



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

Efecto de la inoculación de antígenos neurales en la cámara anterior del ojo sobre la expresión de Foxp3 en ratas con lesión del nervio óptico

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA INTEGRATIVA

PRESENTA

Biólogo Luis Fernando González Cárdenas

Tutor de Tesis

Dra. Esperanza Meléndez Herrera

Morelia, Michoacán, agosto del 2018.

Agradecimientos

- A CONACyT por el apoyo económico otorgado para realizar este trabajo.
- A la CIC por el apoyo económico otorgado para realizar este trabajo.
- A mi directora de tesis la doctora Esperanza Meléndez Herrera por su guía y dirección en este proyecto.
- A la dra. Alma Lilia Fuentes investigadora titular tipo C del laboratorio de Ecología Sensorial,UMSNH por su confianza, paciencia, amistad, conocimientos.
- A la dra. Clementina González Zaragoza Investigadora Catedrática CONACyT por sus comentarios y atención al proyecto.
- A la dra. Rosa Elvira Nuñez Anita Investigadora titular, del centro multidisciplinario de estudios en biotecnología CMEB del departamento de proteómica y bioingeniería celular por su experiencia y su apoyo en el área de biología molecular y uso de equipo de citometria y cultivo celular con el cual, fue posible realizar este trabajo.
- A la dra. Naima Lajud Avila SNI nivel "C" Investigadora asociada A, Encargada del Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo, División de Neurociencias Centro de Investigación Biomédica de Michoacán Instituto Mexicano del Seguro Social, por sus aportaciones y apoyo a este proyecto.
- A la dra. Marta Agudo Barriuso del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria IMIB, Murcia, España. Por su apoyo durante la estancia de investigación beca mixta CONACyT.
- A la dra. Caridad Galindo Romero por su amistad, experiencia y adiestramiento en realizar la lesión por compresión de nervio óptico.
- A todos los integrantes del Laboratorio de Oftalmología experimental del Instituto Murciano de Investigación

Biosanitaria IMIB, Murcia, España, por brindarme su hospitalidad, amistad y asesoría científica.

- A la M en I. Sibila Concha Santos, Técnico asociada al laboratorio nacional de nutrigenómica y microbiómica digestiva animal, por su apoyo y soporte técnico.
- Al Biól. Edel Pineda Pérez por su asistencia técnica para la manipulación de animales.
- A la Biól. Diana Karina Talavera Carrillo por su apoyo técnico en la inducción de ACAID.
- Al Biól. Johnathan Uriel Pineda Salazar por su apoyo técnico en la lesión del nervio óptico.
- A la M.C. Lorena Martínez Alcántar por su apoyo técnico en las pruebas de DTH, manipulación de animales y técnicas moleculares.
- Al M.C. Orlando David González Mendoza por su apoyo técnico en PCR tiempo real.
- A la MVZ. Madeline Hernández encargada del Bioterio IIQB-UMSNH por el cuidado de los animales de laboratorio la gran disponibilidad, amabilidad y sobre todo, por proveer al proyecto para que siempre contara con el materia biológico necesario; al Sr. Efraín también por la alimentación y el cuidado de los animales.
- A la pasante de Biología Irma Leticia Villanueva Pérez por su asistencia técnica para la manipulación de animales.
- A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Ecología Sensorial, UMSNH.
- A todo el personal del Instituto de Investigaciones sobre los recursos naturales.

Índice

1	Resumen	1
2	Introducción	3
3	Antecedentes	4
3.1	Inmuno privilegio ocular	4
3.2	Desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del ojo (ACAID)	6
3.3	ACAID y modulación de la inflamación	9
3.4	Autoinmunidad contra antígenos neurales	11
3.5	Fisiopatología de la lesión por compresión del nervio óptico	13
3.6	ACAID como estrategia neuroprotectora	14
4	Hipótesis	17
5	Objetivos	17
6	Materiales y métodos	18
6.1	Animales	18
6.2	Inducción de ACAID <i>in vivo</i> vía inyección en la cámara anterior del ojo	18
6.3	Lesión del nervio óptico	19
6.4	Cuantificación de la expresión de Foxp3 y citocinas en el bazo y nervio óptico	19
6.5	Análisis estadístico	21
7	Resultados	22
8	Discusión	27
9	Conclusión	30
10	Bibliografía	31

1 Resumen

Recientemente nuestro grupo de trabajo ha mostrado que la inducción de desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del ojo (ACAID) a antígenos neurales (AgN) previo a una lesión en el nervio óptico favorece la supervivencia de las células ganglionares de la retina (CGR). Este efecto es mediado, al menos en parte, por el incremento en las citocinas anti-inflamatorias en la retina en etapas tempranas después de la lesión. Con el fin de explicar el mecanismo mediante el cual la inducción de ACAID a AgN modula la respuesta inflamatoria y favorece la supervivencia de las CGR, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la expresión del factor de transcripción con dominio “forkhead” (Foxp3) en bazo y nervio óptico de ratas con lesión por compresión. Los resultados obtenidos muestran que: 1) la lesión incrementa la expresión de Foxp3 en el bazo y en el nervio óptico de ratas a los 7 y 14 días postlesión en comparación con animales naive ($F_{(2,9)}=21.02$, $p<0.001$ y $F_{(2,9)}=51.57$, $p<0.01$, respectivamente). La inducción de ACAID a AgN incrementa la expresión de Foxp3 en bazo en respuesta al reto con AgN en comparación con el grupo inoculado en cámara anterior con vehículo ($t_{(7)}=3.443$, $p<0.01$). Por otra parte, la inducción de ACAID a AgN no incrementa la expresión de Foxp3 en el bazo a los 7 días postlesión en comparación con el grupo vehículo, ni en el nervio óptico a los 2 días postlesión. Sin embargo, la inducción de ACAID a AgN regula a la alta la expresión de las citocinas anti-inflamatorias IL-6 ($t_{(6)}=4.48$, $p<0.001$), IL-10 ($W_{(6)}=8.5$, $p<0.05$) y TGF- β ($t_{(6)}=2.72$, $p<0.05$), y disminuye la expresión de IL-1 β ($t_{(6)}=4.87$, $p<0.01$) y TNF- α ($t_{(6)}=3.47$, $p<0.01$) a los 2 días postlesión en el sitio del daño. En conjunto, los resultados sugieren que el efecto neuroprotector y la atenuación de la respuesta inflamatoria inducida por la inoculación de AgN previo a una lesión en el nervio óptico no está mediado por cambios en la expresión de Foxp3 en el sitio del daño ni en el bazo. No obstante, los resultados confirman y extienden los hallazgos de trabajos previos realizados en la retina de ratas inmutotolerantes a AgN, al documentar el incremento en la expresión de citocinas anti-inflamatorias y el decremento de las citocinas pro-inflamatorias en el nervio óptico de ratas inoculadas con AgN previo a la lesión por compresión.

Palabras clave: Foxp3, neuroantígenos, inflamación, ACAID, citocinas

2. Abstract

The present work evaluated the expression of the transcription factor with forkhead domain (Foxp3). Recently, we have demonstrated that the induction of anterior chamber associated immune deviation (ACAID) to neural antigens (AgN) prior to optic nerve crush injury favors retinal ganglion cell (CGR) survival. This effect is mediated, at least in part, by increased anti-inflammatory cytokines in the retina at early stages after the injury. To explain the mechanism by which the induction of ACAID to AgN modulates the inflammatory response and favors CGR survival, the present work evaluated the expression the forkhead box transcription factor (Foxp3) in the spleen and optic nerve of rats with crush lesion. The obtained results show that: 1) the lesion increases Foxp3 expression in the spleen and optic nerve of rats at 7 and 14 days post-lesion compared to naive rats ($F_{(2,9)}=21.02$, $p<0.001$ and $F_{(2,9)}=51.57$, $p<0.01$, respectively). The induction of ACAID to AgN also increases Foxp3 expression in the spleen in response to AgN challenge compared to the group inoculated with vehicle ($t_{(7)}=3.44$, $p<0.01$). On the other hand, immune tolerance to AgN does not increase Foxp3 expression in the spleen at 7 days post-lesion in comparison with the vehicle group, nor in the optic nerve at 2 days post-lesion. However, immune tolerance to AgN up-regulates the expression of anti-inflammatory cytokines IL-6 ($t_{(6)}=4.48$, $p<0.001$), IL-10 ($W_{(6)}=8.5$, $p<0.05$) and TGF- β ($t_{(6)}=2.72$, $p<0.05$) and decreases the expression of IL-1 β ($t_{(6)}=4.87$, $p<0.01$) and TNF- α ($t_{(6)}=3.47$, $p<0.01$) at 2 days post-injury in the damaged site. The results suggest that the neuroprotective effect and the attenuation of the inflammatory response induced by AgN inoculation prior to optic nerve injury is not mediated by changes in Foxp3 expression at the site of damage or in the spleen. Nevertheless, the results confirm and extend the findings of previous studies done in rats immunotolerant to AgN by documenting the increase in the expression of anti-inflammatory cytokines and the decrease of pro-inflammatory cytokines in the optic nerve of rats inoculated with AgN prior to crush injury.

2 Introducción

Un gran número de enfermedades degenerativas (p. ej. esclerosis múltiple y artritis reumatoide) y lesiones traumáticas cursan con inflamación crónica, debido en parte al rompimiento de la tolerancia sistémica para uno o varios auto-antígenos (Wekerle y Sun 2010, Schwartz y Baruch 2014, Jones 2014). Una forma eficiente de restaurar la tolerancia inmunológica para auto-antígenos y disminuir los procesos inflamatorios crónicos asociados al reconocimiento antigénico es a través de la inducción de linfocitos T reguladores (Tregs) específicos de antígeno mediante un proceso conocido como desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del ojo (ACAID, por sus siglas en inglés). Varios trabajos apoyan esta propuesta al documentar que la inducción de ACAID es una estrategia eficiente para evitar o aliviar los síntomas de enfermedades tipo neurodegenerativas en modelos experimentales (p. ej., encefalitis experimental autoinmune: Bhowmick *et al.*, 2011, Farooq *et al.*, 2014 y uveitis experimental autoinmune: Hsu *et al.*, 2014). Recientemente nuestro grupo de trabajo ha documentado que la inducción de ACAID para un coctel de antígenos neurales (AgN) previa a una lesión traumática, favorece la protección tisular (*i.e.*, mantiene la supervivencia de las células ganglionares de la retina, CGRs) debido en parte al incremento en la expresión de mediadores anti-inflamatorios en la retina en etapas tempranas después de la lesión (Martínez-Alcantar *et al.*, en revisión). Debido a que en estas etapas no fue posible documentar la participación de Tregs que expliquen el incremento en la expresión de citocinas anti-inflamatorias en la retina, el presente proyecto tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inoculación de AgN en la cámara anterior del ojo sobre la expresión del factor de transcripción con dominio “forkhead” (Foxp3) y algunas citocinas en el bazo (órgano linfoide clave en la inducción de Tregs) y en el nervio óptico (sitio del trauma) en ratas con lesión por compresión. Los resultados obtenidos en el presente proyecto contribuirán a elucidar el mecanismo mediante el cual la inoculación de AgN regula la inflamación y protege al tejido nervioso después de una lesión traumática.

