



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SOBRE LOS
RECURSOS NATURALES**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DESVIACIÓN INMUNITARIA ASOCIADA A LA CÁMARA ANTERIOR DEL OJO
COMO ESTRATEGIA NEUROPROTECTORA EN RATAS CON LESIÓN DEL
NERVIO ÓPTICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN: RECURSOS BIÓTICOS**

PRESENTA

M.C. LORENA MARTÍNEZ ALCANTAR

ASESORAS: DRA. ALMA LILIA FUENTES FARÍAS

DRA. ESPERANZA MELÉNDEZ HERRERA



Morelia Michoacán, agosto del 2019

“The important thing in science is not so much to obtain new facts as to discover new way of thinking about them”

William Lawrence Bragg
Nobel laureate (Physics) 1915

Este trabajo está dedicado a:

A mi esposo Arnoldo por su amor, comprensión y apoyo.

A mis hijos Emilio y Pablo por ser mi principal motivación, gracias por
iluminarme con su sonrisa.

A mis padres José y Linda gracias por su amor, cariño y apoyo. Gracias por
tanto!

A mi hermano Pepé †, gracias por ser mi maestro de vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Gracias por mi formación académica. Ha sido un honor estudiar en esta universidad.

A mis asesoras

A las D.C Alma Lilia Fuentes Farías y Esperanza Meléndez Herrera por sus enseñanzas, asesorías y permitirme trabajar con ellas para lograr este proyecto en mi vida.

Al comité Sinodal

A los D.C Alejandra Ochoa Zarzosa, Jesús Campos García y Gabriel Gutiérrez Ospina, agradezco sus comentarios y sugerencias aportados al proyecto durante cada una de las evaluaciones semestrales y por la revisión de mi trabajo de tesis. Un especial agradecimiento a la D.C Ochoa y al D.C Campos por permitirme realizar parte del trabajo en sus laboratorios (CEMEB e IIQB, respectivamente) por sus consejos y apoyo en todo momento.

A las D.C Naima Lajud y Luz Torner del CIBIMI

Por permitirme trabajar en su laboratorio y sus aportaciones realizadas.

Personal del bioterio del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

M.V.Z Madeleine Hernández y al Sr. Efraín por el cuidado dado a los animales y consejos dados para su correcta manipulación.

A mis amigos del Laboratorio de ecofisiología animal

Diana, Migue, Abril y Jhony gracias por el tiempo, el entusiasmo, el trabajo, la alegría y la pasión puestos en cada uno de los experimentos. Su ayuda y su amistad son palpables en este trabajo.

A mis amigos del Laboratorio de Biotecnología microbiana

Sharel, Lau, Wicho, Ashanty, Pedro y Aide, gracias por sus consejos, apoyo y los buenos momentos.

A la familia López Alvarez

Especialmente a las abuelitas Imelda y Coyita por siempre estar presentes y pendientes de mis hijos, en los momentos en los que yo no puedo estarlo.

A mi amiga de toda la vida

M.C Diana Cecilia Maya Cortés, gracias por ser una inspiración, gracias por tu amistad y por siempre estar para mí.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por la beca otorgada que permitió mi manutención durante el desarrollo de este trabajo.

**Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y
Tecnología (CONACyT no. 180762 a EM-H y no. 258747 a AF-F)**

Índice

Lista de abreviaturas	9
1.- Resumen General	11
Abstract	13
2.- Introducción General	15
3.- Antecedentes	17
3.1.- Aspectos generales del sistema inmunológico	17
3.2 La retina y el nervio óptico como parte del sistema nervioso central	20
3.3.- Lesiones en el sistema nervioso central	22
3.4.- Actividad del sistema inmunológico en respuesta a las lesiones del sistema nervioso central	24
3.5.- Componentes del sistema nervioso central como antígenos neurales.	28
3.6.- Tolerancia inmunológica y linfocitos T reguladores	30
3.7.- Los linfocitos T reguladores tienen un efecto protector en modelos de neurodegeneración	33
3.8.- La desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo como una herramienta potencial para generar linfocitos T reguladores específicos de antígeno	35
4.- Justificación	39
5.- Hipótesis	41
6.- Objetivos	42

6.1.- Objetivo general	42
6.2.- Objetivos particulares	42
7.- Materiales y Métodos	43
7.1-Animales	43
7.2 Diseño experimental	43
7.3.- Inducción post-lesión de la tolerancia inmunológica mediante desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del ojo	45
7.4.- Lesión por compresión del nervio óptico	45
7.5.- Evaluación de la supervivencia de células ganglionares de la retina.	46
8. - Resultados	47
9.- Resultados adicionales	57
9.1.- Efecto de la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo inducida posterior a la lesión en el nervio óptico sobre la supervivencia de las células ganglionares de la retina.	57
10.- Discusión general	59
11.- Conclusión	70
12.- Anexo	71
12.1 ¿Qué nos protege de nuestro sistema inmunológico?	71
13.- Referencias	75

Lista de abreviaturas

Arg-1	Arginasa 1.
Bcl-2	Del inglés, B-cell lymphoma.
Bcl-6	Del inglés, B-cell lymphoma 6.
BCR	Receptor de linfocito B, del inglés B cell receptor.
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés brain-derived neuronal factor.
Brn3a	Del inglés, brain-specific homeobox/POU domain protein.
BSA	Albúmina de suero bovino
CA	Cámara anterior del ojo.
CAM	Componentes asociados a la membrana.
CC	Componentes citosólicos.
CGR	Células ganglionares de la retina.
CNPase	2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa, del inglés 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase
CPA	Célula presentadora de antígeno.
CRMP5	Colapsina, del inglés Collapsin Response Mediator Protein 5
DAMP	Patrones moleculares asociados a peligro, del inglés, damage-associated molecular pattern.
DIACA	Desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo.
DTH	Hipersensibilidad tipo retrasada, del inglés delayed type hypersensitivity.
EAE	Encefalomiелitis experimental autoinmune, del inglés experimental autoimmune encephalomyelitis.
Foxp3	Del inglés, forkhead box P3.
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
GM-CSF	Del inglés, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
HMGB1	Del inglés, high mobility group box 1.
HT	Homogenado total.
HLA	Antígenos leucocitarios humanos, del inglés human leukocyte antigen.
INF-γ	Interferon gamma.
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible, del inglés, inducible nitric oxide synthase.
iTregs	Linfocitos T reguladores inducibles.
M2	Macrófagos activados alternativamente.
MAG	Glicoproteína asociada a la mielina, del inglés myelin-associated glycoprotein.
MBP	Proteína básica de mielina, del inglés myelin basic protein

MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad, del inglés major histocompatibility complex
MIP-2	Del inglés, macrophage inflammatory protein 2.
MOG	Glicoproteína de oligodendrocitos de mielina, del inglés myelin oligodendrocyte glycoprotein.
NK	Del inglés, natural killer cell.
NO	Nervio óptico.
Nogo	Inhibidor de crecimiento de neuritas, del inglés neurite outgrowth inhibitor
nTregs	Linfocitos T reguladores naturales.
NT-3	Neurotrofina-3
NT-4	Neurotrofina-4
PLP	Proteína proteolipídica, del inglés myelin proteolipid protein
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones, del inglés, pattern recognition receptors.
RANTES	Del inglés, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted.
ROR-γT	Del inglés, Retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma.
SCH	Homogeneizado de la médula espinal
SNC	Sistema nervioso central.
SNP	Sistema nervioso periférico.
SOCS	Del inglés, Suppressor of cytokine signaling 1
STAT3	Del inglés, Signal transducer and activator of transcription 3.
T-bet	T-box transcription factor
TCR	Del inglés, T cell receptor.
Tfh	Linfocitos cooperadores foliculares, del inglés follicular B helper T cells.
TGF-β	Del inglés, Transforming growth factor beta.
Th	Linfocitos T cooperadores.
TNF-α	Del inglés, tumor necrosis factor alpha.
Treg	Linfocitos T reguladores.

1.- Resumen General

El sistema nervioso central (SNC) de mamíferos en edad adulta, tiene un pobre pronóstico de reparación después de una lesión traumática, el cual se debe, en parte, a una capacidad limitada de las células nerviosas para regenerar sus axones después de un traumatismo, pero sobre todo a un ambiente poco propicio para favorecer los procesos reparativos. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la tolerancia inmunológica a antígenos neurales como estrategia neuroprotectora en ratas con lesión del nervio óptico. En el presente trabajo se indujo tolerancia a componentes neurales (extraídos de la médula espinal) vía desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo (DIACA) con la finalidad de modular la respuesta inmunológica que se presenta posterior a una lesión en el SNC. Para inducir DIACA se seleccionaron tres fracciones de componentes neurales: HT (homogenado total), CC (componentes citosólicos) y CAM (componentes asociados a la membrana). El efecto neuroprotector de las diferentes fracciones de antígenos neurales se cuantificó mediante la supervivencia de las células ganglionares en la retina (CGR) inmunorreactivas al factor de transcripción Brn3a. Los resultados muestran que los grupos inoculados con CC presentaron una mayor supervivencia de CGR que los demás grupos, a los 7 y 14 días postlesión. Tanto a los 2 como a los 7 días después de la lesión se presentó un sustancial incremento en la expresión de citocinas antiinflamatorias como TGF- β , IL-10, IL-4 e IL-6. El efecto benéfico puede deberse a la presencia de células reguladoras de origen mieloide o linfoide

generadas a través de DIACA, ya que a los 7 días post-lesión el grupo inoculado con antígenos neurales presentó un incremento en la expresión de marcadores de fenotipo regulador como Foxp3 (linfocitos) y fenotipo antiinflamatorio como Arg1 (macrófagos). Además, la inducción de DIACA provocó la expresión diferencial de los factores neurotróficos estudiados a los 2 días (BDNF) y 7 días postlesión (NT4, BDNF y oncomodulina). En conjunto, los resultados obtenidos permiten concluir que la inducción de DIACA con antígenos neurales tiene un efecto neuroprotector sobre las CGR después de una lesión del nervio óptico.

Palabras Claves: Retina, Daño, Neuroprotección, Intolerancia, Antígenos.

Abstract

The central nervous system (CNS) of mammals in adulthood, has a poor prognosis of repair after a traumatic injury, which is due, in part, to a limited ability of nerve cells to regenerate their axons after trauma, but above all to an environment that is not conducive to favor reparative processes. The objective of this research was to evaluate the effect of immunological tolerance to neural antigens as a neuroprotective strategy in rats with optic nerve injury. In the present study, tolerance to neural components (extracted from the spinal cord) was induced via immunological deviation associated with the anterior chamber of the eye (DIACA) in order to modulate the immune response that occurs after a CNS lesion. To induce DIACA, three fractions of neural components were selected: HT (total homogenate), CC (cytosolic components) and CAM (membrane associated components). The neuroprotective effect of the different fractions of neural antigens was quantified by survival of retinal ganglion cells (CGR) immunoreactive to the Brn3a transcription factor. The results show that the groups inoculated with CC had a greater survival of CGR than the other groups, at 7 and 14 days post-injury. Both at 2 and 7 days after the injury there was a substantial increase in the expression of anti-inflammatory cytokines such as TGF- β , IL-10, IL-4 and IL-6. The beneficial effect may be due to the presence of myeloid or lymphoid regulatory cells generated through DIACA, since at 7 days post-injury the group inoculated with neural antigens showed an increase in the expression of regulatory phenotype markers such as Foxp3 (lymphocytes) and anti-inflammatory phenotype such as

Arg1 (macrophages). In addition, the induction of DIACA caused differential expression of the neurotrophic factors studied at 2 days (BDNF) and 7 days post-injury (NT4, BDNF and oncomodulin). Together, the results obtained allow us to conclude that the induction of DIACA with neural antigens has a neuroprotective effect on CGR after an optic nerve injury.

