0.62, p > 0.05$ Post PBS vs Post AgN $t_{(1,6)}=1.99, p > 0.05$ *Pre PBS vs Post PBS $t_{(1,6)}=-1.55, p > 0.05$ *Pre AgN vs Post AgN $t_{(1,6)}= 0.96, p > 0.05$	9 D
Inoculación flancos, cuantificación de IgGs después de la lesión del nervio óptico	PBS y AgN (previo y posterior al procedimiento)	t de Student no pareada * t de Student pareada	---	4	Pre PBS vs Post AgN $t_{(1,6)}=-1.84, p > 0.05$ Post PBS vs Post AgN $t_{(1,6)}=-3.86, p < 0.01$ *Pre PBS vs Post PBS $t_{(1,6)}= 1.00, p > 0.05$ *Pre AgN vs Post AgN $t_{(1,6)}=-8.63, p < 0.01$	9 E

Tabla 3. Evaluación del perfil inflamatorio 7 días después de la lesión del nervio óptico.

PROCEDIMIENTO	GRUPO DE ANIMALES	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	GEN	n (por grupo)	RESULTADOS ESTADÍSTICOS	Fig.
Tolerancia inmunológica o autoinmunidad protectora, lesión del nervio óptico y cuantificación del RNAm en retina 7dpi	Tolerancia (PBS, AgN) Autoinmunidad (PBS, AgN) Lesión Sham	ANOVA de una vía	IL-4	3	$F_{(5,13)}=10.62, p < 0.001$	10 A
			IL-6	3	$F_{(5,12)}=4.87, p < 0.01$	10 B
			INF- γ	3	$F_{(5,15)}= 3.83, p < 0.05$	10 C
			TNF- α	3	$F_{(5,14)}= 22.57, p < 0.001$	10 D

Tabla 4. Evaluación del efecto neuroprotector 7 días después de la lesión del nervio óptico.

PROCEDIMIENTO	GRUPO DE ANIMALES	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	GEN	n	RESULTADOS ESTADÍSTICOS	Fig.
Tolerancia inmunológica o autoinmunidad protectora, lesión del nervio óptico y cuantificación del RNAm en retina 7dpl	Tolerancia (PBS, AgN) Autoinmunidad (PBS, AgN) Lesión Sham	ANOVA de una vía	Brn-3a	3-4	$F(5,14)=7.86$ $p = 0.001$	No mostrada
Inmunotolerancia, lesión del nervio óptico y cuantificación del RNAm en retina 7dpl	PBS AgN	t de Student no pareada	Brn-3a	3-4	$t_{(1,5)}=7.36$, $p < 0.001$	11 A
			Bcl-2	3	$t_{(1,4)}= -1.13$, $p > 0.05$	11 B
			Casp-3	3	$t_{(1,4)}= 35.51$, $p < 0.001$	11 C
Autoinmunidad, lesión del nervio óptico y cuantificación del RNAm en retina 7dpl	PBS AgN	t de Student no pareada	Brn-3a	3-4	$t_{(1,5)}=0.32$, $p > 0.05$	11 A
			Bcl-2	3-4	$t_{(1,5)}= 2.77$, $p < 0.05$	11 B
			Casp-3	3	$t_{(1,4)}= -2.99$, $p < 0.05$	11 C

Tabla 5. Evaluación del efecto neuroprotector 14 días después de la lesión del nervio óptico

PROCEDIMIENTO	GRUPO DE ANIMALES	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	GEN	n	RESULTADOS ESTADÍSTICOS	Fig.
Inmunotolerancia, lesión del nervio óptico y cuantificación del RNAm en retina 14dpl	PBS AgN	t de Student	Brn-3a	3-4	$t_{(1,5)}=-1.33$, $p > 0.05$	13 A
			Bcl-2	4	$t_{(1,6)}=-3.40$, $p < 0.05$	13 B
			Casp-3	3	$t_{(1,4)}= -1.50$, $p > 0.05$	13 C

X. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2007. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature Immunology*. 2007, 8(9), 942–949. <https://doi.org/10.1038/ni1496>
- Agudo, M., Pérez-Marín, M. C., Lönngrén, U., Sobrado, P., Conesa, A., Cánovas, I., Vidal-sanz, M., 2008. Time course profiling of the retinal transcriptome after optic nerve. *Molecular Vision*. 2008, 3(14), 1050-63.
- Agudo, M., Parrilla-Reverter, G., Paz, M., Vidal-Sanz, M., 2012. Anatomical and Molecular Responses Triggered in the Retina by Axonal Injury. *The Mystery of Glaucoma. The Mystery of Glaucoma*. Murcia, España. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/19066>
- Allison, D. J., Ditor, D. S., 2015. Immune dysfunction and chronic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2015, 53(1), 14–18. <https://doi.org/10.1038/sc.2014.184>
- Almasieh, M., Wilson, A. M., Morquette, B., Cueva Vargas, J. L., Di Polo, A., 2012. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2012, 31(2), 152–181. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.11.002>
- Anderson K., Olson K., Estes K., Flanagan K., Grndelman H. Mosley R., 2014 Dual destructive and protective roles of adaptive immunity in neurodegenerative disorders. *Transnational Neurodegeneration*. 2014, 3(25)
- Ankeny, D. P., Lucin, K. M., Sanders, V. M., McGaughy, V. M., Popovich, P. G., 2006. Spinal cord injury triggers systemic autoimmunity: Evidence for chronic B lymphocyte activation and lupus-like autoantibody synthesis. *Journal of Neurochemistry*, 2006, 99(4), 1073–1087. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04147.x>
- Angelov, D. N., Waibel, S., Guntinas-Lichius, O., Lenzen, M., Neiss, W. F., Tomov, T. L., Yoles, Kipnis, E. J., Schori, H., Reuter, A., Ludolph, A., Schwartz, M.

2003. Therapeutic vaccine for acute and chronic motor neuron diseases: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(8), 4790–4795. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530191100>
- Badea, T. C., Cahill, H., Ecker, J., Hattar, S., Nathans, J., 2009. Distinct Roles of Transcription Factors Brn3a and Brn3b in Controlling the Development, Morphology, and Function of Retinal Ganglion Cells. *Neuron*. 2009, 61(6), 852–864. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.020>
- Bakalash S., Kessler A., Mizrahi T., Nussenblatt R., Schwartz M., 2003 Antigenic specific of immunoprotective therapeutic vaccination for glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003, 44 (8), 3374-3381. doi:10.1167/iops.03-0080
- Bansal V., Costantini T., Peterson C., Loomis W., Eliceiri B., Baird A., Wolf P., Coimbra R., 2009. Traumatic brain injury and intestinal dysfunction: uncovering the neuro-enteric axis. *Journal Neurotrauma*. 26(8):1353-1359
- Barouch R. y Schwartz M., 2002. Autoreactive T cells induce neurotrophin production by immune and neural cells in injured rat optic nerve: implications for protective autoimmunity. *FASEB* 0892-6638/02/0016-1304
- Benozzi, J., Nahum, L.P., Campanelli, J.L., Rosenstein, R.E., 2002. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2002, 43, 2196–2200
- Bio-Rad Laboratories. iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-PCR.
- Bio-Rad Laboratories. SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix.
- Brennan, F. H., Anderson, A. J., Taylor, S. M., Woodruff, T. M., Ruitenberg, M. J., 2012. Complement activation in the injured central nervous system: Another dual-edged sword?. *Journal of Neuroinflammation*. 2012, 9, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-137>

- Chen, S., Wu, H., Klebe, D., Hong, Y., Zhang, J., Tang, J. 2013. Regulatory T Cell in Stroke: A New Paradigm for Immune Regulation. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/689827>
- Davis, J. A., 2008. Mouse and Rat Anesthesia and Analgesia. *Current Protocols in Neuroscience* A.4B.1-A.4B.21. 2008, 1–21. <https://doi.org/10.1002/0471142301.nsa04bs42>.
- Delfino, D., Matos, D., Gamboa, D., Rodríguez, D., 2011. Alteraciones del campo visual en enfermedades neurooftalmológicas y retinianas. *Revista Información Científica*. 2011, 69 (1), 1-6.
- Del Olmo-Aguado, S., Núñez-Álvarez, C., Ji, D., Manso, A. G., Osborne, N. N., 2013. RTP801 immunoreactivity in retinal ganglion cells and its down-regulation in cultured cells protect them from light and cobalt chloride. *Brain Research Bulletin*. 2013, 98, 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2013.08.002>
- Diehl, S., Rincón, M., 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular Immunology*, 2002, 39(9), 531–536. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(02\)00210-9](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(02)00210-9)
- Donnelly, D. J., Popovich, P. G., 2008. Inflammation and its role in neuroprotection axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Experimental Neurology*. 2008, 209, 378–388. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.06.009>
- Ellezam, B., Bertrand, J., Dergham, P., Mckerracher, L., 2003. Vaccination stimulates retinal ganglion cell regeneration in the adult optic nerve. *Neurobiology of Disease*. 2003, 12, 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0969-9961\(02\)00013-X](https://doi.org/10.1016/S0969-9961(02)00013-X).
- Eming, S. A., Krieg, T., Davidson, J. M., 2007. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007, 127(3), 514–525. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700701>