3 Antecedentes

La inflamación subyace a una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos extremadamente complejos e igualmente fascinantes, que además tienen un papel fundamental en la fisiología de los mamíferos (Kumar y Robbins 2003). Muchos de los componentes de la inflamación se han encontrado en todos los vertebrados, y algunas formas de respuesta de adaptación a condiciones adversas (incluyendo infección y lesión) se producen en todos los animales. Sin embargo, debido a que la inflamación exacerbada podría comprometer la función de los tejidos de los vertebrados, existen mecanismos capaces de proporcionar una protección especializada para controlar la respuesta inmunológica (Medzhitov 2008). Uno de estos tejidos es el ojo, el cual ha desarrollado a lo largo de la evolución un privilegio que lo protege de los efectos de una inflamación exacerbada.

3.1 Inmunoprivilegio ocular

Todos los órganos y tejidos de un organismo pueden verse amenazados por patógenos o daño tisular. Para la piel, mucosas y órganos internos como el corazón, riñón y músculo, esta amenaza a la homeostasis es directa, diversa y constante (Streilen 2003), por lo que la inflamación es similar y resuelta eficientemente. Sin embargo, algunos órganos del cuerpo como el ojo, los testículos y el útero grávido, presentan características anatómicas, bioquímicas y fisiológicas diferentes (Niederkon 2006). Esta condición, conocida genéricamente como inmunoprivilegio, es una adaptación evolutiva que protege a estos órganos de las consecuencias deletéreas que podría ocasionar la respuesta inflamatoria exacerbada y por tanto comprometer su función (Streilen 2003). En el caso particular del ojo, una de las características anatómicas que le confieren este inmunoprivilegio es que carece de vasos linfáticos que drenen directamente la córnea y la esclerótica (Niederkon 2002). Adicionalmente, el ojo reside detrás de barreras particularmente fuertes de tejido formadas por uniones estrechas de células endoteliales y otras especializaciones estructurales, como el tejido pigmentario retiniano (Van Hove 2016). Estas barreras reducen la probabilidad de que los patógenos transmi-

tidos por la sangre puedan tener acceso al ojo pero no son absolutas, y algunos patógenos pueden vencerlas y causar infecciones (Prager *et al.*, 2017). Este hecho indica que el ojo, al igual que cualquier otro órgano del cuerpo, es incapaz de llevar a cabo su función sin ser defendido por la inmunidad innata y adaptativa.

El inmunoprivilegio ocular es mantenido además por factores solubles presentes en el humor acuoso de la cámara anterior (D' Orazio *et al.*, 1999, Streilen 2003). El humor acuoso contiene proteínas anti-inflamatorias solubles y factores inmunosupresores capaces de inhibir la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), la cual es una forma de inflamación mediada por el sistema inmunológico que puede infligir extensos daños colaterales a tejido y células sanas (Taylor 2007). Aunque se han reportado al menos cuatro factores capaces de inhibir la DTH en el ojo: TGF- β , α - MSH (α -melanocyte stimulating hormone), péptido vasoactivo intestinal y calcitonina (Nieder Korn 2009), TGF- β 2 se identificó como el principal factor que confiere actividad inductora de tolerancia (Takekuchi *et al.*, 1998). Las células corneales también producen una enzima intracelular, la dioxigenasa de indolamina que cataboliza triptófano - un aminoácido vital para la supervivencia de los linfocitos T (Ryu 2007). El humor acuoso también contiene factores solubles que suprimen el sistema inmunológico innato, como el factor de 10 kDa que induce apoptosis de células NK, macrófagos y neutrófilos (D' Orazio *et al.*, 1999). Otro componente de la respuesta inmunológica innata, es la activación de la cascada del complemento que induce potentes quimio-atrayentes que reclutan y activan granulocitos. A su vez, los granulocitos producen una variedad de proteasas y especies reactivas de oxígeno que pueden causar lesiones extensas al tejido. El humor acuoso es el encargado de inactivar la cascada del complemento y proteger el ojo de esta forma de inflamación mediante proteínas reguladoras del complemento como CD46, CD55 y CD59 (Goslings *et al.*, 1997, Sohn *et al.*, 2003).

Además de los factores inmunomoduladores solubles, las células parenquimatosas oculares de la córnea y el epitelio pigmentario retiniano expresan el receptor de muerte CD95 que induce apoptosis de las células inflamatorias por medio del ligando Fas (Ferguson y Griffith 2006). Adicionalmente, múltiples células en el ra-

tón y el ojo humano expresan el ligando de muerte programado 1, otro promotor de la apoptosis de linfocitos T efectores (Yang *et al.*, 2009).

De la información anterior se hace patente que para que sea apropiada, la respuesta inmunológica debe neutralizar y eliminar eficazmente a los patógenos, reduciendo al mínimo la lesión de tejido sano (Medzhitov 2008). Esto se vuelve más crítico en los órganos inmunoprivilegiados como el ojo y el cerebro, donde el daño por una respuesta inflamatoria no controlada puede ser potencialmente alto (Tatagiba 1997).

El eje visual del ojo (el cual involucra la retina, el nervio óptico, el tálamo, los colículos superiores y la corteza visual) es extremadamente delicado y susceptible al daño y a las distorsiones provocadas por la inflamación. Además, todas las estructuras involucradas en el eje visual son incapaces de regenerar, por lo que el daño producido por la inflamación podría llevar a la pérdida de células vitales oculares e inevitablemente causar ceguera (Keirstead *et al.*, 1985). Así, el inmunoprivilegio del ojo proporciona protección contra antígenos que ponen en riesgo la integridad de la visión, al seleccionar una gama limitada de los mecanismos inmunoefectores y presentar una respuesta inflamatoria atenuada (Streilen 2003).

3.2. Desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del ojo (ACAID)

La ACAID se ha definido como una forma de tolerancia inmunológica en la cual la respuesta inmunológica es desviada hacia una forma tolerogénica para proteger el ojo del daño exacerbado de la respuesta inflamatoria (Niederhorn y Streilein, 2010). Este fenómeno se ha atribuido al efecto de TGF- β sobre las células presentadoras de antígenos (APC) presentes en la cámara anterior. La presentación de antígenos en el bazo vía ACAID tiene como resultado el incremento de Tregs específicos de antígeno (Farooq y Ashour 2013). ACAID comienza cuando un antígeno es inyectado en la cámara anterior del ojo. Este evento induce de manera sistémica y específica, la disminución de la respuesta DTH específica para el antígeno inyectado, lo que se ha asociado con la disminución de IFN- γ y el aumento de la producción de IL-4 por linfocitos T de los ganglios linfáticos drenantes (Kosiewicz y Streilen 1998). En ACAID, la evidencia circunstancial ha sugerido que

la principal señal inmuno-moduladora depende de las APC F480+ que residen en el ojo (Wilbanks y Streilen 1991, Li *et al.*, 2005). Después de la exposición al antígeno, estas APC entran en la circulación y migran al bazo donde inducen Tregs CD4+ y CD8+ que tienen la capacidad de regular negativamente una respuesta periférica de DTH (Cone *et al.*, 2010). La figura 1 muestra una representación esquemática del mecanismo de inducción de la ACAID.

Las Tregs inducidas en este sistema pueden regular a la baja la respuesta de DTH en ratones pre-sensibilizados, así como prevenir la respuesta de DTH en ratones naive (Kosiewicz 2004).

La inducción de la ACAID sigue tres procesos en diferentes órganos:

Fase ocular

Como se menciona anteriormente, los antígenos introducidos en la cámara anterior inician la inducción de ACAID cuando son capturados por las APC F4/80+, bajo la influencia de las citocinas en el humor acuoso. Las APC oculares regulan a la baja la IL-12 y sobre regulan IL-10. Después de capturar el antígeno, las APC oculares también comienzan a reclutar macrófagos, a través de la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-2), y dentro de las 72 horas siguientes entran en el torrente sanguíneo y migran al timo y el bazo por medio de la malla trabecular (Nieder Korn 2009).

Fase tímica

La inducción de ACAID requiere un timo intacto, que es una fuente importante de NKT, células necesarias para la fase esplénica de ACAID (Wang *et al.*, 2001). Dentro de las 72 horas siguientes a la salida de la cámara anterior, las APC inducen la generación de una población única de células CD4-CD8-NK1.1+. Las células NKT derivadas del timo dependen del receptor CD-1d y sólo se generan si las APC oculares expresan CD-1d en su superficie (Wang *et al.*, 1997). Las células NKT tímicas migran desde el timo hasta el bazo dentro de los 4 días posteriores a la inyección del antígeno en la cámara anterior (Sonoda *et al.*, 2001).

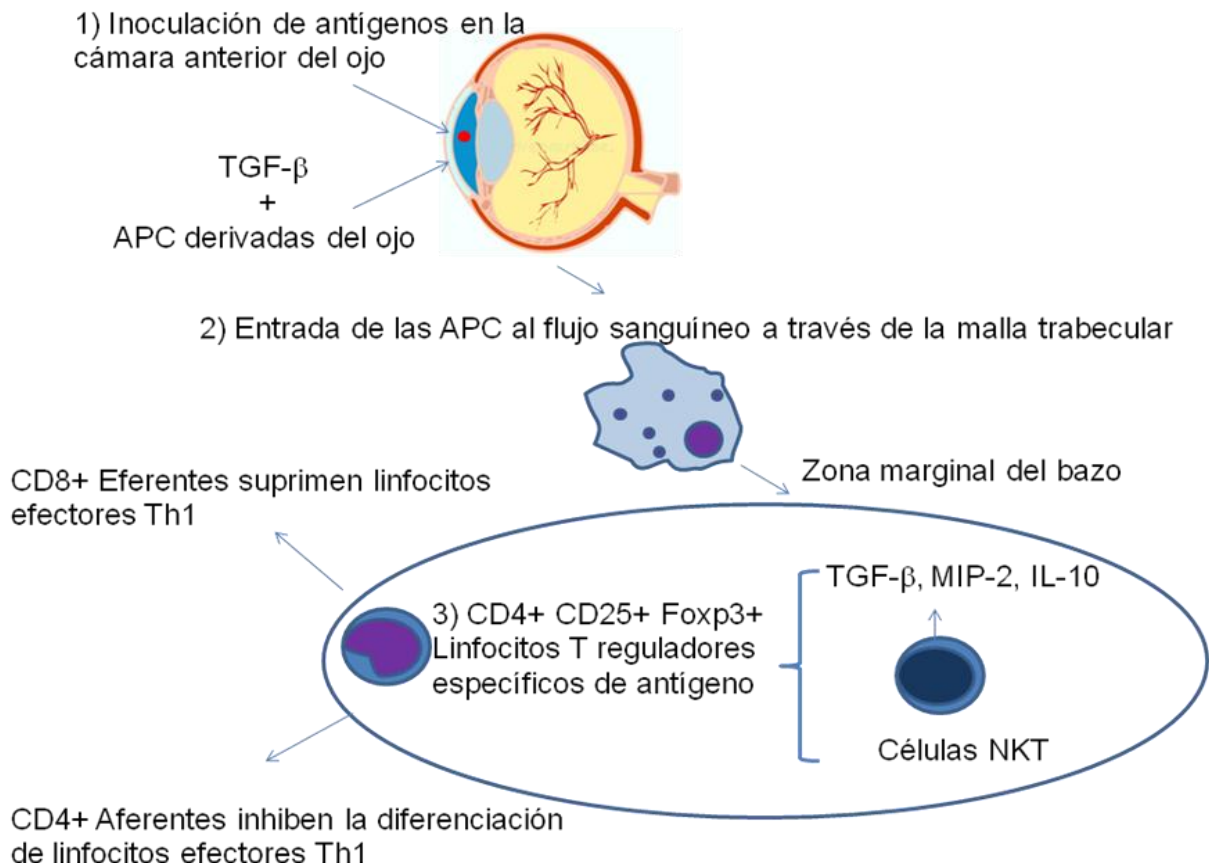


Figura 1. Desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del ojo (ACAID). Se ilustran los órganos involucrados en la inducción de ACAID: ojo, timo y bazo, así como los eventos e interacciones celulares propuestos para la inducción de inmunotolerancia. 1) Los antígenos inoculados en la cámara anterior son reconocidos por las células presentadoras de antígenos (APC) que responden al factor de crecimiento transformante (TGF- β) y a otros factores solubles. 2) Migración de las APC a la circulación periférica a través de la malla trabecular. 3) Ingreso de las APC a la zona marginal del bazo donde interactúan con los linfocitos T natural killer (NKT), los cuales inducen la liberación de TGF- β , de la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-2 e interleucina (IL)-10, cuya función es inducir la diferenciación de los linfocitos T reguladores específicos de antígeno CD4+ aferentes y CD8+ eferentes (Modificado de Hori, 2008).