2.- Introducción General

Una vez que se presenta un daño en el sistema nervioso central (SNC) el sistema inmunológico sistémico desencadena una serie de respuestas celulares que lejos de favorecer la reparación del tejido, extienden la lesión espacial y temporalmente (Ankeny y Popovich, 2009). En principio, las células del sistema inmunológico promueven eventos de cicatrización y secretan factores tróficos que apoyan la recuperación tisular. Sin embargo, estos efectos benéficos pueden ser enmascarados por el exceso de moléculas tóxicas producidas por estas mismas células que dañan el tejido intacto que en un principio no sufrió daño (Popovich y McTigue 2009). A pesar de los múltiples esfuerzos realizados para tratar las lesiones en el SNC durante las últimas décadas, hasta el momento no existe un tratamiento eficaz capaz de permitir la reparación tisular y la consecuente recuperación de las funciones perdidas. Este fracaso en el modelo actual, ha hecho que se busquen hipótesis alternativas basadas en la modulación del sistema inmunológico. Dado que la patología degenerativa después de una lesión al SNC incluye un fuerte componente inflamatorio desencadenado por la reactividad contra múltiples componentes derivados del tejido dañado, el presente trabajo evaluó como estrategia neuroprotectora la modulación de la respuesta inflamatoria a través de la inducción de DIACA a antígenos neurales. Para evaluar el efecto neuroprotector de las diferentes fracciones de antígenos neurales se cuantificó el número de CGR inmunorreactivas al factor de transcripción brain-specific homeobox/pou domain protein 3A (Brn3a). Adicionalmente, se caracterizó el perfil inflamatorio en la retina mediante la expresión de mediadores de la

respuesta inflamatoria (TNF- α , IL-1 β , INF- γ , iNOS, IL-6, IL-4, IL-10 y TGF- β). Para determinar el tipo de células involucradas en la regulación del ambiente inflamatorio se evaluaron marcadores de fenotipo de células del sistema del sistema inmunológico (Foxp3, CD68 y Arg1). Además, en un intento por determinar el mecanismo de acción de la DIACA para favorecer la supervivencia de las CGR, el presente trabajo evaluó la expresión de factores neurotróficos (BDNF, NT3 Y NT4), factores de supervivencia (Bcl-2 y oncomodulina) y muerte (caspasa-3) durante los días 2 y 7 post-lesión. Los resultados obtenidos muestran que la inducción de DIACA favorece la supervivencia de las CGR; este efecto está mediado por la regulación de la respuesta inflamatoria, así como por la expresión diferencial de neurotrofinas y factores de supervivencia/muerte.

3.- Antecedentes

3.1.- Aspectos generales del sistema inmunológico

El sistema inmunológico está formado por una red de moléculas, células y tejidos que interactúan entre sí para reconocer, neutralizar y eliminar cualquier amenaza que ponga en peligro la integridad de los seres vivos (Nicholson, 2016). Una característica distintiva del sistema inmunológico es la capacidad para discriminar entre lo propio y lo extraño, y de mantener la tolerancia frente a antígenos propios, así como de generar una respuesta inmunológica eficaz contra patógenos y células malignas. La respuesta inmunológica se puede dividir en dos grandes tipos: la *innata*, que actúa inmediatamente y posee especificidad limitada y la *adaptativa*, que depende del tipo de antígeno, es extremadamente específica y tiene memoria de largo plazo (Vivier y Malissen, 2005). Si bien las respuestas innata y adaptativa son fundamentalmente diferentes en sus mecanismos de acción, la sinergia entre ellas es esencial para una respuesta totalmente efectiva (Chaplin, 2010).

El sistema inmunológico innato incluye diferentes barreras que impiden la entrada de los microorganismos, tanto de forma pasiva como activa. En una fase ulterior, la inmunidad innata puede continuar con un proceso de reconocimiento de patrones moleculares asociados al daño tisular (DAMPs) o asociados a patógenos (PAMPs, Poltorak *et al.*, 1998 y Ferrandon *et al.*, 2007) que se unen a receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR), lo que induce una cascada de procesos que culmina en la secreción de citocinas inflamatorias (Fainboim y

Geffner, 2005, Abbas *et al.*, 2012).

Dichas citocinas facilitan el proceso inflamatorio, que consiste en la atracción y migración de leucocitos a la zona de infección o daño. Los leucocitos que participan en la respuesta inmunológica innata son los monocitos, macrófagos, células NK, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos y células dendríticas. La respuesta adaptativa tiene como leucocitos efectores a los linfocitos T y B. Estas células presentan en su superficie celular a receptores específicos de antígeno (TCR y BCR, respectivamente). 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 (Chaplin, 2010).

Los linfocitos Th desempeñan un papel clave en la respuesta inmunológica adaptativa ejerciendo un amplio espectro de funciones: regulan tanto la respuesta celular citotóxica, como la producción de anticuerpos dependiente de linfocitos B, interactúan con los componentes del sistema inmunológico innato y responden a los estímulos de las células dendríticas presentadoras de antígenos. Dependiendo de la intensidad de la estimulación y la presencia de ciertas citocinas y otros factores, las células T CD4 + pueden diferenciarse en varias subpoblaciones de células T (Th1, Th2, Th17, Treg, así como subtipos menos estudiados, como Tfh, Th9 y Th22) con funciones y propiedades específicas (Ivanova y Orekhov, 2015). Esta especialización funcional está regulada por una serie de factores de transcripción que se activan en respuesta a estímulos específicos y promueven la

expresión de distintos patrones de citocinas y moléculas de superficie, presentados en la figura 1.

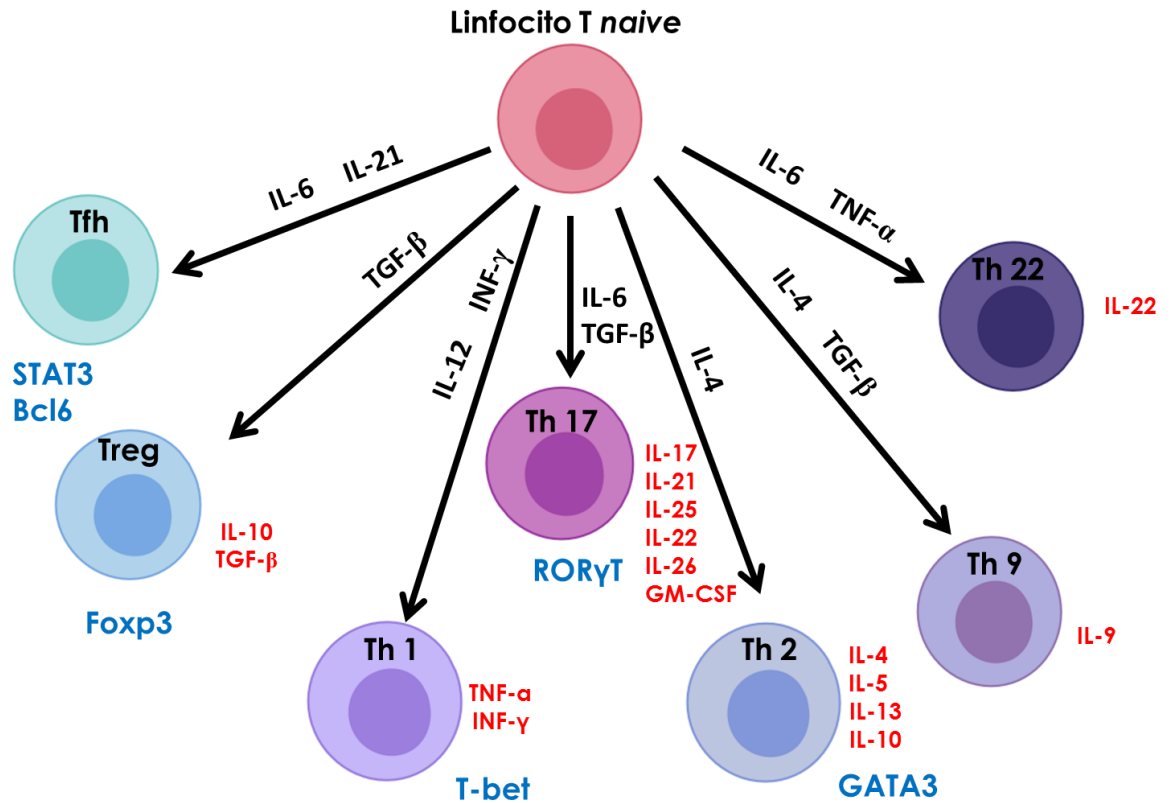


Figura 1. Representación esquemática de los subtipos en los que se diferencian los linfocitos T después de la presentación del antígeno, así como las citocinas que secretan (en rojo) y los factores de transcripción predominantes en cada subtipo (en azul). Bcl6 (del inglés, B-cell lymphoma 6), GM-CSF (factor estimulante de colonia de granulocitos), Foxp3 (forkhead box P3), IL (Interleucina), INF-γ (Interferon gamma), STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), RORγT (retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma), T-bet (T-box transcription factor), TGF-β (factor de crecimiento transformante beta) Th (Linfocitos T cooperadores) Tfh(Linfocitos cooperadores foliculares), TNF-α (factor de necrosis tumoral alfa) Tregs (linfocitos T reguladores) (Ivanova y Orekhov, 2015; modificado).

Los linfocitos B son responsables de la inmunidad humoral. Su función principal es la defensa del hospedero contra microorganismos por medio de la secreción de anticuerpos que reconocen las moléculas antigénicas de los patógenos. También tienen otras funciones como la presentación de antígenos a los linfocitos T, la regulación negativa de las respuestas inflamatorias y la

regulación de las respuestas frente a autoantígenos (Martin *et al.*, 2013; Tao y Xu, 2016).

3.2 La retina y el nervio óptico como parte del sistema nervioso central

El nervio óptico (NO) y la retina representan un ejemplo clásico de una vía del SNC que no se regenera después de una lesión. A pesar de su localización periférica se desarrollan a partir de tejido diencefálico durante etapas tempranas del desarrollo embrionario (Dowling, 2002). Como consecuencia, las fibras del NO están cubiertas de mielina producida por oligodendrocitos (Ono *et al.*, 1997).

La retina se compone de una serie de capas de células y de sinapsis que se pueden subdividir de forma general en una capa epitelial externa (conocida como epitelio retiniano o también epitelio pigmentario de la retina) y una capa interna sensorial (que se conoce como retina neurosensorial o neuro-retina). La retina es uno de los tejidos más activos del cuerpo desde un punto de vista metabólico. Su función principal es la de transformar la energía luminosa en impulsos eléctricos y energía química que permitan el proceso de la visión (Dowling, 1987). En la retina, cinco tipos principales de neuronas (fotorreceptores, células bipolares, células horizontales, células amacrinas y CGR) están conectadas para formar una de las placas de circuitos más complejas de la naturaleza, la cual puede apreciarse en la figura 2. Cuando la luz incide en la retina, estimula a los fotorreceptores, creando una señal eléctrica que se transmite a través de otras neuronas de la retina al nervio óptico y luego al cerebro (Masland, 2012; Sakata, 2009).