- Erta, M., Quintana, A., & Hidalgo, J. (2012). Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *International Journal of Biological Sciences*. 2012, 8(9), 1254–1266. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4679>
- Estrada, F., Morales, J., Tabla, E., & Solís, B. (2012). *Neuroprotección y traumatismo craneoencefálico*. 2–7.
- Eugenin, E. A., Osiecki, K., Lopez, L., Goldstein, H., Calderon, T. M., Berman, J. W., 2006. CCL2 / Monocyte Chemoattractant Protein-1 Mediates Enhanced Transmigration of Human Immunodeficiency Virus (HIV) -Infected Leukocytes across the Blood – Brain Barrier: A Potential Mechanism of HIV – CNS Invasion and Neuron. 2006, 26(4), 1098–1106. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3863-05.2006>
- Faden, A. I., & Salzman, S. (1993) Experimental neurobiology of central nervous system. *Revista Neuroscientific*.
- Farooq, S. M., Ashour, H. M., 2013. Eye-Mediated Induction of Specific Immune Tolerance to Encephalitogenic Antigens. *CNS Neuroscience Therapeutics*. 2013, 19(7):503-10. <https://doi.org/10.1111/cns.12087>
- Ferry, H., Jones, M., Vaux, D. J., Roberts, I. S. D., Cornall, R. J., William, S. 2003. The Cellular Location of Self-antigen determines the Positive and Negative Selection of Autoreactive B Cells. *Journal Neurotrauma*. 2003, 19(6):753-61. 198(9). <https://doi.org/10.1084/jem.20030279>
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., Zeller, R., 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2008, 3(5), 4986–4988. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
- Fisher, J., Levkovitch-Verbin, H., Schori, H., Yoles, E., Butovsky, O., Kaye, J. F., Ben-Nun, A., Schwartz, M., 2001. Vaccination for Neuroprotection in the Mouse Optic Nerve: Implications for Optic Neuropathies. *The Journal of Neuroscience*. 2001, 21(1), 136–142. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-01-00136.2001>

- Gadani, S. P., Walsh, J. T., Lukens, J. R., Kipnis, J., 2015. Dealing with Danger in the CNS: The Response of the Immune System to Injury. *Neuron*. 2015, 87(1), 47–62. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.019>
- Galea, I., Bechmann, I., Perry, V. H., 2007. What is immune privilege (not)? *Trends in Immunology*. 2007, 28(1), 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.11.004>
- García (2012). Las lecciones de la Tuberculosis. *Revista Académica de Colombia*. 2012,36 (39).
- Gil-Dones, F., Alonso-Orgaz, S., Avila, G., Martin-Rojas, T., Moral-Darde, V., Barroso, G., Vivanco, F., Scott-Taylor, J., Barderas, M. G., 2009. An optimal protocol to analyze the rat spinal cord proteome. *Libertas Academica*. 2009, 4, 135-164.
- Goto, N. 1987. Discriminative staining methods for the nervous hematoxylin triple stain and subsidiary staining methods system Luxol Fast-Blue-Periodic Acid-Schiff. *Stain Technology Stain Technol*. 1987, 62(5):305-15.
- Grosskreutz C., Hanninen V., Pantcheva M., Dobberfuhr A., 2005 FK506 blocks activation of the intrinsic caspase cascade after optic nerve crush. *Experimental Eye Research*. 2005, 80(5):681-6.
- Gunasekaran, M., Chatterjee, P. K., Shih, A., Imperato, G. H., & Metz, C. N., 2018. Immunization Elicits Antigen-Specific Antibody Sequestration in Dorsal Root Ganglia Sensory Neurons. *Frontiers Immunology*. 2018, 9(638), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00638>
- Guimarães, J. S., Freire, M.A.M., Lima, R.R., Souza-Rodrigues, R.D., Costa, A.M.R. Dos Santos, C.D., Picanço-Diniz, C.W., 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. *Revista de Neurología*. 2009, 304-310.
- Guo, H., Callaway, J. B., Ting, J. P. 2015. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine*. 2015, 21(7), 677–687. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>