Fase esplénica

Las APC portadoras de antígeno derivadas del ojo secretan las proteínas MIP-2 o CXCL2 en la zona marginal del bazo, las cuales a su vez reclutan a células NKT; juntas, las APC y las NKT crean clusters multicelulares y un microambiente rico en citocinas anti-inflamatorias como TGF- β e IL-10 (Sonoda *et al.*, 2001). En estos clusters también interactúan las células B de la zona marginal (D'Orazio y Niederkorn 2001) y las células T $\gamma\delta$ esplénicas que son esenciales para la inducción de ACAID (Ashour y Niederkorn 2006). Eventualmente, de estos clusters emergen los Tregs CD4+CD25+FoxP3+ aferentes (los cuales suprimen la activación inicial y diferenciación de linfocitos T naive en Th1 efectores) y CD8+ eferentes encargados de inhibir la expresión de la inmunidad mediada por Th1. Mientras los Tregs aferentes actúan en los órganos linfoides secundarios, los Tregs eferentes actúan en la periferia, incluyendo el ojo (Streilen 2003). Además, los Tregs eferentes tienen un papel indispensable en el mantenimiento de la inmunotolerancia a antígenos propios y en la supresión de respuestas inmunológicas perjudiciales para el huésped (Ashour y Niederkorn 2006, Biros 2008, Roncarolo y Battaglia 2007, Streilein 2003).

Es importante mencionar el papel del sistema nervioso simpático en la inducción de ACAID. Aunque en sí mismo este sistema no parece ser indispensable para la generación de APC oculares, el ojo, el bazo y el timo tienen inervaciones simpáticas densas y la simpatectomía química impide la generación de las células CD4 + NKT. Este hecho sugiere que se requiere un sistema nervioso simpático funcional para inducir ACAID (Niederkorn 2009).

3.3 ACAID y la modulación de la inflamación

Los macrófagos son células de la respuesta inmunológica innata que se originan en la médula ósea. Una de sus principales funciones es la presentación de antígenos a los linfocitos T CD4+ y CD8+ para iniciar la respuesta inmunológica adaptativa específica de antígeno (Lavin y Merat 2013). Estas células además tienen un papel importante durante la respuesta inflamatoria en el proceso de reparación de tejidos dañados y regulan una gran variedad de procesos fisiológicos

para mantener la homeostasis, como: remoción de células muertas, fagocitosis de patógenos y activación de la matriz extracelular para apoyar la re-vascularización y re-epitelización tisular (Hesketh *et al.*, 2017). Estas APC desarrollan un fenotipo M1 presente en las fases tempranas del daño en respuesta a estímulos como IFN- γ y el polisacárido de la pared bacteriana, induciendo la producción de citocinas (p.ej., TNF- α , IL-1 β e IL-6) y favoreciendo la fase aguda de la inflamación (Coursey *et al.*, 2012, Martínez 2008). Por otra parte, los macrófagos M2 tienen un perfil anti-inflamatorio, regulan algunos mecanismos de reparación y son inducidos por interleucinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10 (Jetten *et al.*, 2014). Estas últimas interleucinas inducen la expresión de Arginasa 1, marcador característico de macrófagos M2 (Yu *et al.*, 2012).

Las APC tolerogénicas provenientes de la inducción de ACAID se clasifican dentro del fenotipo M2, ya que expresan arginasa 1 (Yu *et al.*, 2012) y se han propuesto como un tratamiento terapéutico potencial en condiciones autoinmunes mediadas por linfocitos T auto-reactivos (Kosiewicz 2014).

Se ha sugerido que los Tregs CD4+ aferentes y CD8+ eferentes difieren en términos de desarrollo, especificidad y mecanismos efectores. Hasta el momento, se han descrito Tregs CD4+ de origen natural, los cuales se generan durante las etapas tempranas del desarrollo fetal en el timo; y los inducidos en la periferia, los cuales se desarrollan a partir de linfocitos T maduros en los tejidos periféricos. Estos últimos se inducen bajo ciertas condiciones de estimulación específica de antígeno, tales como concentraciones sub-óptimas y/o co-estimulación del antígeno. Este subconjunto de Tregs ejerce su función supresora a través de la secreción de IL-10 y TGF- β (Beissert y Schwartz 2007, Bluestone y Abbas 2003). Por su parte, los Tregs CD8+ juegan un papel predominante en la restauración de la homeostasis de sitios inmunoprivilegiados (Nieder Korn 2008). A diferencia de los Tregs CD4+, los CD8+ no se producen naturalmente, pero pueden ser inducidos por el procesamiento e interacción de antígenos con las APC F4/80+. Esta interacción ocurre al inocular antígenos en la cámara anterior del ojo mediante ACAID (Biros 2008; Nieder Korn 2008; Bhowmick *et al.*, 2011; Peterson 2012).

3.4 Autoinmunidad contra antígenos neurales

Un gran espectro de enfermedades degenerativas está asociado con inflamación crónica. Tal es el caso de patologías neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica y las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, así como las secuelas de lesiones traumáticas al cerebro, médula espinal o nervio óptico (Bhowmick *et al.*, 2011; Farooq *et al.*, 2014). En principio, la inflamación es un mecanismo homeostático que se dispara para: 1) eliminar los patógenos invasores o restos celulares provenientes de muerte celular y 2) promover la reparación tisular y la angiogénesis. Sin embargo, una inflamación crónica no resuelta, puede evitar la reparación del tejido y extender la lesión hacia zonas aledañas sanas. La inflamación crónica puede ser el resultado de inadecuados mecanismos de regulación y de la persistencia de proteínas antigénicas derivadas del tejido lesionado. En conjunto, estos mecanismos conducen al establecimiento de una respuesta autoinmune contra los propios constituyentes celulares que ahora son reconocidos como antígenos. Esta respuesta de autoinmunidad es básicamente mediada por células del sistema inmunológico adaptativo (Bhowmick *et al.*, 2011; Harrison y Hafler, 2000).

Los linfocitos T representan la rama celular del sistema inmunológico adaptativo. Si una célula T reconoce y responde a un auto-antígeno se dice que es auto-reactiva (Yoles *et al.*, 2001). Aún cuando la mayoría de los linfocitos T auto-reactivos son eliminados en el timo durante el desarrollo inmunológico, un número pequeño de ellos puede persistir a través de toda la vida (Kumar y Robinns 2003). De estas células, algunas pueden responder a proteínas derivadas del SNC. En condiciones basales, es poco probable que estos linfocitos reconozcan y reaccionen contra las proteínas derivadas del SNC debido a numerosos mecanismos de control propios de este sistema (Schwartz y Kipnis 2002). Entre estos mecanismos se encuentra la barrera hemato-neural que protege y aísla al SNC, así como células residentes que atacan e inducen apoptosis en los linfocitos auto-reactivos que logran ingresar (Yoles *et al.*, 2001). Sin embargo, después de una lesión traumática al SNC, la barrera que lo protege se rompe permitiendo el ingreso masivo de

linfocitos T. Estas células en el tejido nervioso se enfrentan con cantidades incrementadas de proteínas con capacidad de producir antigenicidad y se vuelven auto-reactivas (Schwartz y Baruch 2014). A su vez, estos linfocitos T auto-reactivos interactúan con los B, los cuales comienzan a sintetizar anticuerpos específicos para proteínas neurales entre los días 7-14 después de la estimulación antigénica (Ankeny *et al.*, 2006). En principio, el SNC lesionado activa mecanismos apoptóticos orientados a bloquear el reconocimiento de epítopes críticos evitando la auto-inmunidad. Sin embargo, después de una lesión traumática, los umbrales de activación de linfocitos T y B son rebasados, y se desarrolla una autoinmunidad capaz de extender el daño masivamente (Ankeny *et al.*, 2006). Adicionalmente, algunas investigaciones revelan que órganos como el cerebro, el ojo y la placenta, son incapaces de regular la inflamación eficientemente después de una lesión, debido en parte a su incapacidad para reclutar Tregs específicas de antígeno (Streilein 2003).

Hasta el momento un repertorio de antígenos derivados del SNC ha sido descrito, aun cuando se predice que existen más cuya identidad es desconocida (Ankeny *et al.*, 2006). Recientemente, nuestro de trabajo ha evaluado el potencial de diferentes fracciones proteicas derivadas de médula espinal para inducir una respuesta antigénica mediada por linfocitos Th1. Para ello, el protocolo optimizado por Gil-Dones (2009) fue realizado. De acuerdo con este protocolo, es posible separar tres fracciones proteicas: 1) Fracción enriquecida en proteínas citosólicas (solubles), la cual incluye además en menor medida proteínas secretadas, membranales y organelares; 2) Fracción enriquecida en proteínas membranales, y 3) Fracción de restos celulares, la cual incluye fragmentos incapaces de homogeneizar, ácidos nucleicos, entre otros detritos. Cada una de estas fracciones fue utilizada para inducir una respuesta de DHT en ratas sanas. Los resultados muestran que todas las fracciones son antigénicas, capaces de inducir inflamación mediada por linfocitos Th1. Sin embargo, también muestran que únicamente la fracción citosólica fue capaz de inducir una respuesta neuroprotectora (descrita más adelante). Por ello, a lo largo de este trabajo al hablar de AgN siempre nos referiremos a

la fracción citosólica de proteínas derivadas de extracto de médula espinal, a menos que se indique lo contrario.