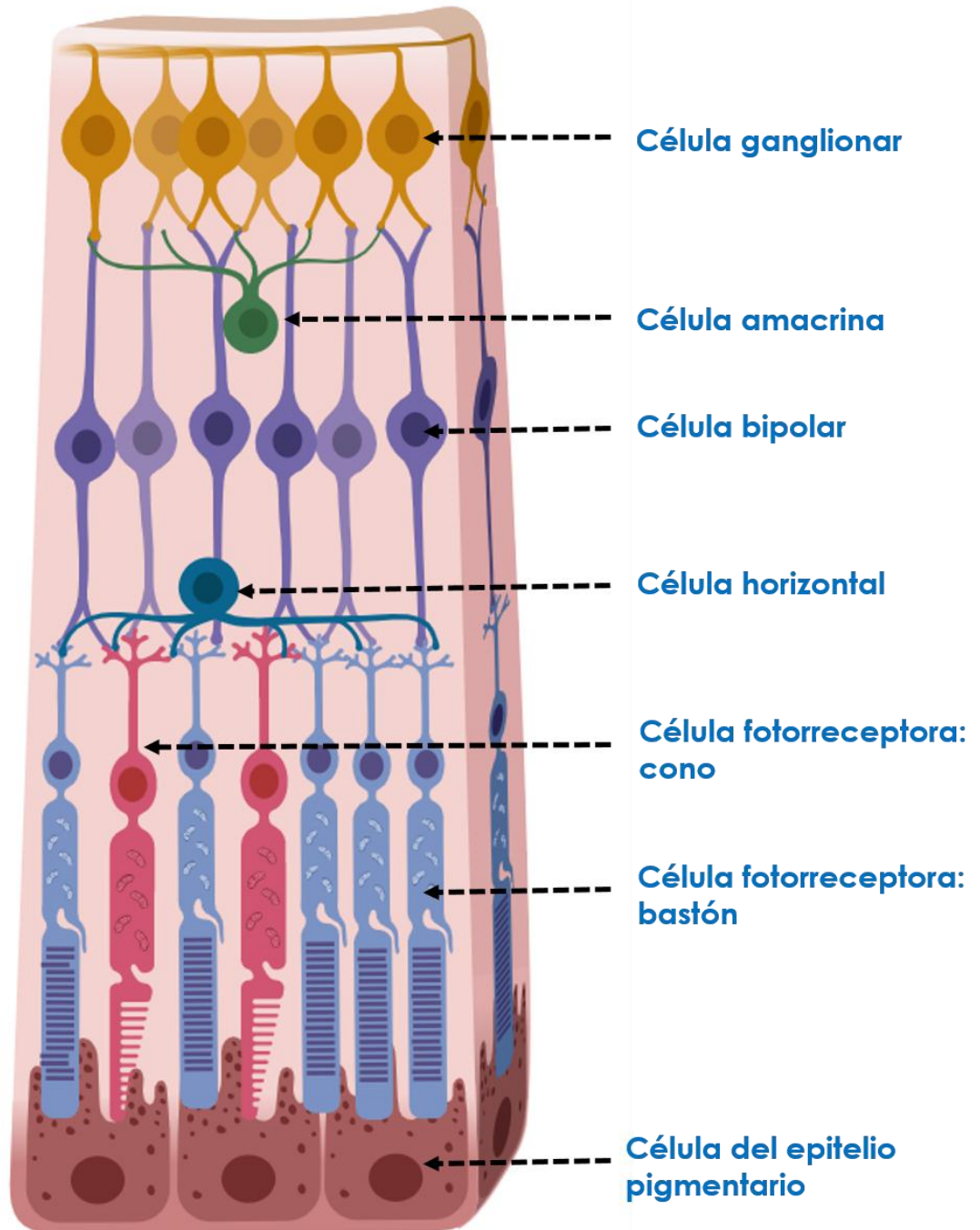


Figura 2. Representación esquemática de la organización de las células de la retina. La retina se ubica entre la coroides y el cuerpo vítreo. Se divide en dos porciones, el epitelio pigmentario retinal (próximo a la coroides) y la retina neurosensorial (próxima al vítreo). En el esquema se muestra la distribución en capas de las distintas células que conforman la retina (Masland, 2012; Sakata, 2009).

El NO está compuesto por células gliales y por los axones de las CGR. El NO se origina en la capa de las CGR y se descompone parcialmente en el quiasma óptico, terminando en el núcleo geniculado lateral talámico y en el colículo superior mesencefálico, desde donde la información se transmite a la corteza visual (Remington y Goodwin, 2011).

La lesión del NO es un modelo ampliamente utilizado para evaluar los eventos degenerativos y regenerativos después de una lesión en el SNC de mamíferos. La lesión del NO provee condiciones experimentales favorables entre las que se encuentran: i) la lesión afecta la población entera de las CGR, ii) el curso temporal de la degeneración de las CGR está bien establecido, iii) es un modelo de lesión poco invasivo que permite la pronta recuperación de los animales (Agudo-Barriuso *et al.*, 2011; Frank y Wolburg, 1996). Como resultado, el sistema visual de los roedores se usa ampliamente en estudios de desarrollo embrionario (Badea *et al.*, 2009; Reese, 2011) como modelo de lesión traumática del SNC (Berry *et al.*, 2008; Galindo-Romero *et al.*, 2011) regeneración (Aviles-Trigueros *et al.*, 2000; Vidal-Sanz *et al.* 2002) isquemia transitoria (Aviles-Trigueros *et al.*, 2003; Mayor-Torroglosa *et al.*, 2005) glaucoma (Agudo-Barriuso *et al.*, 2013; Ramirez *et al.*, 2010; Vidal-Sanz *et al.*, 2012) y degeneración retiniana (Garcia-Ayuso *et al.*, 2013; Montalban-Soler *et al.*, 2012).

3.3.- Lesiones en el sistema nervioso central

La función normal del sistema nervioso se basa en un patrón complejo y preciso de conexiones entre muchos miles de millones de células nerviosas. El

daño axonal en el SNC de los mamíferos inicia un proceso de degeneración en el sitio dañado que ocasiona que las fibras dañadas no se reconecten, lo que provoca eventualmente la muerte de sus correspondientes cuerpos celulares (Ramon y Cajal, 1991). Además, las fibras que no sufrieron daño directo, pero que se localizan en la vecindad de las neuronas dañadas sufren degeneración secundaria (Faden *et al.*, 1993; Lynch y Dawson, 1994; Yoles y Schwartz, 1998). Esta extensión progresiva del daño resulta de un proceso que inicia pocos minutos después de que se produce la lesión y continúa por días o semanas (Faden *et al.*, 1993; Yoles y Schwartz, 1998). Entre los mecanismos relacionados que provocan la extensión del daño se encuentran la creación de un entorno neurotóxico que incluye la perfusión microvascular, la liberación de radicales libres, niveles excitotóxicos de neurotransmisores, alteraciones de la concentración iónica (Faden *et al.*, 1993; Hovda *et al.*, 1991; Yoles *et al.*, 1992; Yoshino *et al.*, 1991), formación de la cicatriz glial, destrucción de mielina, privación del soporte trófico y agregación anormal de proteínas y restos celulares (Crowe *et al.*, 1997; Levkovitch-Verbin *et al.*, 2003), entre otros eventos. Estos cambios causan la pérdida de la homeostasis celular, conduciendo a la degeneración neuronal secundaria. Por esta razón, víctimas de traumatismos en el SNC comúnmente suelen permanecer con discapacidades en la percepción, cognición y /o movimiento que pueden ser devastadoras y permanentes (Benowitz y Yin, 2007).

Además de los factores que conducen a la degeneración secundaria, en el sitio del daño también se crea un ambiente poco permisivo para el crecimiento axonal. Tales factores incluyen moléculas que inhiben el crecimiento de la neurita,

entre las cuales se encuentran restos de mielina e inhibidores asociados a ella (p.ej. inhibidor de crecimiento de neuritas, Nogo A; glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos, MOG; o la glicoproteína asociada a la mielina, MAG. Li *et al.*, 1996; Niederöst *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002), así como proteoglicanos de sulfato de condroitina que forman la cicatriz glial (p. ej. neurocano, versicano, fosfocano y brevicano. McKeon *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2003), entre otros.

3.4.- Actividad del sistema inmunológico en respuesta a las lesiones del sistema nervioso central

La inflamación es parte de la respuesta inicial al daño y se caracteriza en la fase aguda por el incremento del flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular, con acumulación de fluido (formación de edema), leucocitos y moléculas mediadoras de la inflamación, como las citocinas. La respuesta inmunológica varía de acuerdo a la localización, con claras diferencias entre el SNC y el SNP. El SNC ha sido tradicionalmente considerado como inmunológicamente privilegiado puesto que utiliza varios mecanismos para modular la respuesta inmunológica y así limitar el daño tisular inducido por la inflamación. Sin embargo, actualmente se sabe que posee un sistema linfático convencional (Liu *et al.*, 2006; Louveau *et al.*, 2015) y que tiene la capacidad de interactuar con el sistema inmunológico periférico a través de la síntesis y liberación de citocinas y neurotransmisores que pueden regular la diferenciación y funcionamiento de las células de la respuesta inmunológica (Louveau *et al.*, 2018).

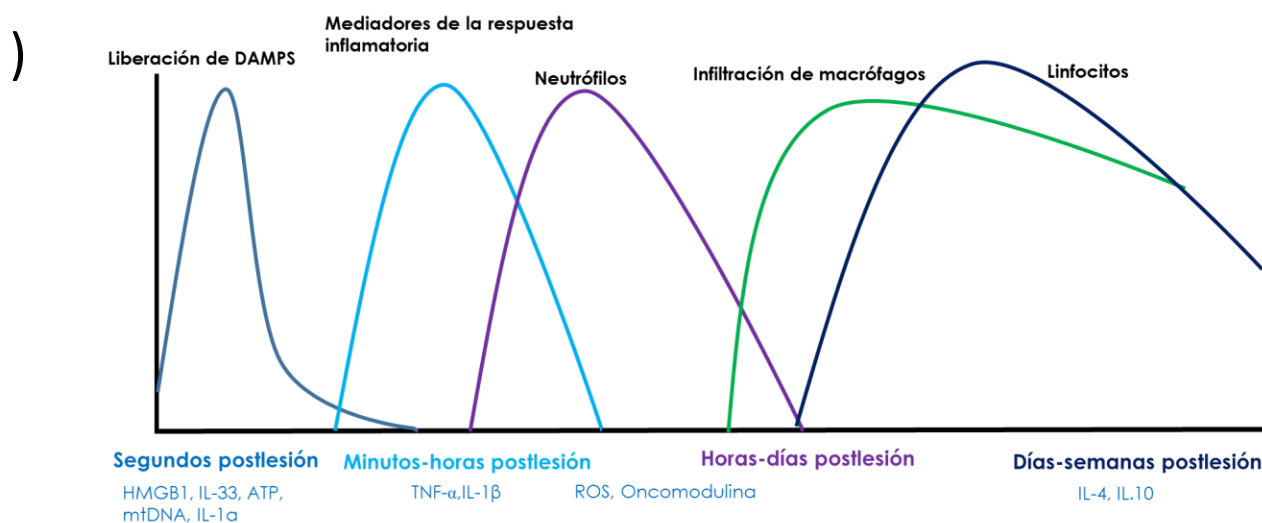
Después de un daño en el SNC al menos cuatro fases pueden distinguirse: aguda, sub-aguda, crónica temprana y crónica (Vidal *et al.*, 2013). La fase aguda tiene una duración de unas pocas horas y es la fase en la que hay mayor destrucción neuronal y axonal, así como desmielinización cerca del sitio del daño (Schwab *et al.*, 2006). Durante esta fase hay sobreexpresión de citocinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α (Bethea *et al.*, 1999; Pineau y Lacroix, 2007) y se observa una infiltración de neutrófilos, los cuales alcanzan su nivel más alto a las veinticuatro horas después del daño (Beck *et al.*, 2010). Como se observa en la figura 3, muchas moléculas presentes en el tejido nervioso sano son sensadas como DAMPs después de un daño e inician la respuesta inflamatoria. Un grupo bien caracterizado de DAMPs consiste en proteínas intracelulares que se liberan después de una lesión celular. Ejemplos de este grupo son la interleucina (IL) -1 α (Eigenbrod *et al.*, 2008), IL-33 (Schmitz *et al.*, 2005), la proteína del grupo de alta movilidad B1 (HMGB1. Scaffidi *et al.*, 2002) y la clase de proteínas S100 (Zitvogel *et al.*, 2010). En la periferia también ocurren cambios desde etapas tempranas, siendo uno de los más notables el incremento de células T y B activadas en el bazo y en la médula ósea (Ankeny *et al.*, 2006).