- Hanke, M. L., Kielian, T., 2011. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin SCI (London)*. 2011,121(9). 367-387.
- Gurtner G., Werner S., Barrandon Y., Longaker T., 2008 Wound repair and regeneration. *International journal of Science. Nature*. 2008, 453, 314–321
- Harwood, N. E., Batista, F. D., 2010. Early Events in B Cell Activation. *Annual Review of Immunology*. 2010, 28, 185–210 <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101216>
- Hauben, E., Butovsky, O., Nevo, U., Yoles, E., Moalem, G., Agranov, E., Mor, F., Leibowitz-Amit, R., Pevsner, E., Akselrod, S., Neeman, M., Cohen, I., Schwartz, M., 2018. Passive or Active Immunization with Myelin Basic Protein Promotes Recovery from Spinal Cord Contusion. *The Journal of Neuroscience*. 2018, 20(17), 6421–6430. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-17-06421.2000>
- Hayes, K. C., Hull, T., Delaney, G. A., Potter, P. J., Sequeira, K., 2002. Elevated Serum Titers of Proinflammatory Cytokines and CNS Autoantibodies in Patients with Chronic Spinal Cord Injury. *Journal Neurotrauma*. 2002, 19(6),753-61.
- Hernandez, M.R., 2000. The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling. *Prog. Retin. Eye Res*. 2000, 19, 297–321. [doi:10.1016/S1350-9462\(99\)00017-8](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(99)00017-8)
- Hong, B. S., Kaer, L. Van., 1999. Immune Privilege : Keeping an Eye on Natural Killer T Cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 1999, 190(9), 1197–1200.
- Hong, Y., 2014. Mechanisms of secondary degradation after partial optic nerve transection. *Neural Regen Res*. 2014, 15;9(6), 565-74. [doi: 10.4103/1673-5374.130093](https://doi.org/10.4103/1673-5374.130093)
- Horner, P. J., Gage, F. H., 2000. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature*. 2000, 407, 963–970.

- Huang, E. J., Liu, W., Fritsch, B., Bianchi, L. M., Reichardt, L. F., Xiang, M. 2001. Brn3a is a transcriptional regulator of soma size, target field innervation and axon pathfinding of inner ear sensory neurons. *Development*, 2001, 128(13), 2421–2432. Retrieved from <http://dev.biologists.org/content/128/13/2421.abstract>.
- Imperato, G. H., 2019. Neurons Control Antigen Trafficking and Sequester Antigen-Specific Antibody. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2019, 143(2), AB214. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.12.653>
- Murphy, K., Weaver, C., 2009. *Janeway's Immunology*. 9th edition. New York: Garland Science/Taylor & Francis
- Joachim, S. C., Gramlich, O. W., Laspas, P., Schmid, H., Beck, S., Von Pein, H. D., Burkhard, D., Norbert, P., Grus, F. H., 2012. Retinal ganglion cell loss is accompanied by antibody depositions and increased levels of microglia after immunization with retinal antigens. *PLoS ONE*, 2012, 7(7), e40616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040616>
- Jones, T. B., 2014. Lymphocytes and autoimmunity after spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 2014, 258, 78–90. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.03.003>
- Jones, T. B., Basso, D. M., Sodhi, A., Pan, J. Z., Hart, R. P., MacCallum, R. C., Popovich, P. G., 2002. Pathological CNS autoimmune disease triggered by traumatic spinal cord injury: implications for autoimmune vaccine therapy. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2002, 22(7), 2690–2700. <https://doi.org/20026267>
- Jones, T. B., 2004. Passive or Active Immunization with Myelin Basic Protein Impairs Neurological Function and Exacerbates Neuropathology after Spinal Cord Injury in Rats. *Journal of Neuroscience*. 2004, 24(15), 3752–3761. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0406-04.2004>
- Jones, T., 2014. Lymphocytes and autoimmunity after spinal cord injury. *Experimental Neurology*. 2014, 258, 78–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.03.003>