3.5 Fisiopatología de la lesión por compresión del nervio óptico

El nervio óptico es parte del SNC y no puede regenerarse cuando es dañado por traumatismo, isquemia o procesos neurodegenerativos, en parte debido a un ambiente inflamatorio poco propicio para la supervivencia de las CGR (Chun y Cestari 2017) y los oligodendrocitos. El daño al nervio óptico induce activación microglial, esto a su vez genera el reclutamiento de leucocitos al área lesionada. Las moléculas liberadas por la microglia reactiva, el impacto mecánico en sí mismo o ambos, pueden causar la permeabilización de la barrera hemato-neural, que a su vez permite que células sanguíneas periféricas se infiltren en respuesta a los quimioatrayentes derivados del SNC e invadan el sitio de la lesión (Finsen *et al.*, 2011). Las principales células del sistema inmunológico que llegan al sitio de la lesión son los neutrófilos y macrófagos (Kurimoto *et al.*, 2013, Kyritsis *et al.*, 2013).

La infiltración de leucocitos se desencadena por varios factores como la liberación de componentes intracelulares de células dañadas y la generación de especies reactivas de oxígeno (Finsen *et al.*, 2011). Estos eventos iniciales desencadenan la liberación de varias citocinas al tejido dañado, que a su vez atraen a más leucocitos (Kyritsis *et al.*, 2014) y favorecen la hiperreactividad de las células gliales. En conjunto, la muerte oligodendroglial en el sitio del daño y la hiperreactividad de los astrocitos exponen proteínas como la glicoproteína asociada a mielina, el inhibidor de crecimiento de neuritas-A y la glicoproteína oligodendrocítica de mielina, las cuales actúan como moléculas inhibidoras de la regeneración axonal (Pernet y Schwab 2014). Algunas de estas proteínas además actúan como auto-antígenos induciendo células T auto-reactivas, lo que genera una respuesta inflamatoria exacerbada (Yoles *et al.*, 2001). El daño secundario es mediado principalmente por la respuesta inmunológica, hasta el día 7 hay una expresión a la alza de genes relacionados con la neuroinflamación como CD68 (marcador de microglia y macrófagos), TNF- α , proteína ácida glial fibrilar (GFAP) y óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), entre otros (Masahiro *et al.*, 2015).

En la lesión traumática medular se han identificado dos períodos de inflamación con infiltración de distintas poblaciones de leucocitos: la fase temprana de la respuesta inflamatoria (los primeros 10 días después de la lesión) comprende la infiltración de neutrófilos, microglia y macrófagos, y células T. Cada población de células alcanza su abundancia máxima en diferentes puntos de tiempo: 1 día, 7 días y 9 días después de la lesión, respectivamente. La segunda fase de inflamación inicia 2 semanas después de la lesión, alcanza un máximo a los 2 meses y permanece detectable hasta 6 meses después de la lesión para los tres subgrupos de células inflamatorias antes mencionadas (Beck *et al.*, 2010).

El modelo de lesión por compresión del nervio óptico tiene como objetivo emular la patología humana y estudiar el efecto de tratamientos potenciales. Este método presenta varias ventajas ante otros modelos, entre las que se encuentran: 1) la recuperación de los animales es muy rápida; 2) el daño afecta a toda la población de las CGR (Sánchez *et al.*, 2016); y 3) el curso temporal de la degeneración de las CGR está bien establecido (Agudo-Barriuso *et al.*, 2008). En este modelo, la degeneración es aparente dentro de los primeros treinta minutos y continúa por varios días e incluso meses postlesión (Knöferle *et al.*, 2010, Qu y Jakobs 2013). Así, se sabe que después de una compresión moderada se pierden alrededor del 50% de las CGRs a la semana post-lesión, y que esta pérdida incrementa al 70-75% a las dos semanas después de la compresión.

3.6 Desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del ojo como estrategia neuroprotectora

En la información anterior es patente que la respuesta inflamatoria no contenida desencadena cascadas degenerativas después de una lesión del SNC. En este contexto, nuestro grupo de investigación ha propuesto que una estrategia para restablecer la tolerancia perdida después de una lesión al SNC y evitar la degeneración secundaria es la inducción de ACAID con AgN (Toscano-Tejeida *et al.*, 2016). Recientemente, el potencial neuroprotector de esta estrategia ha sido evaluado en la lesión traumática de la médula espinal (Pineda-Rodriguez *et al.*, 2017) y en la lesión por compresión del nervio óptico (Martínez-Alcantar *et al.*, en

revisión). Ambos trabajos han reportado un efecto neuroprotector sobre las neuronas motoras y las CGR, respectivamente; así como un incremento en la expresión de citocinas anti-inflamatorias en médula espinal y retina (IL-10, TGF- β , Pineda-Rodríguez *et al.*, 2017 e IL4, IL6, IL10 y TGF- β , Martínez-Alcantar *et al.*, en revisión) tanto en etapas tempranas después de la lesión (2 y 7 días, Martínez-Alcantar *et al.*, en revisión) como en etapas tardías (1 año postlesión, Pineda-Rodríguez *et al.*, 2017). En un intento por asociar esta regulación de la inflamación en el sitio del daño con los Tregs característicos de la inducción de ACAID, la expresión del marcador Foxp3 fue evaluada en médula espinal y retina. Los resultados muestran que la expresión de Foxp3 está incrementada en médula espinal al año postlesión (Pineda-Rodríguez *et al.*, 2017) y a los 7 días en la retina después del daño del nervio óptico pero no a los 2 días postlesión (Martínez-Alcantar *et al.*, en revisión).

La dinámica de la lesión explica en parte estos resultados. En primer lugar, la presentación antigénica y el incremento en el número de linfocitos T específicos de antígeno en el sitio del daño comienza al día 6 postlesión y alcanza su nivel máximo alrededor del día 9 (Raposo *et al.*, 2014). Así, sería esperable que las poblaciones de Tregs eferentes CD8+ comenzaran a ejercer sus efectos regulatorios de la inflamación en los puntos máximos de actividad de los linfocitos, en la segunda ronda de inflamación alrededor del día 7 postlesión. Por su parte, las Tregs aferentes CD4+ podrían ejercer sus efectos directamente a nivel del bazo, nódulos linfáticos o en la periferia, como ha sido demostrado recientemente (Keino *et al.*, 2018). Esta dinámica de respuesta neuroinmunológica podría explicar por qué no encontramos cambios en los niveles de expresión de Foxp3 en la retina temprano después de la lesión pero sí en etapas más tardías. Sin embargo, no explica el efecto neuroprotector de ACAID ni la atenuación de la inflamación a los 2 días postlesión.

Debido a que la lesión traumática fue realizada en el nervio óptico, es posible que los cambios en esta región ocurran en periodos temporales diferentes de aquéllos que ocurren en la retina, ya que los procesos neurodegenerativos entre las dos estructuras están desfasados en el tiempo (Sánchez-Migallón *et al.*, 2016, Chun y

Cestari 2017). Alternativamente, es posible que la inoculación de AgN en la cámara anterior no induzca un incremento en los Tregs o que las poblaciones no actúen *in situ*, sino en órganos linfoides secundarios. Hasta el momento no ha sido reportada la secuencia temporal de expresión de Foxp3 después de una lesión traumática en el sitio del daño ni en órganos linfoides, y tampoco se ha caracterizado la expresión de Foxp3 y las citocinas anti-inflamatorias que participan en su inducción en el bazo de ratas inmunotolerantes a AgN ni después de una lesión en estas ratas. En este contexto, en un intento por entender el mecanismo mediante el cual la inoculación de AgN en la cámara anterior favorece la supervivencia de las CGR, este trabajo evaluó en primer lugar la dinámica de la expresión de Foxp3 en el bazo y nervio óptico de animales con lesión por compresión durante los días 7 y 14 postlesión. En segundo lugar, se caracterizó la expresión de Foxp3 y de algunas citocinas anti-inflamatorias en el bazo de animales inoculados en la cámara anterior con AgN durante el punto máximo de inflamación en respuesta al reto (48 horas). También se evaluó la expresión de FoxP3 en el bazo de animales inmunotolerantes a AgN a los 7 días postlesión del nervio óptico. Finalmente, se evaluó el efecto de la inoculación de AgN en la cámara anterior del ojo sobre la respuesta inflamatoria en nervio óptico a las 48 horas después de la lesión.

4 Hipótesis

La inoculación de antígenos neurales en la cámara anterior del ojo incrementa la expresión de Foxp3 en el bazo y en el sitio del daño en etapas tempranas después de la lesión por compresión del nervio óptico en ratas.

5 Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de la inoculación de antígenos neurales en la cámara anterior del ojo sobre la expresión de Foxp3 en ratas con lesión del nervio óptico.

Objetivos particulares

- 1) Caracterizar la expresión de Foxp3 en bazo y nervio óptico en ratas con lesión por compresión.
- 2) Caracterizar la expresión de Foxp3 y citocinas anti-inflamatorias en el bazo de ratas inoculadas en la cámara anterior con antígenos neurales.
- 3) Evaluar el efecto de la inoculación de antígenos neurales en la cámara anterior del ojo sobre la expresión de Foxp3 y citocinas anti-inflamatorias en bazo de ratas con lesión en el nervio óptico.
- 4) Evaluar el efecto de la inoculación de antígenos neurales en la cámara anterior del ojo sobre la expresión de Foxp3 y citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en el nervio óptico de ratas con lesión por compresión.

6 Materiales y métodos

6.1 Animales

Se trabajó con ratas hembra de la cepa Wistar de 100 y 250 gramos de masa corporal provenientes del bioterio del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH. Las ratas fueron mantenidas en un ciclo luz-oscuridad (12-12) con acceso *ad libitum* a agua y alimento. El cuidado de los animales se realizó por personal especializado del bioterio. El trabajo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) N° de oficio: INV/B/RGC/184/17.

6.2 Inducción de ACAID *in vivo* vía inyección en la cámara anterior del ojo

Veintiún ratas juveniles de cuatro semanas de edad fueron anestesiadas sistémicamente mediante la inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (70 mg/kg de peso corporal) y xilacina (7.5 mg/kg de peso corporal), y ungüento oftálmico de paracaína como anestésico local. Las ratas fueron inoculadas en la cámara anterior de ambos ojos con 10 μ l de vehículo (buffer de fosfatos 0.1 M, PBS, n=10) o AgN (n=11) previamente obtenidos de tejido medular sano de ratas adultas de la misma cepa (60 μ g/ μ l. Talavera-Carrillo, 2015; Martínez-Alcantar *et al.*, *en revisión*). Los ojos de las ratas fueron protegidos de la desecación durante toda la cirugía y el periodo postoperatorio con solución salina al 0.9%.

La inducción de la inmunotolerancia sistémica a AgN se evaluó mediante la prueba de DTH. Para la fase de inmunización, siete días después de la inoculación se inyectaron intradérmicamente 200 μ l de AgN (1.25 μ g/ μ l) en la región interescapular previamente rasurada de las ratas, bajo anestesia. Para esta fase, los AgN fueron emulsionados 1:1 con adyuvante completo de Freund. En la fase de reto, catorce días después de la inoculación en ojos, se inyectaron 10 μ l de AgN (50 μ g/ μ l) en la oreja izquierda bajo anestesia. La oreja derecha fue inoculada únicamente con PBS. Previo a la inyección, así como a las 24 y 48 horas posteriores, se midió el grosor de las orejas. El valor inicial fue considerado como línea base, y

la medida de inflamación fue calculada sustrayendo la línea base del valor obtenido por día, delta (Δ) de inflamación (Talavera-Carrillo 2015).