La fase sub-aguda ocurre entre los días 2 a 7 después del daño, momento en el que el número de monocitos, linfocitos y factores antiinflamatorios empieza a incrementar. Entre las moléculas involucradas en la fase sub-aguda se encuentran principalmente las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α , y quimiocinas como el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

La fase crónica puede durar semanas e incluso meses y se caracteriza por el desarrollo de una respuesta inmunológica humoral y celular dirigida a facilitar la limpieza del sitio del daño (Donnelly y Popovich, 2008). Durante esta fase, los niveles de células T, macrófagos y neutrófilos empiezan a incrementar, presentándose un segundo pico de inflamación (Beck *et al.*, 2010; Ankeny *et al.*, 2006). Estudios en varios modelos experimentales demuestran que las lesiones en el SNC en este segundo pico inflamatorio activan un repertorio de linfocitos endógenos reactivos a sus propios componentes, como se aprecia en la figura 3B (Jones *et al.*, 2004). Estos linfocitos T autorreactivos se infiltran al SNC atraídos por los altos niveles de citocinas liberadas durante el trauma vascular y el rompimiento de la barrera hematoneural (Eugenin *et al.*, 2006; Karpus y Ransohoff, 1998; Lowenstein y Castro, 2003). Una vez que los linfocitos T autorreactivos obtienen acceso al tejido, causan procesos inflamatorios, desmielinización, degeneración axonal, muerte celular y deterioro neurológico (Kawakami *et al.*, 2005). Como resultado de la patología en curso, nuevos antígenos son liberados y tienen el potencial de unirse y activar otros linfocitos. Este fenómeno es conocido como “esparcimiento o extensión” de los epítopes, lo que perpetúa la neuroinflamación y la progresión de la patología (Cross *et al.*, 1993, Claudio *et al.*, 1995).

Si los linfocitos autorreactivos contribuyen a la progresión o a la resolución de los acontecimientos fisiopatológicos en el sitio de la lesión no está bien definido. Esta paradoja puede ser debido a que simultáneamente se activan mecanismos regulatorios y/o reparativos con mecanismos neurodestructivos

(Walsh y Kipnis, 2011). Existe evidencia que muestra que la activación de los linfocitos Th1 específicos de antígenos neurales favorece procesos de remoción de restos celulares potencialmente dañinos para la supervivencia neuronal (Fisher *et al* 2001; Kipnis *et al.*, 2005; Moalem *et al.*, 2000). Por otro lado, también se ha demostrado que la respuesta adaptativa hacia antígenos neurales promueve la pérdida masiva de neuronas (Ankeny *et al.*, 2006; Laspas *et al.*, 2011; Popovich y Jones, 2003). Aunque los datos obtenidos de estos estudios son interesantes, es importante tener en cuenta que el resultado de la actividad del sistema inmunológico después de un daño en el SNC dependerá de la sincronización, intensidad y de la integración de las señales moleculares, para lograr una respuesta que sea robusta y que esté adecuadamente controlada.



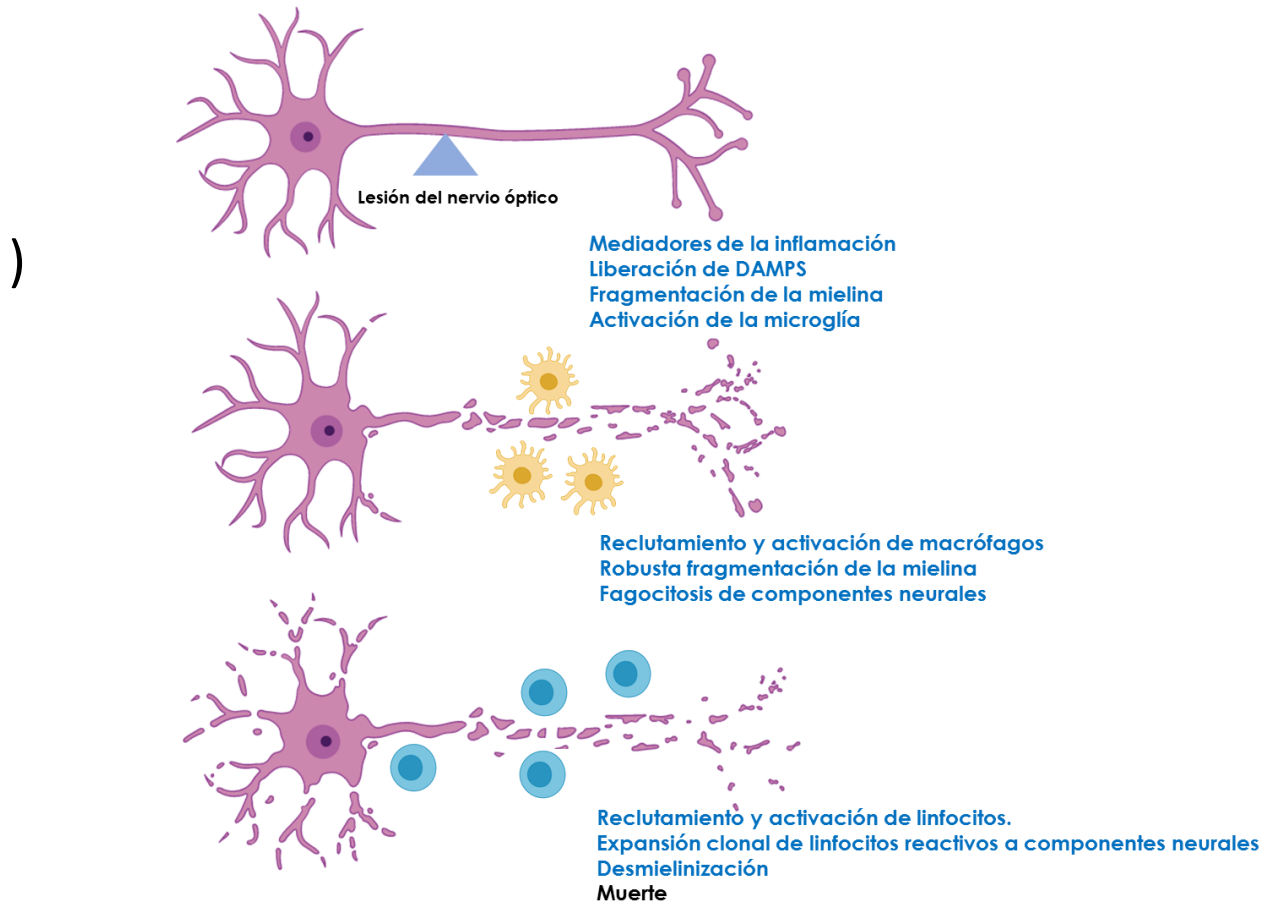


Figura 3. Cinética molecular y celular de la respuesta inmunológica después de un daño en el SNC, así como los eventos degenerativos secundarios que conducen a la pérdida neuronal. A) Los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), como IL-33, HMGB1 y ATP, se liberan inmediatamente después de la lesión del SNC. El inflammasoma se activa poco después y produce IL-1 β . Los neutrófilos llegan horas después de la lesión y permanecen durante varios días, mientras que los monocitos comienzan a infiltrarse desde el primer día y permanecen presentes. Los linfocitos comienzan a llegar días o semanas después de la lesión. B) Eventos neurodegenerativos desencadenados después de la lesión del nervio óptico que conducen a la muerte neuronal (Gadani *et al.*, 2015; modificado).

3.5.- Componentes del sistema nervioso central como antígenos neurales.

La mielina del SNC tiene dos funciones: provee de soporte metabólico al axón y permite una rápida transmisión de los potenciales de acción a lo largo del axón (Nave 2010). En términos de masa total, la mielina comprende aproximadamente el 40% de agua; la masa seca comprende entre 60% y 75% de

lípidos y entre 15% y 25% de proteínas. El contenido de proteínas incluye la proteína básica de mielina (MBP), que es abundante en el SNC, donde desempeña un papel crítico en la formación de la mielina compacta; MOG, que es específica para el SNC; y proteína proteolipídica (PLP,) que es la proteína más abundante en la mielina del SNC (Morell y Quarles, 1999), tanto en la médula espinal como en el nervio óptico (Bettell *et al.* 2003). Estas proteínas y adicionalmente MAG, y la 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPase) son las principales moléculas del SNC susceptibles de ser reconocidas como antígenos (Ohashi *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1991; Toma *et al.*, 2007; Zamvil *et al.*, 1986). Estas moléculas han sido asociadas a enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, el síndrome de Guillain-Barré, la encefalitis experimental autoinmune y la neuritis alérgica experimental (Guadarrama-Ortiz *et al.*, 2014; Lagumersindez *et al.*, 2009).

En humanos con desórdenes visuales potencialmente autoinmunes, además de detectar anticuerpos contra las proteínas ya mencionadas también se han detectado la presencia de autoanticuerpos que reconocen a GADPH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), aldolasa, enolasas α y γ , aquaporina 4 y colapsina 5 (CRMP5) (Adamus *et al.*, 2011)

La encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE) es el modelo preclínico más común para la esclerosis múltiple, la enfermedad inflamatoria prototípica del SNC que se caracteriza por mecanismos inmunopatológicos y neuropatológicos complejos como: inflamación, desmielinización, pérdida axonal y gliosis

(Lassmann y Bradl, 2017) que pueden afectar al cerebro, la médula espinal y/o los nervios ópticos. La EAE se puede inducir activamente mediante la inmunización con varios péptidos de mielina, como las proteínas MOG, MBP y PLP, así como el homogeneizado de la médula espinal (SCH) (Robinson *et al.*, 2014). Varios modelos de EAE han revelado disfunciones visuales como la neuritis óptica, derivadas de daño en el NO, consistente con una fuerte inflamación asociada con desmielinización y pérdida axonal (Horstmann *et al.*, 2016). La neuritis óptica asociada a EAE ha sido descrita en cobayos (Onofrij *et al.*, 1992), rata (Balatoni *et al.*, 2007) y ratón (Liu *et al.*, 2015; Martín *et al.*, 2006).