- Kawakami, N., Nägerl, U. V., Odoardi, F., Bonhoeffer, T., Wekerle, H., Flügel, A. 2005. Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005, 201 (11), 1805–1814. <https://doi.org/10.1084/jem.20050011>
- Kerschensteiner, B. M., Gallmeier, E., Behrens, L., Leal, V. V., Misgeld, T., Klinkert, W. E. F., Hohlfeld, R., 1999. Inflammatory Brain Lesions : A Neuroprotective Role of Inflammation?. *The Journal of Experimental Medicine*. 1999, 189(5), 1–6.
- Kiger, K.A., Popovich., 2009. Toll-like receptors in spinal cord injury. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009, 336, 121-36.
- Kipnis, J., Mizrahi, T., Hauben, E., Shaked, I., Shevach, E., & Schwartz, M. (2002) Neuroprotective autoimmunity: Naturally occurring CD4 Δ CD25 Δ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 99(24):15620-5
- Kipnis, J., Yoles, E., Porat, Z., Cohen, A., Mor, F., Sela, M., Cohen, S., Schwartz, M., 2000. T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve : Possible therapy for optic neuropathies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* ; 2000, 97(13):7446-51..
- Kimelberg H.K., 2004. Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neuroscience*. 2004, 129, 851–860
- Kreutzberg, G. W., 1995. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neuroscience*. 1995, 2236, 471–474.
- Kyle, C. McKenna., Yijun, X., Kapp J., 2002. Injection soluble antigen into the anterior chamber of the eye induces expansion an functional unresponsives of antigen- specific CD8+ T cell. *Journal Immunology*. 2002; 169, 5630-5637;. doi: 10.4049/jimmunol.169.10.5630

- Lanier, J., Quina, L. A., Eng, S. R., Cox, E., & Turner, E. E., 2007. Brn3a target gene recognition in embryonic sensory neurons. *Developmental biology*. 2007, 302, 703–716. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.10.050>
- Laspas, P., Gramlich, O. W., Mu, H. D., Cuny, C. S., Gottschling, P. F., Pfeiffer, N., Burkhard Dick, H., Joachim, S. C. Grus, F. H., 2011. Autoreactive Antibodies and Loss of Retinal Ganglion Cells in Rats Induced by Immunization with Ocular Antigens. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011, 52(12). <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6889>
- Lei, F., Zhang, J., Zhang, J., He, H., Du, Y., Yang, P., 2008. A penetrating ocular injury can affect the induction of anterior chamber – associated immune deviation. *Molecular vision*, 2008, 14, 327–333.
- Lima, R., Monteiro, S., Lopes, J. P., Barradas, P., Vasconcelos, N. L., Gomes, E. D., Assunção-Silva, R., Teixeira, F., Morais, M., Nuno S., Salgado, A. J., Silva, N. A., 2017. Systemic interleukin-4 administration after spinal cord injury modulates inflammation and promotes neuroprotection. *Pharmaceuticals*. 2017, 10(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ph10040083>
- London, A., Benhar, I., & Schwartz, M., 2012. The retina as a window to the brain. *Nature Reviews Neurology*. 2012, 9(1), 44–53. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.227>
- Lu, B., Pang, P. T., Woo, N. H., 2005. The yin and yang of neurotrophin action. *Nature Reviews Neuroscience*. 2005, 6(8), 603–614. <https://doi.org/10.1038/nrn1726>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4 + T Cells : Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012, 925135, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- López I., Schlüter A., Aso E., Garcia-Esparcia P., Ansoleaga B., Llorens F., Carmona M., Moreno J., Fuso A., Portero-Otin M., Pamplona R., Pujol A., Ferrer I., 2015. Neuroinflammatory signals in Alzheimer Disease an APP/PS1 transgenic mice. Correlation with plaques tangles an oligomeric species. *Journal Neuropathology Experimental Neurology*. 2015, 74(4), 319-344.