6.3 Lesión del nervio óptico

Para realizar la lesión del nervio óptico, a las ratas se les permitió alcanzar los 250 gr. de masa corporal y entonces fueron profundamente anestesiadas y sometidas a una cantotomía para exponer el nervio óptico, el cual fue comprimido a 3 mm del globo ocular durante 5 segundos con pinzas de auto-cierre (Walsh *et al.*, 2014). Los ojos de las ratas lesionadas fueron protegidos con lubricante y antibióticos. Como cuidados post operatorios, las ratas recibieron analgésico oral (TEMPRA® pediátrico 12.12 mg/kg de peso corporal) diariamente hasta un día antes del sacrificio.

6.4 Cuantificación de la expresión de Foxp3 y citocinas en el bazo y nervio óptico

Para medir los niveles de expresión en nervio y bazo después de la lesión por compresión se extrajeron: 1) ambos tejidos de ratas con lesión por compresión a los 7 (n=4) y 14 (n=4) días después de la lesión y de animales naive (n=4); 2) bazo a las 48 después del reto en animales inoculados en la cámara anterior con PBS (n=4) y AgN (n=5); 3) bazo de ratas inoculadas con PBS (n=4) y AgN (n=5) y sometidas a lesión por compresión; 4) nervio óptico de ratas inoculadas con PBS (n=4) y AgN (n=5) a las 48 horas post-compresión. En todos los casos las ratas fueron anestesiadas con dosis terminal de pentobarbital sódico y los tejidos fueron disecados y congelados a -80° C hasta su posterior uso. La extracción de RNA se llevó a cabo con TRizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo al protocolo del fabricante. Posteriormente el producto obtenido se analizó para corroborar la pureza e integridad. Para la síntesis de cDNA se utilizó 1 μ g de la muestra de RNA 46°C 20 min, 95° C 1 min (iScript Adv cDNA Kit RT-qPCR cat# 172-5038 BIO-RAD). Finalmente, para cuantificar la expresión de citocinas se utilizó una concentración de 250 ng/ μ l de cDNA con las condiciones: 95°C 3 min., 40 ciclos 95 °C 30 segundos para la separación de hebras, 60°C 30 segundos para la fase de alineación.

ción de oligonucleótidos y 72° C 30 segundos para la polimerización con el estuche So advanced universal SYBR Green supermix (BIO-RAD) en el termociclador CFX96 BIORAD. Los resultados fueron analizados calculando la expresión relativa con respecto al gen constitutivo GAPDH mediante el método $\Delta\Delta CT$. El criterio para considerar significancia en la expresión de RNAm entre los grupos fue una expresión de al menos el doble del transcrito (Qu y Jacobs, 2013). Las secuencias de oligonucleótidos se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos

Gen	Secuencia	Tm
TNF- α	Forward: 5'-TGGCGTGTTCATCCGTTCTCTACC-3' Reverse: 5'-CCCGCAATCAGGCCACTACTT-3'	62°C
IL-1 β	Forward: 5'-TGAGGCTGACAGACCCCAAAGAT-3' Reverse: 5'-GCTCCACGGGCAAGACATAGGTAG-3'	60°C
IL-6	Forward: 5'-AGCCAATGCCTTCCCTACTTCA-3' Reverse: 5'-GCCATTGCACAACCTCTTTTCTCA-3'	59°C
IL-10	Forward: 5'CAGACCCACATGCTCCGAGA3' Reverse: 5'CAAGGCTTGGCAACCCAAGTA3'	60°C
TGF- β	Forward: 5'-CTCAACACCTGCACAGCTCC-3' Reverse: 5'-ACGATCATGTTGGACAACCTGCT-3'	60°C
FoxP3	Forward: 5'-TGAGCTGGCTGCAATTCTGG-3' Reverse: 5'-ATCTAGCTGCTCTGCATGAGGTGA-3'	60°C
GAPDH	Forward: 5'-CACGGCAAGTTCAACGGCACAGT-3' Reverse: 5'-TCAGCGGAAGGGGCGGAGAT-3'	62°C

¹Bai et al., 2012; ²Zhang et al., 2013; ³Chao et al., 2014; ⁴Roque et al., 2016.

6.5 Análisis estadístico

Los resultados de los grupos evaluados fueron comparados mediante una prueba t de Student (PBS vs. AgN) o ANOVA de una vía (Naive vs. 7 días postlesión vs. 14 días postlesión) seguida de la prueba *posthoc* de Tukey. Las comparaciones entre dos grupos cuyos datos no siguieron una distribución normal se realizaron con la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico R (R Core Team, 2015).

7 Resultados

La expresión de Foxp3 incrementa en bazo y nervio óptico en respuesta a la lesión

Para determinar si existe un mecanismo intrínseco de regulación mediado por los Tregs después de una lesión por compresión en el nervio óptico, se evaluó la expresión de Foxp3 en ratas naive y a los 7 y 14 días post-lesión tanto en el órgano linfóide clave para su inducción (bazo) como en el sitio de la lesión. Los resultados muestran que los niveles de expresión de Foxp3 en ambas estructuras se incrementan en respuesta a la lesión (bazo: $F_{(2,9)}=21.02$ $p<0.001$. Figura 2A; nervio óptico: $F_{(2,9)}=51.57$, $p<0.01$. Figura 2B). Las comparaciones *post hoc* con la prueba Tukey muestran que la expresión basal de Foxp3 en el bazo no es diferente de la observada a los 7 días postlesión del nervio óptico, pero incrementa significativamente a los 14 días después de la lesión (Naive vs. 14 días y 7 días vs. 14 días, $p<0.01$ en cada caso. Figura 2A). Por su parte, los niveles de Foxp3 en el nervio óptico de ratas naive son indetectables, y su expresión se incrementa significativamente a los 7 y 14 días postlesión. La comparación *post hoc* con la prueba Tukey muestra que existen diferencias entre el grupo de ratas naive y los grupos de 7 ($p<0.05$) y 14 días ($p<0.001$) postlesión, así como entre los grupos lesionados ($p<0.001$. Figura 2B).

La inoculación de antígenos neurales en la cámara anterior del ojo atenúa la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado e incrementa la expresión de Foxp3 en bazo

Se evaluó la capacidad de los AgN para atenuar la inflamación en la prueba de DTH. Los resultados obtenidos muestran que el grupo inoculado con AgN en la cámara anterior del ojo presentó una inflamación atenuada en la prueba de DTH con respecto al grupo control inoculado con PBS ($t_{(10)}=2.502$, $p<0.05$. Figura 3A). A continuación, se caracterizó la expresión de Foxp3 así como de las citocinas TGF- β e IL-10 en el bazo de ratas inoculadas en la cámara anterior del ojo con PBS y AgN. Los resultados muestran que la inoculación de AgN incrementó la expresión

de Foxp3 ($t_{(7)}=3.443$, $p<0.01$. Figura 3B) e IL-10 ($t_{(7)}=3.053$, $p<0.05$. Figura 3C), pero no modificó la expresión de TGF- β (Figura 3D).

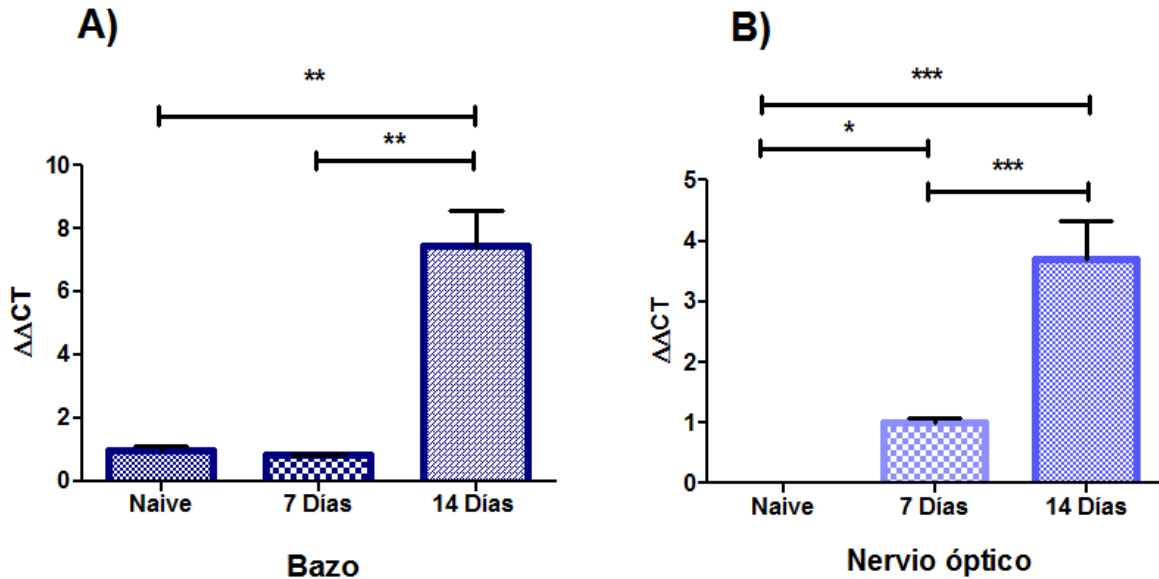


Figura 2. Niveles de expresión de Foxp3 en bazo y nervio óptico en ratas con lesión por compresión. Las gráficas muestran la expresión relativa del mRNA de Foxp3 en ratas en condiciones basales (naive) y con lesión del nervio óptico a los 7 (n=4) y 14 días postlesión (n=4) en bazo (A) y nervio óptico (B). La expresión del mRNA de Foxp3 en cada grupo se grafica en relación al mRNA de GAPDH. Se grafican promedios \pm EEM. Tukey *post hoc*, * $p\leq 0.05$, ** $p\leq 0.01$; *** $p<0.001$.

La inoculación de antígenos neurales en la cámara anterior del ojo no modifica la expresión de Foxp3 ni de las citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β en el bazo de animales con lesión del nervio óptico

Con el fin de determinar si la inoculación de AgN en la cámara anterior del ojo promueve el incremento de Tregs en el bazo de animales con lesión del nervio óptico en etapas tempranas después de la lesión, se cuantificó la expresión de Foxp3 y las citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β al día 7 postlesión. Los resultados muestran que la inoculación de AgN en el ojo no modifica la expresión de ningún mRNA en comparación con el grupo control (Figura 4).