Una característica distintiva del sistema inmunológico es la capacidad para discriminar entre lo propio y lo extraño, y de mantener la tolerancia frente a antígenos propios. Como resultado de esto, el sistema inmunológico ha desarrollado mecanismos que reducen el potencial antigénico de proteínas autólogas, disminuyendo el número de epítopes capaces de interactuar con el HLA en las proteínas extracelulares y en aquellas que son consideradas como ubicuas, comparado con el número de epítopes en las proteínas de tipo intracelular (De Groot *et al.*, 2007).

3.6.- Tolerancia inmunológica y linfocitos T reguladores

La inmunotolerancia, también conocida como tolerancia inmunológica, es un estado activo en el cual el sistema inmunológico previene una autorreactividad patológica contra los antígenos propios manteniendo un equilibrio entre activación (capacidad de reconocer y eliminar antígenos) e inhibición (limitar las respuestas

efectoras potencialmente nocivas) (Gershon y Kondo, 1970). La tolerancia es un proceso que ocurre tanto en los linfocitos T como en los linfocitos B; para ambos existe una forma de tolerancia central, en los órganos linfoides primarios y una periférica en los órganos periféricos o secundarios.

El mecanismo de tolerancia central se basa en la eliminación en el timo de clones autorreactivos por la interacción con antígenos propios presentados por moléculas del MHC de las células presentadoras de antígeno (Dyson *et al.*, 1991; Kappler *et al.*, 1987). Aunque este mecanismo es altamente efectivo, linfocitos capaces de reaccionar contra moléculas propias escapan a la periferia. Por esta razón, es necesario que el sistema inmunológico utilice un conjunto adicional de mecanismos para mantener la tolerancia. Estos mecanismos operan en la periferia del sistema inmunológico en células maduras que circulan en la sangre y linfa y, por lo tanto, se denominan tolerancia periférica (Renz y Herz, 1998). Entre los mecanismos principales utilizados se encuentran: eliminación, anergia y supresión clonal (Hogquist *et al.*, 2005).

Los linfocitos Tregs mantienen la tolerancia y la homeostasis a través de respuestas inmunológicas contra los antígenos propios y no propios (Sakaguchi *et al.*, 2008). Esta subpoblación de linfocitos T está definida por la expresión de las moléculas CD4⁺ y CD25⁺, así como por el factor de transcripción forkhead box P3 (Foxp3) que es esencial para su desarrollo. Una parte importante de la actividad reguladora de esta población se debe a la secreción de las citocinas inmunomoduladoras TGF- β e IL-10 (Sakaguchi *et al.*, 2006). Las Treg reguladoras

se dividen en dos grupos. El primer grupo desarrolla su función reguladora en el timo y se conoce como células Treg naturales (nTreg). El segundo grupo de células Treg se diferencia en la periferia, debido a que se desarrollan en respuesta a la estimulación con un antígeno específico, se les llama Treg inducibles (iTreg) (Abbas *et al.*, 2013)

Las Tregs utilizan varios mecanismos para mantener a las células T efectoras en un estado no responsivo. Cuando el balance entre la regulación y la activación se interrumpe y/o cuando se excede un cierto umbral de activación, la enfermedad autoinmune se desarrolla (Ankeny y Popovich, 2010). Existe evidencia de que la autoinmunidad inducida por el trauma tiene consecuencias patológicas, sugiriendo que la lesión traumática del SNC es suficiente para activar la autoinmunidad por Th1 (Popovich *et al.*, 1996).

Existen varios mecanismos posibles mediante los cuales la autoinmunidad inducida por el trauma puede contribuir a la patología de las lesiones en el SNC. Las células T pueden ejercer efectos directos sobre las neuronas y la glía (Giuliani *et al.*, 2003; Gimsa *et al.*, 2004), o efectos indirectos sobre las células del SNC al producir citocinas proinflamatorias (p.ej. INF- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-12. Yang *et al.*, 2004), quimiocinas (CXCL10, CCL5, CCL2. Jones *et al.*, 2005), o por activación de la microglía (Gimsa *et al.*, 2000). La apoptosis de las neuronas y de la glía también puede ocurrir por la unión con receptores de muerte, lo cual puede ser mediado por células T (Aktas *et al.*, 2005; Yu y Fehlings, 2011).

Una estrategia terapéutica atractiva para restablecer la tolerancia y el control de la enfermedad es inducir selectivamente Tregs específicas de autoantígenos CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Carbone *et al.*, 2014; MacDonald *et al.*, 2016; Rossetti *et al.*, 2015). Numerosos estudios han demostrado el poder de las inmunoterapias basadas en Tregs, como se describe a continuación.

3.7.- Los linfocitos T reguladores tienen un efecto protector en modelos de neurodegeneración

Se sabe que el SNC utiliza varios mecanismos para modular la respuesta inmunológica y para limitar el daño tisular inducido por la inflamación. Un objetivo importante de la investigación actual es desarrollar nuevas terapias para limitar el daño que se genera después de una lesión en el SNC, al inhibir y/o evitar la inducción de células T CD4⁺ autorreactivas (Romano *et al.*, 2019). Una técnica para restaurar la tolerancia propia es explotar los mecanismos reguladores endógenos como las Tregs específicas de antígeno.

Hay varios mecanismos mediante los cuales las Tregs median sus efectos protectores, incluyendo la producción de citocinas inmunorreguladoras, neurotrofinas, y mediante la promoción de un fenotipo regulador en microglía/macrófagos (Fujio *et al.*, 2010; Schmetterer *et al.*, 2012). Las Treg pueden influir en el microambiente debido a su alta expresión del receptor CD25, el cual les permite captar más IL-2, "despojando" a las células circundantes de esta citocina (Sojka *et al.*, 2008).

Al considerar si existe un mecanismo de supresión dominante utilizado por los Treg, es importante comprender que se utilizan diferentes mecanismos de forma preferencial para la gran variedad de células diana y microambientes en los que actúan los Treg (Romano *et al.*, 2019). En condiciones inflamatorias, los monocitos migran hacia el tejido, donde se diferencian en macrófagos residentes en el tejido. Los monocitos constituyen el principal tipo celular presente en los tejidos inflamados, y su regulación podría ser clave para reducir la inflamación crónica. Se ha demostrado que las Tregs actúan directamente sobre los monocitos inhibiendo su función de secreción de citocinas, diferenciación y presentación de antígenos. Después del co-cultivo con Tregs, los monocitos presentan características clásicas de macrófagos M2 (Tiemessen *et al.*, 2007).

Las Tregs afectan directamente a los neutrófilos limitando su acumulación al disminuir la expresión de las quimiocinas, CXCL1 y CXCL2 (Richards *et al.*, 2010). Además, las Treg también pueden inducir un fenotipo más "inmunosupresor" en los neutrófilos, lo que desvía el microambiente hacia uno menos inflamatorio. Ha sido reportado que el cocultivo de neutrófilos con Tregs favorece la producción de IL-10 y TGF- β y disminuye la liberación de IL-6 (Lewkowicz *et al.*, 2013).

Las células Tregs pueden inhibir la actividad de los linfocitos B autorreactivos *in vitro* e *in vivo* a través de mecanismos que las suprimen directamente, limitando de esta forma la autoinmunidad humoral (Iikuni *et al.*, 2009). Los linfocitos Tregs naturales inducen apoptosis en las células B mediante

la liberación de granzima A, granzima B y perforina (Zhao *et al.*, 2006). A diferencia de las nTreg, el subconjunto de iTreg suprime la respuesta de las células B de una manera dependiente del contacto celular que involucra a TGF- β pero no citotoxicidad (Xu *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que las Tregs específicas de antígeno son más poderosas para suprimir las respuestas aloinmunes *in vitro* e *in vivo* en comparación con las Tregs expandidas policlonalmente (Putnam *et al.*, 2009).

La manipulación de las Tregs en modelos animales ha destacado su importancia para la atenuación del daño inducido por la inflamación no controlada. En modelos de accidente cerebrovascular la disminución de Tregs incrementa el área de infarto, asociada con niveles elevados de TNF- α (Liesz *et al.*, 2009). En un modelo de lesión traumática de nervio óptico se mostró que la eliminación de células Tregs conduce a una respuesta exacerbada de las células T efectoras, siendo perjudicial para el tejido lesionado (Walsh *et al.*, 2011). Adicionalmente, se ha demostrado que el incremento en la actividad de las Tregs aminora la patología en modelos de encefalitis experimental autoinmune, accidente cerebrovascular y enfermedades de Parkinson y Alzheimer (Chen *et al.*, 2013; Ha *et al.*, 2012; Lowther y Hafler, 2012; Yu y Fehlings, 2012).

3.8-. La desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo como una herramienta potencial para generar linfocitos T reguladores específicos de antígeno

El ojo es un órgano capaz de generar un estado de inmunotolerancia específica y sistémica. Los antígenos introducidos en su cámara anterior de manera experimental provocan una forma única de tolerancia inmunológica sistémica caracterizada por la supresión específica de antígeno de las respuestas Th1 (p. ej. DTH) y Th2 (Nieder Korn, 2006). Esta tolerancia es provocada por al menos dos poblaciones de Tregs: CD4⁺ y CD8⁺ (Lei *et al.*, 2008).

La DIACA comprende tres fases secuenciales en el ojo, el timo y el bazo. La inducción de DIACA comienza cuando se introduce un antígeno en la cámara anterior del ojo. Este antígeno es capturado por las células presentadoras de antígeno (CPA) F4/80⁺ ubicadas en el iris y el cuerpo ciliar; monocitos circulantes F4/80⁺ infiltran en la CA del ojo debido a un rápido incremento de las quimiocinas CCL2 y CCL7 y a la presencia de TNF- α en el humor acuoso (Pais *et al.*, 2012). Posteriormente las CPA entran en la circulación venosa a través de la malla trabecular del ojo hacia el timo y el bazo (figura 4) para colaborar en la inducción de la tolerancia específica de antígeno (Lin *et al.*, 2005; Nieder Korn 2006). Aproximadamente 24–48 h después de la inyección de antígenos en la CA, los monocitos F4/80⁺ transportan este antígeno al timo. Allí se generan los timocitos CD4-CD8 NK 1.1⁺, que luego migran a la zona marginal del bazo. El siguiente paso en la inducción de DIACA comienza con la migración de los timocitos CD4-CD8 NK 1.1⁺ y las CPA oculares F4/80⁺ hacia la zona marginal del bazo (Wang *et al.*, 1997). Esta población de CPA oculares posee tres propiedades principales que las hacen únicas: la expresión de CD-1d, la producción elevada de IL-10, IL-13 y MIP-2 (proteína inflamatoria de macrófagos 2) y una limitada expresión de IL-12

(Niederhorn 2009). MIP-2 ayuda en el reclutamiento de células T NK reactivas a CD1 CD4⁺/CD8⁻ o CD4⁻/CD8 (Faunce *et al.*, 2000; Sonoda *et al.*, 1999). Las células reactivas a CD1 son de suma importancia para el desarrollo de células T reguladoras eferentes específicas de antígeno (Niederhorn 2006; Sonoda *et al.*, 1999; Streilein 2003). Dos tipos de células son capaces de activar a las células T NK reactivas a CD1: las CPA oculares y las células B de la zona marginal del bazo. Las células activadas T NK CD4⁺ reactivas a CD1 liberan rápidamente grandes cantidades de citocinas inmunomoduladoras que contribuyen a la inducción de células T reguladoras. Algunas de estas citocinas son IFN- γ , IL-4, IL-10 y RANTES (figura 4) (Faunce y Streilein 2002; Nakamura *et al.*, 2003; Streilein 2003). RANTES es una quimiocina que atrae más CPA y células T CD8⁺ a la zona marginal del bazo (Faunce y Streilein 2002; Nakamura *et al.*, 2003; Niederhorn 2006; Streilein 2003; Wang *et al.*, 1997).