- Lynch, D., 1994. Secondary mechanisms in neuronal trauma. *Current Opinion in Neurology*. 1994, 510–516.
- Macantonia H. Hosken N., Litton M., Vieira P., Hsieh CS., Culpepper J., Wysocka M., Trinchieri G., Murphy K., O'Garra A., 1995. Dendritic cell produce IL-12 and direct the development of th1 cells from naive CD4+ T cells. *Journal of Immunology*.
- Martínez-Alcantar, L., Talavera-Carrillo D., Pineda-Salazar J., Ávalos-Viveros M., Gutiérrez-Ospina G., Phillips-Farfán B.V., Fuentes-Farías A., Meléndez-Herrera E., 2019 Neural antigen-specific immunotolerance as a neuroprotective strategy for traumatic spinal injury in rats. *Journal of Neuroimmunology*. 2019, 333, 476964. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.05.005>
- McPherson, S. W., Roberts, J. P., & Gregerson, D. S., 1999. Systemic expression of rat soluble retinal antigen induces resistance to experimental autoimmune uveoretinitis. *Journal of Immunology*. 1999, 163(8), 4269–4276.
- Moalem G., Monsonago A., Shani Y., Cohen I., Schwartz M., 1999. Differential T cell response in central and peripheral nerve injury connection with immune privilege. *The FASEB Journal*.
- Moalem G., Leibowitz–Amit R., Yoles E., Mor F., Cohen I., Schwartz M., 1999 Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nature medicine*. 1999, 5(1), 49-55.
- Mohn T. Koob A., 2015. Adult astrogenesis and the etiology of cortical neurodegeneration. *Journal Experimental Neuroscience*. 2015, 9, 25–34. Doi:10.4137/JEN.S25520
- Mor, F., & Cohen, I. R., 2006. How special is a pathogenic CNS autoantigen? Immunization to many CNS self-antigens does not induce autoimmune disease. *Journal of Neuroimmunology*, 2006, 174(1–2), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.12.003>

- Moreno, M.C., Aldana Marcos, H.J., Croxatto, J.O., Sande, P.H., Campanelli, J., Jaliffa, C.O., Benozzi, J., Rosenstein, R.E., 2005. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. *Exp. Eye Res.* 2005, 81 (1), 71–80
- Morgan, D., Diamond, D. M., Gottschall, P. E., Ugen, K. E., Dickey, C., Hardy, J., Arendash, G. W., 2000. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer ' s disease. *Nature.* 2000, 982–985.
- Moudgil D., Choube D. (2011) Cytokines in Autoimmunity: Role in Induction, Regulation, and Treatment. *Journal Interferon Cytokine Research.*
- Murphy, K., & Weaver, C., 2009. JANEWAY ' S 9 TH EDITION.
- Nadal-nicolas, F. M., Sobrado-calvo, P., Nieto-lo, L., Ca, I., Vidal-sanz, M., & Agudo, M., 2009. Brn3a as a Marker of Retinal Ganglion Cells : Qualitative and Quantitative Time Course Studies in Naïve and Optic Nerve –Injured Retinas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2009, 50(8), 3860–3868. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-3267>
- Niches, S. I., & Niederkorn, J. Y., 2006. See no evil , hear no evil , do no evil : the lessons of immune privilege. *Nature Immunology.* 2006, 7(4), 354–359. <https://doi.org/10.1038/ni1328>
- 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.
- Ono, K., Yasui, Y., Rutishauser, U., Miller, R. H., 1997. Focal ventricular origin and migration of oligodendrocyte precursors into the chick optic nerve. *Neuron,* 1997, 19(2), 283–292. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80939-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80939-3)
- Ono, N., Murakami, K., Chan, O., Hall, H., Elford, A. R., Yen, P., Calzascia, T., Spencer, D. M., Ohashi. P., Dhanji, S., 2017. Exposure to sequestered self-antigens in vivo is not sufficient for the induction of autoimmune diabetes. *PLoS One.* 2017, 12(3), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173176>