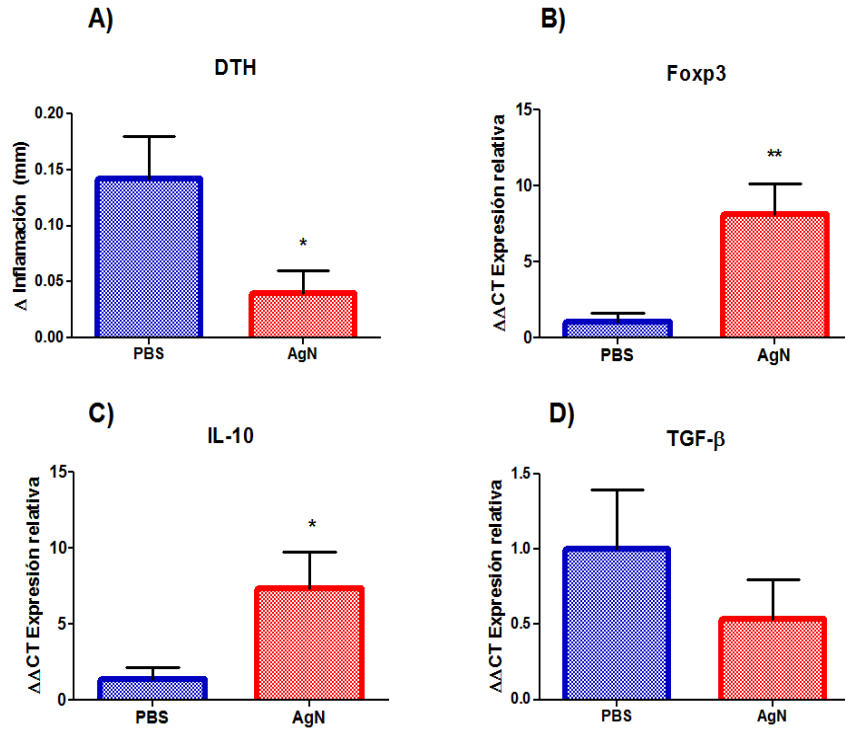


Figura 3. Respuesta inflamatoria en la prueba de hipersensibilidad de tipo retardado y expresión de Foxp3 y citocinas en bazo de animales inoculados en la cámara anterior con antígenos neurales. Las gráficas presentan la diferencia (Δ) de inflamación en oreja (medida en mm mediante la prueba de hipersensibilidad de tipo retardado) en animales inoculados en cámara anterior con buffer de fosfatos (PBS, n=6) o antígenos neurales (AgN, n=6. A) y la expresión relativa del mRNA de Foxp3 (B), IL-10 (C) y TGF- β (D) en el bazo de ratas inoculadas con PBS (n=4) y con AgN (n=5) a las 48 horas después del reto en oreja (durante la máxima respuesta inflamatoria). La expresión del mRNA objetivo se grafica en relación al mRNA de GAPDH. Se grafican promedios \pm EEM. *p \leq 0.05; **p \leq 0.01.

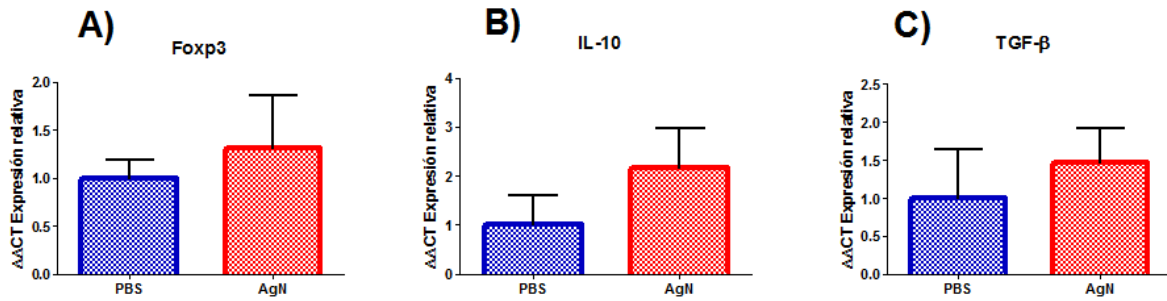


Figura 4. Niveles de expresión de Foxp3 y citocinas en el bazo de ratas inoculadas con antígenos neurales en la cámara anterior y sometidas a lesión por compresión. Las gráficas muestran la expresión de Foxp3 (A) y de las citocinas anti-inflamatorias IL-10 (B) y TGF- β (C) en el bazo de ratas inoculadas en el ojo con buffer de fosfatos (PBS, n= 4) y antígenos neurales AgN (n=5) a los siete días postlesión del nervio óptico. La expresión del mRNA objetivo se grafica en relación al mRNA de GAPDH. Se grafican promedios \pm EEM.

La inoculación de antígenos neurales en la cámara anterior del ojo atenúa la respuesta de inflamatoria en el nervio óptico temprano después de la lesión por compresión

Finalmente, se evaluó el efecto de la inoculación de AgN en la cámara anterior del ojo sobre la inflamación local en ratas con lesión en el nervio óptico. Los resultados muestran que la inoculación de AgN previo a una lesión por compresión no promueve un incremento significativo en la expresión de Foxp3 en el sitio del daño (Figura 5A), pero sí incrementa la expresión de las citocinas anti-inflamatorias IL-6 ($t_{(6)}=4.48$, $p<0.001$. Figura 5B), IL-10 ($W_{(6)}=8.5$, $p<0.05$. Figura 5C) y TGF- β ($t_{(6)}=2.72$, $p<0.05$. Figura 5D), y disminuye la expresión de IL-1 β ($t_{(6)}=4.87$, $p<0.01$. Figura 5E) y TNF- α ($t_{(6)}=3.47$ $p<0.01$. Figura 5F).

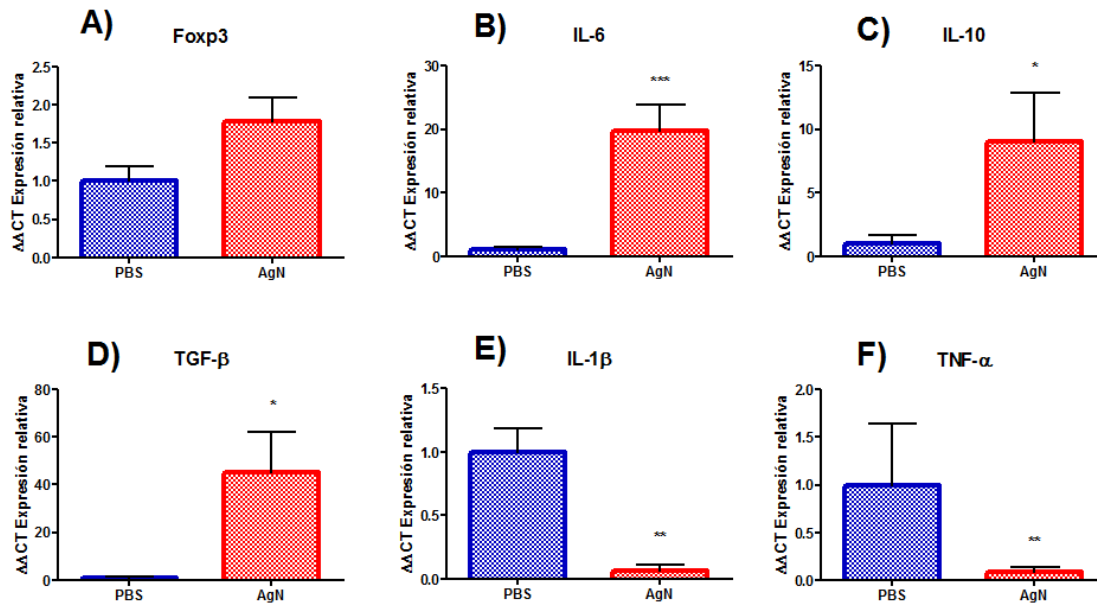


Figura 5. Niveles de expresión de Fcpx3 y citocinas en el nervio óptico de ratas inoculadas con antígenos neurales en la cámara anterior y sometidas a lesión por compresión. Las gráficas muestran la expresión de Fcpx3 (A) y de las citocinas anti-inflamatorias IL-6 (B), IL-10 (C) y TGF- β (D) y pro-inflamatorias IL-1 β (E) y TNF- α (F) en el nervio óptico a las 48 horas después de la lesión en ratas inoculadas con buffer de fosfatos (PBS, n=4) y antígenos neurales (AgN, n=4). La expresión del mRNA objetivo se expresa en relación al mRNA de GAPDH. Se grafican promedios \pm EEM. * $p \leq 0.05$.; ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$.

8 Discusión

Con el fin de explicar el mecanismo mediante el cual la inducción de ACAID a AgN modula la respuesta inflamatoria y favorece la supervivencia de las CGR, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la expresión de Foxp3 en el bazo y el nervio óptico de ratas con lesión por compresión. Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que el efecto neuroprotector temprano (supervivencia de las CGR) y la atenuación de la respuesta inflamatoria en la retina a los 2 días postlesión inducida por la inoculación de AgN, no están mediados por cambios en la expresión de Foxp3 en el sitio del daño ni en el bazo. Sin embargo, los resultados del presente trabajo confirman y extienden los hallazgos de trabajos previos al documentar el incremento en la expresión de citocinas anti-inflamatorias y el decremento de las citocinas pro-inflamatorias en el nervio óptico de ratas inoculadas con AgN previo a la lesión por compresión.

Hasta el momento no ha sido descrita la secuencia temporal de reclutamiento de Tregs en el nervio óptico en respuesta a una lesión por compresión en ratas. En este contexto, en el presente trabajo evaluamos la expresión de Foxp3, factor de transcripción expresado por las Tregs (Keino *et al.*, 2006), en el bazo y nervio óptico de animales con lesión por compresión a los 7 y 14 días postlesión. Los resultados obtenidos muestran que existe una correlación entre los niveles máximos de expresión de Foxp3 en ambas estructuras, los cuales se alcanzan hasta los 14 días postlesión del nervio óptico. De acuerdo con la literatura, Foxp3 mantiene una expresión basal en el bazo de ratas sin lesión (Chen *et al.*, 2003). Nuestros resultados muestran que en esta estructura al día 7 después de la lesión la expresión de Foxp3 se mantiene igual a la basal. Sin embargo, incrementa notablemente a los 14 días postlesión. Por su parte, los resultados muestran que en el nervio óptico la expresión basal es indetectable, misma que incrementa a los 7 días postlesión y alcanza su máximo a los 14 días después de la compresión. Estos resultados son congruentes con trabajos previos que muestran que la segunda ronda de inflamación después de una lesión traumática, disparada principalmente por linfocitos T efectores en respuesta a auto-antígenos, alcanza su máxima respuesta después del día 9 postlesión (Raposo *et al.*, 2014). Así, es congruente que

la producción de Tregs en bazo se incrementa entre los días 7 y 14 postlesión y empieza a ser obvia su presencia en el nervio óptico hasta entonces.

La inyección de antígenos en la cámara anterior del ojo genera tolerancia inmunológica sistémica hacia AgN, medida mediante la capacidad para atenuar la respuesta de inflamación Th1 en la prueba de DTH y mediante la expresión incrementada de Foxp3 e IL-10 en el bazo de las ratas inoculadas en cámara anterior con estos antígenos, en comparación con el grupo control. Sin embargo, la nula diferencia observada en TGF- β sugiere que más estudios deberán ser realizados, pues este factor de transcripción es clave para la inducción de Tregs en bazo (D´Orazio & Niederkorn 1998, Kosiewicz *et al.*, 1998, Takekuchi *et al.*, 1997).