Juntas, las CPA F4/80⁺ derivadas de ojo y las células T NK forman agrupaciones multicelulares, que también incluyen células B de la zona marginal, células T CD4⁺, células T CD8⁺ y células T $\gamma\delta$ abundantes en TGF- β e IL-10 (Lin *et al.*, 2005; Streilein 2003). En presencia de TGF- β e IL-10 las CPA procesan los antígenos oculares y los liberan en la zona marginal del bazo, donde las células B los capturan y los presentan a células T CD8⁺, que se transformarán en células T reguladoras (D'Orazio *et al.*, 2000). Después del procesamiento del antígeno ocular, las células B proliferan con la finalidad de presentar los péptidos de antígeno reprocesados a más células T (Skelsey *et al.*, 2001) que llegarán a ser Células Treg CD4⁺ (aferentes) y CD8⁺ (eferentes).

4.- Justificación

El sistema nervioso central, presenta una limitada capacidad para regenerarse después de que se presenta un daño o una lesión, debido principalmente al microambiente generado. Aunque la etiología, la progresión y el resultado de las diferentes enfermedades neurodegenerativas, y/o de los traumatismos en el SNC son muy variados, comparten el establecimiento de una fase de tipo autoinmune en la que los constituyentes derivados del parénquima neuronal se reconocen como antígenos y dificultan la resolución de la respuesta inflamatoria.

Se han desarrollado un número creciente de terapias que intentan impulsar, modular y/o suprimir la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central. Sin embargo, hasta el momento ninguna ha logrado disminuir considerablemente el daño generado. Estudios previos en modelos animales han demostrado la importancia de las células T reguladoras específicas de antígeno en la atenuación de la inflamación del SNC asociada con estas enfermedades.

Una posible estrategia para modular el sistema inmunológico es la inducción de tolerancia a los antígenos del SNC mediante un incremento de células Treg específicas de antígeno a través del fenómeno conocido como DIACA.

Dado que DIACA podría utilizarse para suprimir el inicio y la progresión de una respuesta auto-reactiva/autoinmune, es necesaria la investigación en el

fenómeno de DIACA, las células T reguladoras inducidas y su aplicación en el panorama clínico de las enfermedades neurodegenerativas.

5.- Hipótesis

La inducción de la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo incrementa el número de células T reguladoras específicas a antígenos neurales atenuando la respuesta inflamatoria generada a partir del trauma, lo que favorece la supervivencia de las células ganglionares en la retina.

6.- Objetivos

6.1.- Objetivo general

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

6.2.- Objetivos particulares

1.- Determinar la antigenicidad de diferentes componentes del tejido medular derivado de ratas adultas.

2.- Determinar la capacidad de los diferentes componentes del tejido medular para inducir la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo.

3.- Evaluar el efecto de la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo a los diferentes componentes del tejido medular sobre la supervivencia de las células ganglionares de la retina

4.- Evaluar el efecto de la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo sobre el perfil de los mediadores y el fenotipo de las células involucradas en la respuesta inflamatoria en la retina.

7.- Materiales y Métodos

7.1-Animales

Se trabajó con ratas hembra juveniles y adultas de 4 a 15 semanas de edad de la cepa Wistar. La manipulación, alimentación y el cuidado de los animales lo realizó personal especializado del bioterio del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH. Los animales permanecieron estabulados en condiciones controladas de temperatura ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) y humedad (44-55%) con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales recibieron dieta sólida estándar (Rodent Lab Chow 5001, Purina®) y agua ad libitum. Todos los experimentos se realizaron siguiendo los lineamientos establecidos por el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud (Título séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación) y fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL-UNAM, No. de oficio: INV/B/RGC/184/17).

7.2 Diseño experimental

Para cumplir con los objetivos 1,2 y 3 se emplearon los siguientes grupos experimentales de animales seleccionados aleatoriamente:

Grupo	Objetivo 1	Objetivo 2	Objetivo 3
Vehículo	n=10**	n=10*	N=12**
HT	n=10**	n=10*	n=12**
CC	n=10**	n=10*	n=12**

CAM	n=10**	n=10*	n=12**
BSA	n=10**	n=10*	n=12**

** Animales en edad adulta (>post-natal 60; \geq 250 g de peso) *animales juveniles (post-natal 30)

El objetivo 4 se realizó con los grupos experimentales de animales en edad adulta vehículo (n=8) y CC (n=8).

La figura 5 muestra el diseño experimental empleado en este trabajo.

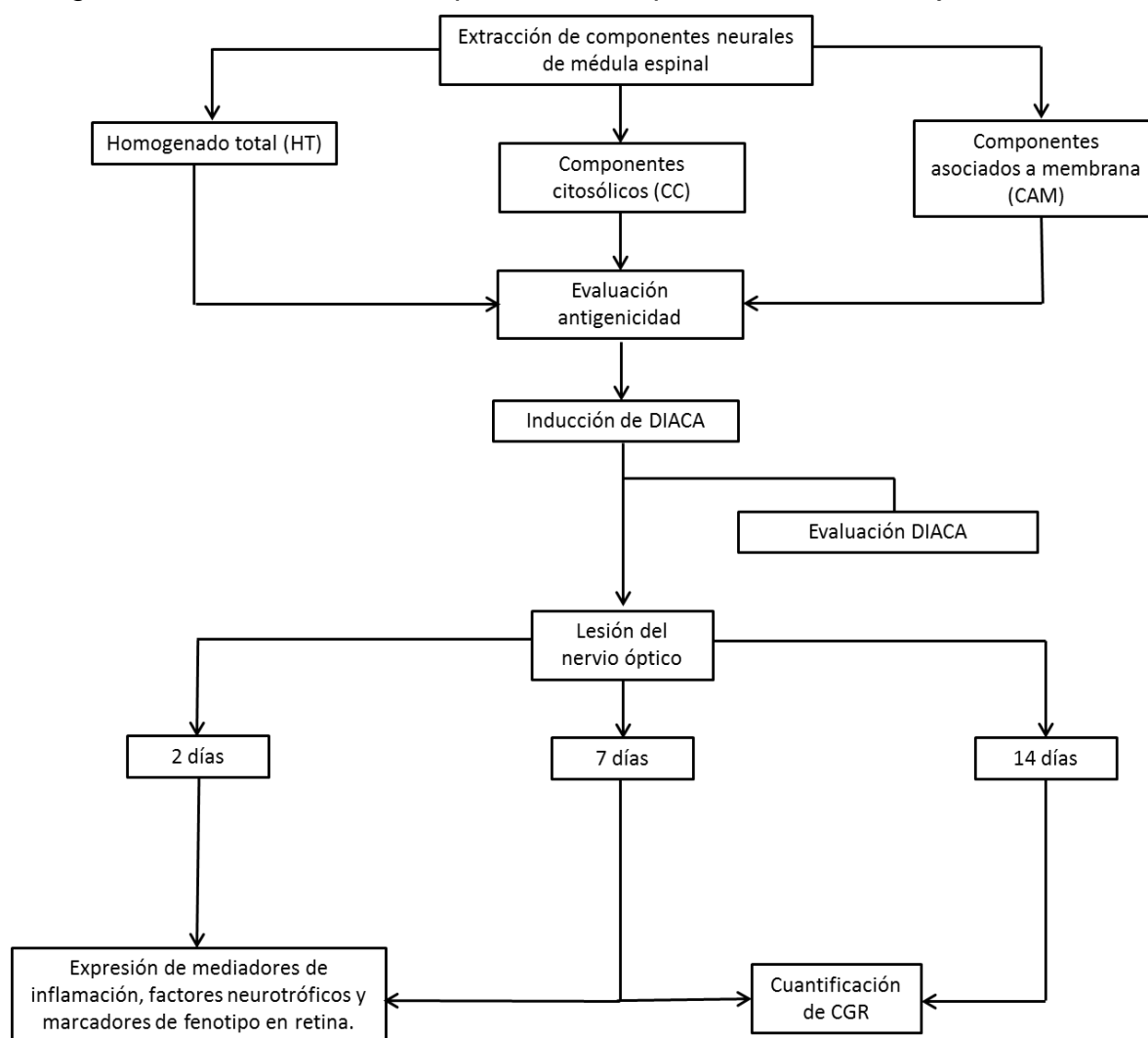


Figura 5. Representación del diseño experimental que muestra los procesos realizados para cumplir con los objetivos del presente proyecto.

7.3.- Inducción post-lesión de la tolerancia inmunológica mediante desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del ojo

Ratas de 60 días de edad (≥ 250 g de peso) fueron profundamente anestesiadas por vía intraperitoneal (i.p.) con una mezcla de ketamina/ clorhidrato de xilacina (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, respectivamente). Cinco minutos después de realizar la lesión del NO, un volumen de 10 μL de HT, CC o CAM (6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Pelayo et al., 2015) fue inyectado en ambos ojos. Como control se utilizó un grupo inoculado únicamente con vehículo (PBS). La inyección en la cámara anterior se realizó bajo microscopio estereoscópico mediante el uso de una jeringa Hamilton y el volumen se liberó manualmente con una velocidad aproximada de 1 $\mu\text{l}/\text{seg}$ (Farooq y Hossam, 2013). Una vez terminada la cirugía, se administró localmente antibiótico (neomicina y polimixina B). Después de que los animales se recuperaron de la anestesia y durante los siguientes tres días fueron monitoreados y recibieron una dosis diaria de analgésico

7.4.- Lesión por compresión del nervio óptico

Previa asepsia de la región ocular los animales fueron sometidos a una cantotomía lateral en el ojo izquierdo, para exponer el nervio óptico. Usando unas pizas calibradas de auto-cierre marca Dumont (Walsh et al., 2014), el nervio óptico fue comprimido durante 5 segundos a una distancia de 1-3 mm del ojo. Una vez terminada la cirugía, se administró localmente antibiótico (neomicina y

polimixina B). Después de que los animales se recuperaron de la anestesia y durante los siguientes tres días fueron monitoreados y recibieron una dosis diaria de analgésico oral (Tempra pediátrico 12.12 mg/kg de peso corporal) (Moalem *et al.*, 2000).

7.5.- Evaluación de la supervivencia de células ganglionares de la retina.

La cuantificación del número de CGR sobrevivientes, las retinas fueron permeabilizadas con tritón x-100 al 0.5% en PBS (PBT) y posteriormente fueron incubadas durante 96 hrs a 4°C con el anticuerpo anti-Brn3a levantado en cabra (diluido 1:100 anti-Brn3a C-20; Santa- Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) en suero de caballo al 0.5% en PBT). Posteriormente las retinas fueron incubadas durante dos hrs con anticuerpo secundario acoplado a biotina (1:500). Al término de este procedimiento el tejido fue lavado con PBT e incubado en diaminobencidina como cromógeno en presencia de peróxido y buffer para desarrollar la reacción enzimática (Vector Stain Kit). Finalmente el tejido fue montado en portaobjetos con PBS/glicerol 80% (Nadal-Nicolás *et al.*, 2009).

La foto documentación de cada retina fue realizada mediante microscopio Leica DM3000 y el programa Leica Application Suite. Se obtuvieron doce fotografías, 4 por cada área de la retina a una magnificación de 400X.. El conteo de células positivas a Brn3a se realizó con la ayuda del programa ImageJ.