- Pelanda R. y Torres R., 2012. Central B cell tolerance: Where Selection begins. *Perspectives in Biology*. 2012, 1, 1-16
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007146>
- Pan, Q., Wang, Y., Li, G., Duan, X., Fan, J., 2015. Fuzheng Huayu Recipe Ameliorates Liver Fibrosis by Restoring Balance between Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Mesenchymal-to-Epithelial Transition in Hepatic Stellate Cells. *BioMed Research International*, 2015, 1, 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2015/935903>
- Perry, V. H., Andersson, P., & Gordon, S., 1993. Macrophages and inflammation in the central nervous system. *Trends Neuroscience*. 1993, 16(7), 16–17.
- Pineda-rodriguez, B., Toscano-tejeida, D., Garcı, E., Rodriguez-barrera, R., Flores-romero, A., Castellanos-canales, D., Gutierrez-Ospina, G., Castillo-Carvajal L., Meléndez-Herrera, E., Ibarra, A., 2017. Anterior chamber associated immune deviation used as a neuroprotective strategy in rats with spinal cord injury. *PLoS One*. 2017, 1, 1–18.
- Pollard K., Cauvi D., Toomey C., Morris K., Kono D., 2013. Interferon- γ and Systemic Autoimmunity. *Discover Medicine*. 2013, 16(87): 123–131.
- Plotkin, S., & Siegrist, C.-A., 2013. Vaccines - CH 2 How Do Vaccines Mediate Protection? *Vaccines*, 2013, 16–23. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0090-5.00004-5>
- Popovich, P. G., & Jones, T. B., 2003. Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord : back to basics. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2003, 24(1), 6–8.
- Porciatti, V., Pizzorusso, T., Cenni, M. C., Maffei, L., 2002. The visual response of retinal ganglion cells is not altered by optic nerve transection in transgenic mice overexpressing Bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(25), 14955–14959. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14955>
- Porter, A. G., Ja, R. U., 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. 1999, 99–104.

- Puyang, Z., Feng, L., Chen, H., Liang, P., Troy, J. B., Liu, X., 2016. Retinal Ganglion Cell Loss is Delayed Following Optic Nerve Crush in NLRP3 Knockout Mice. Nature Publishing Group. 2016, 6–13. <https://doi.org/10.1038/srep20998>
- Ramón y Cajal (1969) Degeneration and regeneration of the nervous system.
- Reinke J., Sorg H., 2012 Wound repair and regeneration. The International Journal of tissue Repair and Regeneration. 2012;49:35–43.
- Roque, A., Ochoa-Zarzosa, A., Torner, L., 2015. Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups , independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. Brain, Behavior, and Immunity. 2015, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.09.017>
- Rosenberg, G. A., 2012. Neurological diseases in relation to the blood – brain barrier. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism: 2012, 1139–1151. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.197>
- Rothaug, M., Becker-pauly, C., & Rose-john, S., 2016. These authors contributed equally. BBA - Molecular Cell Research. 2016, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.018>
- Rothwell, N. J., & Luheshi, G. N., 2000. Interleukin 1 in the brain: biology , pathology and therapeutic target. Trends Neuroscience. 2000, 1(00), 618–625.
- Sallusto, F., Geginat, J., Lanzavecchia, A., 2004. Central memory and effector memory t cell subsets : Function , Generation , and Maintenance. 2004, 22, 745–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>
- Sanchez, R. N., Chan, C. K., Garg, S., Kwong, J. M. K., Wong, M. J., Sadun, A. A., Lam, T. T., 2003. Interleukin-6 in Retinal Ischemia Reperfusion Injury in Rats. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 44(9), 2003, 4006–4011. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0040>
- Sánchez-Migallón, M. C., Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M., 2011. Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal

- ganglion cells. *Experimental Eye Research*, 2011, 92(4), 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.02.001>
- Saupe, F., Huijbers, E. J. M., Hein, T., Femel, J., Cedervall, J., Olsson, A. K., & Hellman, L., 2015. Vaccines targeting self-antigens: Mechanisms and efficacy-determining parameters. *FASEB Journal*. 2015, 29(8), 3253–3262. <https://doi.org/10.1096/fj.15-271502>
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S., 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research*, 2011, 1813(5), 878–888. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034>
- Schnell, L., Fearn, S., Klassen, H., Schwab, M. E., Perry, V. H., 1999. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *European Journal of Neuroscience*. 1999, 11, 3648–3658.
- Schwartz, M., 1996. Potential modalities for glaucomatous neuropathy neuroprotection and neurodegeneration. *Journal Glaucoma*.
- Schwartz, M., Kipnis, J., Schwartz, M., 2001. Autoimmunity: regulation and prospects for vaccination after brain and spinal cord injuries. *Trends in Molecular Medicine*. 2001, 7(6), 252–258.
- Schwartz K., Liu F., Sewell D, Schochet T., Campbell I., Fabry Z., 2001. Interleukin-6 promotes post-traumatic healing in the central nervous system. *Brain Research*. 2001, 896, 86–95
- Schwartz, M., Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., & Cohen, I. R., 1999. Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends in Neurosciences*, 1999, 22(7), 295–299. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(99\)01405-8](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(99)01405-8)
- Sharma, T. P., Mcdowell, C. M., Liu, Y., Wagner, A. H., Thole, D., Faga, B. P., Clark, A. F., 2014. Optic nerve crush induces spatial and temporal gene expression