Con el objetivo de determinar si la inducción de ACAID con AgN incrementa la expresión de Foxp3 en el bazo de animales después de la lesión del nervio óptico, los bazos de animales inmunotolerantes fueron evaluados al día 7 postlesión. Los resultados muestran que la inmunotolerancia a AgN no incrementa la expresión de Foxp3 en el bazo de animales con lesión del nervio óptico, en comparación con el grupo control. Este resultado es paradójico, pues actualmente sabemos que 7 días postlesión del nervio óptico los niveles de expresión de Foxp3 se encuentran incrementados en la retina de animales inmunotolerantes a AgN (Martínez-Alcántar, *et al.*, en revisión). Es probable que una vez inducida la ACAID, los linfocitos Tregs proliferen en los nódulos linfáticos que reciben información del ojo (*i.e.*, cervicales. Negi y Das 2017, Walsh *et al.*, 2014) o cambien de fenotipo *in situ* en el sitio de lesión, como ha sido reportado previamente (Biros 2008, Niederkorn 2008).

Con respecto al nervio óptico, los resultados del presente trabajo muestran que la inducción de ACAID con AgN incrementa la expresión de citocinas antiinflamatorias (IL-6, IL-10 y TGF- β) y decrecienta la expresión de las proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α) a las 48 post lesión. Sin embargo, Foxp3 no presenta cambios. Estos resultados apoyan aquéllos obtenidos en la retina por nuestro grupo de trabajo durante las etapas tempranas después de la lesión (2 días postlesión) en animales inmunotolerantes a AgN (Martínez-Alcántar, *et al.*, en revisión).

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que si bien ACAID a AgN es capaz de inducir inmunotolerancia e incrementar la producción de Tregs específicos de antígeno, este hecho no logra incrementar significativamente su producción en el bazo, órgano clave en su inducción, en respuesta al daño del nervio óptico. Debido a que tampoco fue identificada la expresión de Foxp3 en retina y nervio óptico a las 48 horas postlesión, los resultados sugieren que los Tregs Foxp3+ provenientes de otros órganos linfoides no son producidos en respuesta al daño o no logran llegar a los sitios de lesión en esta etapa temprana. Trabajos recientes sugieren que algunos de los cambios producidos por los linfocitos T efectores no ocurren *in situ* en los sitios lesionados, sino en las meninges (Raposo *et al.*, 2014). El hecho que la inoculación de AgN en la cámara anterior favorezca la supervivencia de las CGR, así como la atenuación de la inflamación en el sitio del daño (nervio óptico) y retina sugiere que las Tregs pueden ejercer sus efectos también a este nivel. Trabajos posteriores deberán evaluar la expresión de Foxp3 en nódulos linfáticos cervicales y verificar su presencia en meninges.

9 Conclusión

La inoculación de AgN en la cámara anterior del ojo atenúa la inflamación en el sitio del daño de ratas después de una lesión por compresión del nervio óptico. La dinámica de la expresión de Foxp3 en el bazo de ratas naive y con lesión del nervio óptico nos permite afirmar que esta regulación del ambiente inflamatorio no está relacionada con el incremento en la producción de linfocitos Tregs en el bazo de las ratas inmunotolerantes a AgN.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman y extienden hallazgos previos obtenidos por nuestro grupo. En conjunto, los resultados obtenidos ayudan a entender mejor los mecanismos que la inducción de ACAID con AgN echa a andar para favorecer la preservación de las CGR después de la lesión del nervio óptico, y confirman el potencial de esta estrategia inmunomoduladora para proteger al tejido nervioso después de una lesión traumática.

10 Bibliografía

- Agudo, M., Pérez-Marín, M. C., Lönnngren, U., Sobrado, P., Conesa, A., Cánovas, I., Vidal-Sanz, M. (2008). Time course profiling of the retinal transcriptome after optic nerve transection and optic nerve crush. *Molecular Vision*, (14): 1050–1063.
- Ankeny, D.P., Lucin, K. M., Sander, 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. *The Journal of Neurochemistry*, (4): 1073–87
- Ashour, H. M., & Niederkorn, J.,Y. (2006). T Cells Promote Anterior Chamber Associated Immune Deviation and Immune Privilege through Their Production of IL-10. *The Journal of Immunology*,(177): 8331–8337.
- Beck, K. D., Nguyen, H. X., Galvan, M. D., Salazar, D. L., Woodruff, T. M., & Anderson, A. J. (2010). Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain*, 133(2): 433–447.
- Beissert, S., Schwartz, A., & Schwartz, T. (2006). Regulatory T cells. *The Journal of Investigation Dermatology*, (126): 15–24.
- Bhowmick, S., Clark,, R., Brocke S. & Cone, R. (2011). Antigen-specific splenic CD4+ and CD81 regulatory T cells generated via the eye, suppress Experimental Autoimmune Encephalomyelitis either at the priming or at the effector phase. *International Immunology*, 23(2): 119-128.
- Biro, D. (2008). Anterior chamber-associated immune deviation. *Vet Clin Small Animals* (38): 309–21.
- Bluestone, J.A., & Abbas, K. A. (2003) Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature Review of Immunology*, (3): 253–257.

- Coursey, T. G., Chen, P. W., & Niederkorn, J. Y. (2012). IFN- γ -independent intraocular tumor rejection is mediated by a macrophage-dependent process that leaves the eye intact. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(5): 939–950.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., Wahl, S. M. (2003). Conversion of Peripheral CD4⁺CD25⁻ naïve T Cells to CD4⁺CD25⁺Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor *Foxp3*. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12): 1875–1886.
- Chun, B., & Cestari, D. M. (2017). Advances in experimental optic nerve regeneration. *Current Opinion Ophthalmology*, 28(6): 558-563.
- Delves, P. J., Seamus, J. M., Burton Dennis, R., & Roitt, I. M. (2006). *Essential Immunology*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Dimitrijević, M., Aleksić, I., Vujić, V., Stanojević, S., Pilipović, I., von Hörsten, S., & Leposavić, G. (2014). Peritoneal exudate cells from long-lived rats exhibit increased IL-10/IL-1 β expression ratio and preserved NO/urea ratio following LPS-stimulation in vitro. *Age*, 36(4): 9696.
- D'Orazio, T. J., DeMarco, B. M., Mayhew, E. S., & Niederkorn. (1999). Effect of aqueous humor on apoptosis of inflammatory cell types. *Investigative Ophthalmology & Visual Sciences*, 40(7): 1418-1426.
- D'Orazio, T., Mayhew, E. & Niederkorn, J. (1998). A Novel Role for TGF- β and IL-10 in the Induction of Immune Privilege. *The Journal of Immunology*, 160 (5) 2089-2098.
- D'Orazio, T., Mayhew, E. & Niederkorn, J. (2001). Ocular Immune Privilege Promoted by the Presentation of Peptide on Tolerogenic B Cells in the Spleen. II. Evidence for Presentation by Qa-1. *The Journal of Immunology*, 166(1): 26-32.
- Farooq, S. M.; & Ashour, H. M. (2013). Eye-Mediated Induction of Specific Immune Tolerance to Encephalitogenic Antigens. *CNS Neuroscience &*

Therapeutics, 19(7): 503-510.

- Farooq, S. M.; & Ashour, H. M. (2014). *In vitro*-induced cell-mediated immune deviation to encephalitogenic antigens. *Brain, Behavior, and Immunity*, 35(1): 64-69.
- Ferguson, T., & Griffith, T. (2006). A vision of cell death: Fas ligand and immune privilege 10 years later. *Immunological Reviews*, 213(1): 228-238.
- Finsen, B., & Owens, T. (2011). Innate immune responses in central nervous system inflammation. *FEBS letter*, (1): 3806-3812.
- García, H., Hernández, M.L., Gariglio, P. R., & Berumen J. (2002). Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. *immunology*, 105(2): 231-43.
- Goslings, W.R., Blom, D.J., & Waard-Siebinga I. (1996). Membrane-bound regulators of complement activation in uveal melanomas. CD46, CD55, and CD59 in uveal melanomas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 37(9): 1884–1891.
- Guerrero., A. R., Uchida, K., Nakajima, H., Watanabe, S., Nakamura, M., Johnson, W. E., & Baba, H. (2012). Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *Journal of Neuroinflammation*, (9): 40.
- Hara, Y., Caspi, R., Wiggert, R., Dorf, B., & Streilein, J.W. (1992). Analysis of an in vitro-generated signal that induces systemic immune deviation similar to that elicited by antigen injected into the anterior chamber of the eye. *The Journal of immunology*, 5(149): 1531-1538.

- Harrison, C. L., & Hafler, A. D. (2000). Antigen-specific therapy for autoimmune disease. *Current Opinion in Immunology*, (12): 704–711.
- Hesketh, M.; Sahin, K.B.; West, Z.E.; & Murray, R.Z. (2017). Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, (18): 1545.
- Hori J. (2008). Mechanisms of immune privilege in the anterior segment of the eye: what we learn from corneal transplantation. *Journal of ocular biology diseases & informatics*, 1(2-4): 94-100.
- Hu, X., Liu, G., Hou, Y., Shi, J., Zhu, L., Jin, D., & Zhao, Y. (2012). Induction of M2-like macrophages in recipient NOD-*scid* mice by allogeneic donor CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Cellular and Molecular Immunology*, 9(6): 464–472.
- Hugh, M. P., Thomas, J., Elizabeth, J. P., Odhran, S. S., John, J. K., & James, A. M. (2003). Injury Primes the Innate Immune System for Enhanced Toll-Like Receptor Reactivity. *The Journal of gy*, 171(3): 1473-1483.
- Hzu S. M., Mathew, R., Taylor, A.W., & Streilein, J. S. (2013). *Ex-vivo* tolerogenic F4/80+ antigen-presenting cells (APC) induce efferent CD8+ regulatory T cell-dependent suppression of experimental autoimmune uveitis. *Clinical & experimental immunology*, 176(1): 37-48.
- Jetten, N., Roumans, N., Gijbels, M. J., Romano, A., Post, M. J., de Winther, M. P. J., & Xanthoulea, S. (2014). Wound Administration of M2-Polarized Macrophages Does Not Improve Murine Cutaneous Healing Responses. *PLoS ONE*, 9(7).
- Jones, T. B. (2014). Lymphocytes and autoimmunity after spinal cord injury. *Experimental Neurology*. (258): 78-90.
- Keino, H., Horie, S., & Sugita, S. (2018). Immune Privilege and Eye-Derived T-Regulatory Cells. *Journal of Immunology Research*, 1679(197): 1-12.
- Keino, H., Horie., Takeuchi, M., Kezuka, T., Hattori, T., Usui, M., Taguchi., O., & Streilein, J. (2006). Induction of Eye-Derived Tolerance Does Not De-

pend on Naturally Occurring CD4⁺CD25⁺ T Regulatory Cells. *Investigative Ophthalmology of Visual Sciences*, 47(3): 1047-1055.