8. - Resultados

CAPITULO I

Anterior chamber associated immune deviation to cytosolic neural antigens avoids self-reactivity after optic nerve injury and polarizes the retinal environment to an anti-inflammatory profile.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroimmunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneuroim

Anterior chamber associated immune deviation to cytosolic neural antigens avoids self-reactivity after optic nerve injury and polarizes the retinal environment to an anti-inflammatory profile



Martínez-Alcántar I.^a, Talavera-Carrillo D.K.^a, Pineda-Salazar J.U.^a, Ávalos-Viveros M.^a, Gutiérrez-Ospina G.^b, Phillips-Farfán B.V.^c, Fuentes-Farías A.L.^a, Meléndez-Herrera E.^{a,*}

^a Departamento de Zoología, Instituto de Investigaciones Sobre Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

^b Departamento de Biología Celular y Patología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. de México, México

^c Laboratorio de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Cd. de México, México

ARTICLE INFO

Keywords

Neuroinflammation
Crush injury
Cytokine expression
Immuno-tolerance
Regulatory T cells
Fox-P3

ABSTRACT

It has been hypothesized that anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) to neural antigens induced prior to central nervous system injury can inhibit self-reactivity and lessen secondary degeneration. This work evaluated the effect of ACAID induced to three neural tissue-derived extracts (whole extract, cytosolic extract, CE; or organelle-membrane extract) prior to optic nerve injury on retinal ganglion cell (RGC) survival. The results show that only ACAID to the CE increased RGC survival at 7 and 14 days post-injury (dpi). This effect was achieved by retinal polarization towards an anti-inflammatory profile, driven by regulatory T cells and M2-type macrophages at 7 dpi.

1. Introduction

After central nervous system (CNS) injury, chronic inflammatory processes triggered at the lesion site extend tissue damage and interfere with repair (Fitch et al., 1999; Wattananit et al., 2016). Chronic inflammation is maintained by neural tissue-derived molecules released at the lesion site, which recruit T helper (Th)-1 cells that break self-antigen tolerance and promote secondary neuronal degeneration (Jones et al., 2002, 2005). Thus, post-injury secondary degeneration could be alleviated by avoiding self-reactivity to neural antigens.

Recently, we hypothesized that self-reactivity may be avoided by inducing anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) to neural antigens prior to CNS injury (Toscano-Tejeda et al., 2016). ACAID suppresses antigen-specific Th1 responses (e.g. delayed type hypersensitivity, DTH) by inducing forkhead box P3 (Fox-P3)+ regulatory T cells (Tregs) that inhibit lymphocyte differentiation in secondary lymph tissues, as well as cytotoxic T cell function at the antigen exposure site (Niederkom, 2006; Saban et al., 2008). Accordingly, inducing ACAID to a spinal cord extract or myelin basic protein prior to spinal cord injury improves motor neuron survival and functional recovery. ACAID to the spinal cord extract also promotes a discrete anti-inflammatory profile 60 days post-injury (dpi), likely triggered by Fox-

P3 (Pineda-Rodríguez et al., 2017). However, the effect of ACAID during early post-injury phases, when massive neuronal death occurs, is unknown.

To elucidate how ACAID preserves the nervous tissue and avoids neuronal death after injury, this work used optic nerve crush injury since retinal ganglion cell (RGC) survival after damage is well characterized. In this model, about 50% of RGC die at 5–7 dpi and 75% at 14 dpi (Nadal-Nicolás et al., 2009). The effect of ACAID induced to three neural tissue-derived extracts (whole extract, WE; cytosolic extract, CE; or organelle-membrane extract, OME) was evaluated by quantifying RGC survival at 7 and 14 dpi. The results showed that although all extracts induced ACAID, only the CE preserved RGC survival after optic nerve injury; thus, all further evaluations used this group. Retinal expression of pro- and anti-inflammatory mediators, neurotrophic factors (brain-derived neurotrophic factor, BDNF; neurotrophin 3 and 4, NT-3, NT-4; Oncomodulin, Ocm), survival signals (B-cell lymphoma 2, Bcl-2; Gaspase 3, Gasp-3) or phenotypic markers (Treg-specific marker, Fox-P3; macrophage-specific marker CD68; alternatively-activated macrophage marker Arginase-1, Arg-1) were quantified during acute inflammation (2 and 7 dpi). The results showed that ACAID to the CE highly increased expression of all anti-inflammatory cytokines and modestly increased some inflammatory mediators at both

Abbreviations: ACAID, Anterior chamber-associated immune deviation; CE, Cytosolic extract; OME, Organelle-membrane extract; WE, Whole extract

* Corresponding author.

E-mail address: emelendez@umich.com (E. Meléndez-Herrera).

<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.05.005>

Received 15 November 2018; Received in revised form 9 April 2019; Accepted 6 May 2019
0165-5728/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

dpi. ACAID also increased BDNF expression at 2 dpi but decreased the expression of this neurotrophin, Ocm and Casp-3 at 7 dpi. Additionally, ACAID increased the expression of NT-4, CD68, Arg-1 and Fox-P3 at 7 dpi. Thus, ACAID to the CE improved RGC survival by avoiding self-reactivity and promoting the upregulation of anti-inflammatory cytokines and neurotrophic-survival signals. ACAID probably achieved its effects by increasing Fox-P3+ Treg recruitment at 7 dpi. Interestingly, ACAID likely also increased the recruitment or proliferation of CD68+ macrophages, notably Arg-1+ alternatively-activated macrophages (M2) into the retina. Overall, the findings extend our knowledge about the mechanisms of ACAID action after CNS injury. This includes the interaction between Fox-P3+ Tregs and other cell types to modulate inflammation. It remains to be resolved how ACAID to the CE modulated inflammation and BDNF expression at 2 dpi.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Juvenile (postnatal day 30) and adult (≥ 250 g body weight; > postnatal day 60) female Wistar rats were obtained from our animal facility. They were group housed under standard controlled conditions of temperature and humidity, with a regular light cycle having free access to food and water. Animal handling, feeding and care were done by trained personnel in accordance to the National Institutes of Health *Guide for the care and use of laboratory animals*. All procedures were approved by an Animal Ethics Committee. For each experiment, age- and weight-matched rats from several litters were randomly allocated to each condition. The groups and number of rats used in each experiment are shown in Suppl. Table S1.

2.2. Spinal cord fractionation

Adult female rats were euthanized with sodium pentobarbital (100 mg/kg body weight, i.p.) to obtain neural tissue-derived self-antigens from their spinal cords (thoracic to lumbar levels). All spinal cords were pooled to obtain three different protein extracts (Gil-Dones et al., 2009). Briefly, after cleaning and rinsing with saline solution (0.9%), the tissue was frozen with liquid nitrogen and minced in a mortar. The powder was re-suspended in lysis buffer (300 μ l; 10 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1% β -mercaptoethanol), treated with pre-chilled acetone and centrifuged at 19,000 rpm for 15 min at 4 °C. The supernatant, corresponding to the cytosolic extract (CE, since it had > 70% cytosolic proteins), was recovered and kept at -20 °C.

The remaining pellet was reconstituted with re-suspension buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 5% CHAPS) and centrifuged at 19,000 rpm to obtain the supernatant. This corresponded to the organelle-membrane extract (OME), since it contained mostly (> 40%) organelle and membrane (> 20%) proteins. The whole extract (WE) was obtained by mixing the CE and OME. All extracts were treated with pre-chilled acetone and the total protein concentration was determined using the Lowry method.

2.3. Delayed type hypersensitivity (DTH) tests

DTH is a cell-mediated inflammatory reaction that depends on effector Th1 (CD4+) and cytotoxic (CD8+) lymphocytes (Hwang and Actor, 2001). The antigenic properties of the extracts, vehicle (phosphate-buffered saline, PBS) and the highly antigenic bovine serum albumin (BSA) were evaluated by DTH tests in adult rats (Farooq and Ashour, 2013). PBS, BSA, WE, CE or OME (200 μ l) were intra-dermally injected in the inter-scapular region under deep anesthesia (ketamine/ xylazine i.p.; 75 and 8 μ g/kg, respectively); each supplemented with complete Freund's adjuvant (2.5 μ g/ μ l, 1:1 vol). A week later, rats were challenged intra-dermally (10 μ l) in the left ear with the same extract previously administered (50 μ g/ μ l) and in the right ear with PBS (10 μ l,

0.1 M). Two additional age- and weight-matched groups were used, one was needle-pricked and the other was injected with PBS (10 μ l; edema), both in the left ear. Ear thickness was measured with an electronic micrometer (Mitutoyo Co., Mexico) before treatment (baseline), as well as 24 and 48 h after challenge-treatment. The difference in inflammation was calculated by subtracting baseline values from the data obtained after challenge-treatment.

2.4. ACAID induction

To induce ACAID, juvenile rats were injected (6 μ g/ μ l, 10 μ l volume; according to our previous standardization) with PBS, BSA, WE, CE or OME into the anterior chamber of both eyes after deep anesthesia. This was done at an approximate velocity of 1 μ l/s using a Hamilton syringe coupled to a 31G needle with the aid of a stereoscopic microscope (Farooq and Ashour, 2013). The eyes were protected from drying throughout surgery and the postoperative period with 0.9% saline. ACAID induction was evaluated by DTH tests 14 days after anterior chamber inoculation and compared to the corresponding vehicle group. Moreover, in these rats, splenic Fox-P3 expression was quantified by RT-qPCR 48 h after challenge to confirm ACAID induction.

To measure the ability of cytosolic antigens to produce inflammation in rats tolerant to the WE, a group of rats was inoculated in the anterior chamber with the WE and then intra-dermally sensitized and challenged with the CE as previously described.

2.5. Optic nerve injury and evaluation of RGC survival

To evaluate the effect of ACAID on RGC survival, an additional group of juvenile rats was inoculated in the anterior chamber as previously described with PBS, WE, CE or OME. They were allowed to reach 250 g body weight and subjected to lateral canthotomy of the left eye to expose the optic nerve under deep anesthesia. The optic nerve was compressed for 5 s at a distance of 2–3 mm from the eye cup using auto-lock calibrated Dumont forceps (Walsh et al., 2014). After surgery, the animals were treated with local antibiotic (polymyxin ophthalmic ointment, Santar) and oral analgesic (paracetamol 12.12 mg/kg body weight) for 3 days.

The rats used for ACAID induction and optic nerve crush received a terminal over-dose of sodium pentobarbital at 7 and 14 dpi. Five additional age- and weight-matched groups were used for comparison: a group of naïve rats (basal), a group that was punctured in the anterior chamber (puncture), two groups that were inoculated into the anterior chamber with PBS or CE at postnatal day 30 and a group that was lesioned (injury).