- patterns in retina and optic nerve of BALB / cJ mice. *Molecular Neurodegeneration*. 2014, 9(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-14>
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010, 119, 7–35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
- Springer, J. E., 2011. Apoptotic Cell Death Following Traumatic Injury to the Central Nervous System. *BMB Reports*. 2011, 35(1), 94–105. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2002.35.1.094>
- Stein-Streilein J., Taylor A., 2017. An eyes view of T regulatory cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2017, 81, 593-598.
- Sun, D., M. Lye-Barthel, R.H. Masland, T.C. Jakobs, T., 2010. Structural remodeling of fibrous astrocytes after axonal injury. *J. Neurosci*. 2010, 30,14008–14019.doi:10.1523/JNEUROSCI.3605-10.2010
- Swartz, K. R., Liu, F., Sewell, D., Schochet, T., Campbell, I., Sandor, M., Fabry, Z. 2001. Interleukin-6 promotes post-traumatic healing in the central nervous system. *Brain Research*. 2001, 896(1–2), 86–95. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02013-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02013-3)
- 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.
- Takeuchi, S., Fujiwara, N., Ido, A., Oono, M., & Takeuchi, Y., 2010. Induction of Protective Immunity by Vaccination With Wild-Type Apo Superoxide Dismutase 1 in Mutant SOD1 Transgenic Mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2010, 69(10), 1044–1056.
- Takahashi R., Tooyama I., Taniguchi N., Julien J., Urushitani M., 2010. Induction of protective immunity by vaccination with wild-type apo superoxide dismutase 1 in mutant SOD1 transgenic mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2010, 192(2), 2000 303–309

- Tang, Z., Zhang, S., Lee, C., Kumar, A., Arjunan, P., Li, Y., Li, X., 2011. An Optic Nerve Crush Injury Murine Model to Study Retinal Ganglion Cell Survival 1 . Baseline Retrograde Labeling of Retinal Ganglion Cells (RGCs) Journal of Visualized Experiments. 2011, 50,1-3. <https://doi.org/10.3791/2685>
- Thomas, C. N., Berry, M., Logan, A., Blanch, R. J., Ahmed, Z., 2017. Caspases in retinal ganglion cell death and axon regeneration. *Cell Death Discovery*. 2017, 17032. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.32>
- Toscano-tejeida, D., Ibarra, A., Phillips-farfán, B. V, Fuentes-farías, A. L., Meléndez-herrera, E., 2016. ACAID as a potential therapeutic approach to modulate inflammation in neurodegenerative diseases. *Medical Hypotheses*. 2016, 88, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2016.01.006>
- Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispens, T., 2014. IgG subclasses and allotypes : from structure to effector functions, *Frontiers in Immunology*. 2014, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
- Villa, M., Przedborski S., 2003. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Neurological diseases*.
- Von-Bartheld, C. S., 1998. Neurotrophins in the developing and regenerating visual system. *Histological Histopathology*. 1998, 13, 437-459.
- Walsh, J. T., Zheng, J., Smirnov, I., Tung, K., Kipnis, J., Sword, D., 2014. Regulatory T Cells in Central Nervous System Injury: A Double-Edged Sword. *Journal Immunology*. 2014, 193,5013-5022. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302401>
- Waren, K., 2000. Code of Practice for the Immunisation of Laboratory Animals. 2000,1–16.
- Warrington, A. E., Bieber, A. J., Ciric, B., Van, V., Pease, L. R., Mitsunaga, Y., ... Rodriguez, M. (2001). Immunoglobulin-mediated CNS repair. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2001, S21-S25 . <https://doi.org/10.1067/mai.2001.118301>

- Weber, A. J., Harman, C. D., 2013. BDNF treatment and extended recovery from optic nerve trauma in the cat. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2013, 54(10), 6594–6604. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12683>
- Zhang Y., Popovich P., 2011. Roles of autoantibodies in central nervous system injury. *Discover Medicine*. 2011,11(60), 395-402.
- Zhu, J., 2015. Cytokine T helper 2 (Th2) cell differentiation , type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine*. 2015, 2, 32–34. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.010>