- Keirstead, S., Vidal-Sanz, M., Rasminsky, M., Aguayo, A., Levesque, M. & So, K. (2017). Responses to light of retinal neurons regenerating axons into peripheral nerve grafts in the rat. *Brain research*, 359 (2): 402-406.
- Kevin, D., Beck, H. X., Nguyen, Galvan, D. M., Desirée, L. S., Trent, M. W., & Anderson, J. A. (2010) Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment, *Brain*, 133(2): 433–447.
- Kezuka, T., & Streilein, W. J. (2000). In Vitro Generation of Regulatory CD8⁺ T Cells Similar to those Found in Mice with Anterior Chamber–Associated Immune Deviation. *Investigative Ophthalmology & Visual Sciences*, 41(7): 1803-1811.
- Kigerl, K. A., de Rivero Vaccari, J. P., Dietrich, W. D., Popovich, P. G., & Keane, R. W. (2014). Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Experimental Neurology*, (258): 5–16.
- Kipnis, J., Mizrahi, T., Hauben, E., Shaked, I., Shevach, E., & Schwartz, M. (2002). Neuroprotective autoimmunity: naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24): 15620-15625.
- Knöferle, J., Koch, J. C., Ostendorf, T., Michel, U., Planchamp, V., Vutova, P., Lingor, P. (2010). Mechanisms of acute axonal degeneration in the optic nerve in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13): 6064–6069.
- Kokaia Z., Martino G., Schwartz M., y Lindvall O. (2012). Cross-talk between neural stemcells and immune cells: the key to better brain repair?. *Nature neuroscience*, 15(8): 1078-87.

- Kosiewicz, M. M., Pascale, A. & Streilein, W. J. (1998). Alterations in Cytokine Production Following Intraocular Injection of Soluble Protein Antigen: Impairment in IFN- γ and Induction of TGF- β and IL-4 Production. *Journal of Immunology*, 161(10): 5382-5390.
- Kumar, V., Cotran, R. S., & Robbins, S. L. (2003). Basic Pathology. Saunders.
- Kurimoto, T., Yin, Y., Habboub, G., Gilbert, H.-Y., Li, Y., Nakao, S., Benowitz, L. I. (2013). Neutrophils Express Oncomodulin and Promote Optic Nerve Regeneration. *The Journal of Neuroscience*, 33(37): 14816–14824.
- Kyritsis, N., C. Kizil., & Brand, M. (2014). Neuroinflammation and central nervous system regeneration in vertebrate. *Trends in Cell Biology*, 24(2): 128 –135.
- Lavin, Y., & Merad, M. (2013). Macrophages: Gatekeepers of Tissue Integrity. *Cancer Immunology Research*, 1(4): 201–209.
- Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., Hohlbaum, A. M., Beaudette, Britte C., Shlomchik, Mark J., & Marshak, R. A. (2002). Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Tolllike receptors. *Nature*, 416 (6881): 603–607.
- Li, X., D'orazio, T. & Niederkorn, J. (1996). Role of Th1 and Th2 cells in anterior chamber-associated immune deviation. *Immunology*, 89(1): 34-40.
- Lin, H.H., Faunce, D.E., Stacey, M., Terajewicz A., Nakamura T., & Zhang-H. J. (2005). The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, 201(10): 1615–25.
- Martínez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., & Locati M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience*, 1(13): 453-61.

- Martínez-Alcantar. Inmunotolerancia específica a antígenos neurales como estrategia neuroprotectora en ratas con traumatismo espinal. En preparación.

mechanisms by which transforming growth factor- β 2 alters antigen-presenting abilities of macrophages on T cell activation. *European Journal of Immunology*, (27): 1648.

- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. (454): 428-435.
- Meeker, N. D., & Trede, N., S. (2008). Immunology and zebrafish: Spawning new models of human disease. *Developmental & Comparative Immunology*, 7(32): 745-757.
- Negi, M. & Das, K.B. (2017). CNS: Not an immunoprivileged site anymore but a virtual secondary lymphoid organ. *International Reviews of Immunology*, 37(1):57-68.
- Niederkorn, J.Y. (2002). Immune privilege in the anterior chamber of the eye. *Critical Reviews in Immunology*, (22): 13–46.
- Niederkorn, J.Y. (2006). See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nature Immunology*, 7(4): 354–359.
- Niederkorn, J.Y. (2009). Role of NKT cells in anterior chamber-associated immune deviation. *Expert Review of Clinical Immunology*, 5(2): 137-144.
- Pelayo, G. A. L., Talavera, C. D. K., Martínez, A. L., Secundino, J. M., Pineda, S. J. U., Fuentes, F. A. L., & Meléndez H. E. (2015). Inducción de inmunotolerancia sistémica como estrategia preventiva o terapéutica para trastornos degenerativos que cursan con inflamación crónica. *Acta Universitaria*, 25(NE-1): 39-43.
- Pineda, R. B., Toscano, T. D., García. V. E., Rodríguez, B. R., Flores, R. A., Castellanos, C. D., & Ibarra, A. (2017). Anterior chamber associated immune deviation used as a neuroprotective strategy in rats with spinal cord injury. *PLoS ONE*, 12(11).

- Prager, O., Friedman, A., & Nebenzahl, Y. M. (2017). Role of neural barriers in the pathogenesis and outcome of *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(3).
- Qu, J., & Jakobs, T. C. (2013). The Time Course of Gene Expression during Reactive Gliosis in the Optic Nerve. *PLoS ONE*, 8(6): e67094.
- Quintana, F. J., Iglesias, A. H., Farez, M. F., Caccamo, M., Burns, E. J., Kassam, N., & Weiner, H. L. (2010). Adaptive Autoimmunity and Foxp3-Based Immunoregulation in Zebrafish. *PLoS ONE*, 5(3).
- R Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Reynolds, A. D., Banerje, R., Liu, J., Gendelman, H. E., & Lee, M. R. (2007). Neuroprotective activities of CD4₊CD25₊ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease. *Journal of Leukocyte Biology*, (82): 1083.
- Reynolds, A. D., David, K. S., Hutter, A.L., Benner, J.E., Lee, M. R., & Gendelman, H. E. (2010). Regulatory T cells attenuate Th17 cell-mediated nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a model of Parkinson's disease. *Journal of Immunology*, 184(5): 2261–2271.
- Richard, A. P. 2012. Regulatory T-Cells: Diverse Phenotypes Integral to Immune Homeostasis and Suppression. *Toxicologic Pathology*, (40): 186-204.
- Rodriguez, P. B., Toscano, T. D., García, V. E, Rodriguez, B. R, Flores, R. A., Castellanos, C. D., Gutierrez, O. G., Castillo, C. L., Meléndez. E. H. (2017). Anterior chamber associated immune deviation used as a neuroprotective strategy in rats with spinal cord injury. *PLoS One*. 12(11).
- Roncarolo, M.G., & Battaglia, M. (2007). Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nature Review of Immunology*, (7): 585–98.

- Ryu, Y. H., & Kim, J.C. (2007). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human corneal cells as a local immunosuppressive factor. *Investigative Ophthalmology & Visual Sciences*, 48(9): 4148–4152.
- Saban, D. R., Cornelius, J., Masli, S., Schwartzkopff, J., Doyle, M., Chauhan, S. K., Grant, M. B. (2008). The role of ACAID and CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺regulatory T cells on CTL function against MHC alloantigens. *Molecular Vision*, (14), 2435–2442.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*, (133): 775–87.
- Sánchez, M. M. C., Valiente, S. F. J., Nadal-Nicolás, F. M., Vidal, S. M., Agudo, B. M. (2016). Apoptotic Retinal Ganglion Cell Death After Optic Nerve Transection or Crush in Mice: Delayed RGC Loss With BDNF or a Caspase 3 Inhibitor. *Investigative Ophthalmology & Visual Sciences*, 57(1): 81-93.
- Schwab, J.M., Zhang, Y., Kopp, M.A., Brommer, B., & Popovich, P.G. (2014). The paradox of chronic neuroinflammation, systemic immune suppression, autoimmunity after traumatic chronic spinal cord injury. *Experimental Neurology*, (258): 121–9.
- Schwartz, M. (2003). Optic nerve crush: protection and regeneration. *Brain Research Bulletin*, 62(2004): 467–471.
- Schwartz, M., & Kipnis, M. (2014). Breaking peripheral immune tolerance to CNS antigens in neurodegenerative diseases: Boosting autoimmunity to fight-off chronic neuroinflammation. *Journal of Autoimmunity*, (54): 8-14.
- Skelsey, M. E., Mayhew, E., & Niederkorn, J. (2003). CD25⁺, interleukin-10-producing CD4⁺ T cells are required for suppressor cell production and immune privilege in the anterior chamber of the eye. *Immunology*, 110(1): 18–29.
- Sohn, J., Bora, P., Suk, H., Molina, H., Kaplan, H. & Bora, N. (2003). Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells. *Nature Medicine*, 9(2): 206-212.

- Sonoda, K., H., Douglas, E. F., Masaru, T., Exley, M., Balk S. & Streilein J.S. (2001). NK T Cell-Derived IL-10 Is Essential for the Differentiation of Antigen-Specific T Regulatory Cells in Systemic Tolerance. *The Journal of Immunology*, (166): 42–50.
- Streilein, J.W. (2003). Ocular immune privilege:therapeutic opportunities from an experiment of nature, 3(11): 879-89.
- Takeuchi, M., Alard, P., Verbik, D., Ksander B. & Streilein, J. S. (1999). Anterior chamber-associated immune deviation-inducing cells activate T cells, and rescue them from antigen-induced apoptosis. *Immunology*, (98): 576-583.
- Takeuchi, M., M. M. Kosiewicz, P. Alard, and J. W. Streilein. 1997. On the
- Tatagiba, M., Brosamle, C. & Schwab, M. (1997). Regeneration of Injured Axons in the Adult Mammalian Central Nervous System. *Journal of Neuro-Ophthalmology*, 17(4): 283.
- Taylor, A. (2007). Ocular Immunosuppressive Microenvironment. *Immune Response and the Eye*, (71):-85.
- Toscano, D., Ibarra, A., Phillips, F. B., Fuentes, F. A. L., & Melendez, H. E. ACAID as a potential therapeutic approach to modulate inflammation in neurodegenerative diseases. En revision.
- Van Hove, I., Evy, L., Lies, D.G., Jurgen, S., Salinas, N. M., Libert, C., Libert, R. V., & Lieve M. (2016). MMP-3 Deficiency Alleviates Endotoxin-Induced Acute Inflammation in the Posterior Eye Segment. *International Journal of Molecular Sciences*, (17): 1825.
- Walsh, J. T., Zheng, J., Smirnov, I., Lorenz, U., Tung, K., & Kipnis, J. (2014). Regulatory T cells in central nervous system injury: A double-edged sword. *Journal of Immunology*, 193(10): 5013–5022.
- Wilbanks, G. A., Mammolenti, M. & Streilein, J. W.. 1992. Studies on the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). III. Induction of ACAID depends upon intraocular transforming growth factor-beta. *Europe Journal of Immunology*, (22): 165.

- Yang, W., Li, H., Chen, P., Alizadeh, H., Hogan, R., & Niederkorn, J. (2009). PD-L1 Expression on Human Ocular Cells and Its Possible Role in Regulating Immune-Mediated Ocular Inflammation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(1): 273.
- Yoles, E., Hauben, E, Palgi, O., Agranov, E., Gothilf, A., Cohen, A., Kuchroo, V., Cohen, I.R., Weiner, H. & Schwartz M. (2001). Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *Journal of Neuroscience*, 1;21(11): 3740-8.
- You, Z., Chunmei, L., Wenzheng, Z., Yubo, C., Jiajia, H., Zhao, Q. R., Zuo, Y. W. (2011). Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress: Involvement in depression. *Behavior brain research*, 225(1): 135-41.