In all groups, RGC quantification and histological analysis were performed by obtaining the eyes and optic nerves and fixing them by immersion in paraformaldehyde (4%; diluted in 0.1 M PBS) for 24 h at 4 °C. The retinas and optic nerves were dissected and post-fixed another 48 h in paraformaldehyde at 4 °C. The retinas were washed with PBS, PT (0.5% Triton X-100, prepared with PBS) and incubated with H₂O₂ (3% prepared with PBS) for 10 min, washed with PT and then incubated in inactivated horse serum (Corning, 35-030-CV; 0.5% prepared in PT) for 60 min. The retinas were then incubated with an antibody for a specific RGC marker, brain-specific homeobox/POU domain protein 3A (Bm-3a goat antibody; Santa-Cruz Biotechnology, sc-31,984; Nadal-Nicolis et al., 2009) diluted 1:100 in PT plus 0.5% inactivated horse serum for 96 h at 4 °C. The retinas were washed and incubated with biotin-coupled donkey anti-goat antibody (Invitrogen, AP180B; 1:500 in PT) at room temperature for 2 h. After washing, the tissue was incubated in ABC HRP kit (Vectastain Elite, PK-6100) at room temperature for 2 h and then incubated in diaminobenzidine as a chromogen, in the presence of peroxide and buffer to develop the enzymatic reaction for 4 min (Vector Staining Kit, SK-4100). Finally, the retinas were mounted onto slides with PBS and 80% glycerol and immediately processed for positive cell counting with ImageJ software. For this

Table 1
Primers used for RT-qPCR.

Gene	Sequence	Tm
GAPDH	Forward: 5'-CACGGCAAGTTCACGGCAGAGT-3' Reverse: 5'-TGAGCGGAAGGGCGGAGAT-3'	60 °C
TNF- α^a	Forward: 5'-TGGGCTTTCATCGGTTCTCACC-3' Reverse: 5'-CCCGAATCAGGGCACTACTT-3'	62 °C
IL-1 β^b	Forward: 5'-TGAGGCTGACAGACCCAAAAGAT-3' Reverse: 5'-GCTCCACGGGAGACATAGGTAG-3'	60 °C
IFN- γ^c	Forward: 5'-AGGGCATCAGCAACAAGATAAAGTG-3' Reverse: 5'-GACAGCLTTGTGCTGGATGCTG-3'	60 °C
iNOS ^d	Forward: 5'-ACACCGATTGCACTGAAC-3' Reverse: 5'-ACCAGCTTTAGTTGAAGCC-3'	60 °C
IL-4 ^e	Forward: 5'-ACCTGCTGTGACGCTGTT-3' Reverse: 5'-TTGTGAGCGTGGACTATTG-3'	60 °C
IL-6 ^f	Forward: 5'-AGGCACTGCTTCCCTACTTCA-3' Reverse: 5'-GCCATTGGCAACTCTTTCTGA-3'	59 °C
IL-10 ^g	Forward: 5'-CAAGCCCTGGGACCCAAAGTA-3' Reverse: 5'-CTCAAGCCTGCACAGCTCC-3'	60 °C
TGF- β^1	Forward: 5'-AGGATGATGTTGAGAACTGCT-3' Reverse: 5'-ATGAGCATCAGGACATCT-3'	60 °C
Ocn ^h	Forward: 5'-TTAAGATGACACATTTGCTGG-3' Reverse: 5'-TCCCTGCTGACACTTTGAG-3'	60 °C
BDNF ⁱ	Forward: 5'-ATTGGTAACTGGGATTC-3' Reverse: 5'-GGTCAGAAATCCA GCGATGATTGC-3'	69 °C
NT-3 ^j	Forward: 5'-GAGCCGAGCCTAC GAGTTTGTGT-3' Reverse: 5'-CTCTGAGTGGGACCTCTG-3'	60 °C
NT-4 ^k	Forward: 5'-CACTCACTGGATGCAAC-3' Reverse: 5'-CCTGAGGCAACCGAAGCC-3'	69 °C
Bcl-2 ^l	Forward: 5'-CCACAAAGGATCCAGCCTC-3' Reverse: 5'-CAATCAAGGAGCGGCTATG-3'	60 °C
Gap-3 ^m	Forward: 5'-TGACAGAAATACAGGGATCTG-3' Reverse: 5'-CTGTTGGGMAATA CAAGCA-3'	60 °C
CD68 ⁿ	Forward: 5'-GCGCAGAGAGATGGTC-3' Reverse: 5'-AAAGCCCATAGAGATTATGGAGCG-3'	69 °C
Arg-1 ^o	Forward: 5'-AGAGAGGTCGCAAGGCACTGCC-3' Reverse: 5'-TGAGCTGGCTGCAATTCTGG-3'	60 °C
Fox P3 ^p	Forward: 5'-ATCTAGCTGCTGTCATGAGGTGA-3' Reverse: 5'-ATCTAGCTGCTGTCATGAGGTGA-3'	60 °C

^a Roque et al. (2016).

^b Gu et al. (2012).

^c Han et al. (2015).

^d Sewell et al. (1998).

^e Huang et al. (2010).

^f Le Ludeuc et al. (2008).

^g Hank et al. (2008).

^h Ming et al. (1999).

ⁱ Chaudhary et al. (1999).

^j Wu et al. (2002).

^k Zorzi et al. (2010).

^l Klasen et al. (2001).

^m Bai et al. (2012).

procedure, 12 photographs were obtained per retina, one for each quadrant of the central, medial and peripheral regions (Nadal-Nicolás et al., 2009). Photographs of each retina were taken with a Leica DM3000 microscope using the Leica Application Suite software.

In all cases, injury level and severity were corroborated by optic nerve histology. For this, the optic nerves were washed with PBS and then dehydrated, paraffin embedded and longitudinally sectioned (7 μ m) with a microtome (Microm). The sections were rehydrated, stained with hematoxylin-eosin dyes and mounted with Cytoseal-60 (Richard-Allan Scientific, 8310-16). Photographs of the lesion site were obtained to document lesion severity.

2.6. mRNA expression analysis with RT-qPCR

The primers used are shown in Table 1. At least two independent replications of each experiment were performed in all cases. Each RNA sample was run in duplicate.

2.6.1. Spleen

After ACAID induction and DTH evaluation, animals inoculated into the anterior chamber, immunized and challenged with the three neural tissue-derived fractions and their respective vehicle groups were used to quantify Fox-P3 mRNA expression. The spleens were removed under terminal anesthesia 48 h after ear challenge (during maximum inflammation), frozen-pulverized with liquid nitrogen and homogenized with TRIzol[®] reagent (Invitrogen, 15,596,026) during 5 min. The samples were incubated with chloroform, subjected to vortex and centrifuged at 12,000 \times g for 15 min at 4 °C. The supernatant was obtained, mixed with 2-propanol and centrifuged at 12,000 \times g for 15 min at 4 °C. The RNA pellet was washed with 70% ethanol and re-suspended in RNase-free water (Invitrogen, 10977-015). RNA concentration was determined using a Nanodrop Lite spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). cDNA was synthesized with an iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (BioRad, SF1725038) and amplified with the CFX96 Touch[™] RT-qPCR Detection System using the SsoAdvanced[™] Universal SYBR[®] Green Supermix (BioRad, 1,725,270). Relative mRNA amounts were analyzed with the 2 Δ Ct method, using GAPDH as the reference gene. GAPDH primers were a generous gift from Dr. Alejandra Ochoa Zarnosa (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México).

2.6.2. Retina

Rats inoculated in the anterior chamber with the CE followed by optic nerve crush were sacrificed 2 and 7 dpi. Their retinas were dissected and frozen at -80 °C. Total RNA was extracted, quantified, amplified and analyzed in the same manner as in the spleen.

2.7. Statistical analysis

Data normality and equal variance were analyzed by Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Non-parametric tests were used when the data did not satisfy either of the above criteria. All analyses were performed using SigmaStat 8.0 software. The specific tests used to analyze each experiment are shown in Suppl. Tables S1 and S2.

The response of rats tested with the extracts (WE, CE, OME) for DTH and for RGC quantification at 7 dpi was compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Holm-Sidak tests. On the other hand, the response of rats inoculated with the CE was compared to that of the vehicle-treated group for ACAID, RGC quantification at 14 dpi and mRNA expression by independent *t*-tests. All data are shown as means \pm SD.

3. Results

3.1. Neural tissue-derived extracts induced a differential antigenic response

Ear inflammation after immunization and challenge with each extract was compared to vehicle (PBS) or to BSA, the gold standard for DTH tests due to its high antigenic capacity. All three neural tissue-derived extracts showed inflammation indexes significantly different from vehicle, but not different from BSA. The CE induced a stronger response than the WE (Fig. 1). These results were specific since needle-prick, edema or vehicle groups showed minimal ear inflammation (Suppl. Fig. S1A).

3.2. Neural tissue-derived extracts injected into the anterior chamber induced systemic antigen-specific immune-tolerance

Once antigenicity for all neural tissue-derived extracts was determined, each extract was inoculated into the anterior chamber of juvenile rats. Two weeks (14 days) after inoculation, systemic antigen-specific immune-tolerance (ACAID) was evaluated by DTH tests. The results showed that inoculation of each extract into the anterior chamber attenuated systemic inflammation, in comparison with vehicle

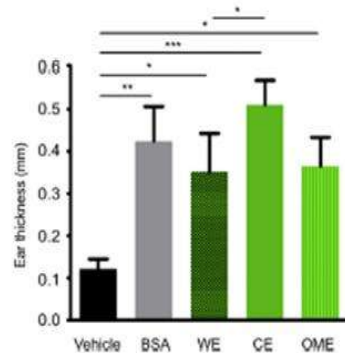


Fig. 1. Neural tissue-derived extracts induced different antigenic reactions. DTH results showing ear swelling measured 48 h after challenge with neural tissue-derived extracts (whole extract, WE; cytosolic extract, CE; or organelle-membrane extract, OME), compared to vehicle (PBS) or bovine serum albumin (BSA). * $p \leq .05$, ** $p \leq .01$, *** $p \leq .001$.

groups (Fig. 2A–C). In all cases, the reduction in inflammation was comparable with that measured in the group inoculated with BSA (Suppl. Fig. S1B).

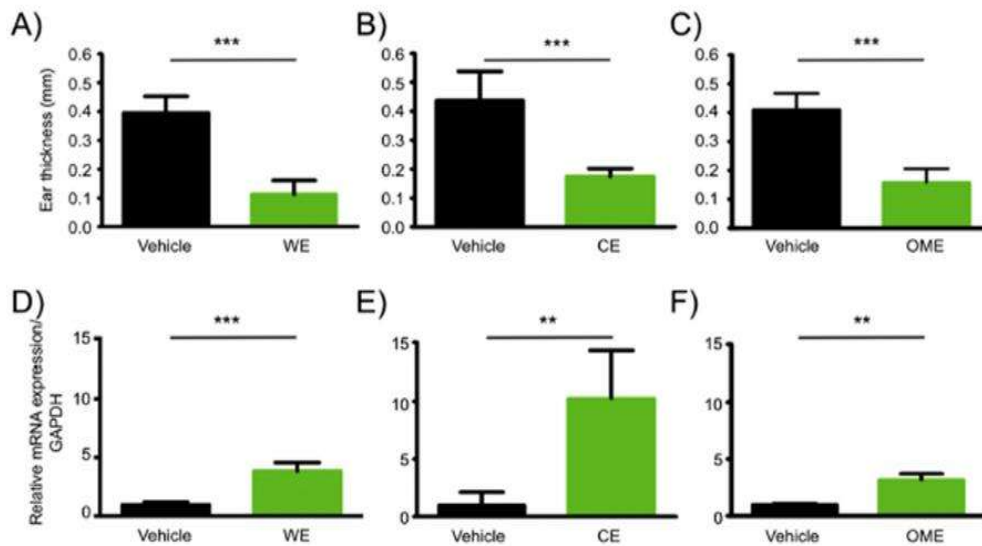
In addition, induction of ACAID was verified by quantifying the

relative expression of Fox-P3 mRNA in the spleen of rats inoculated with each fraction. Splenic Fox-P3 expression was increased in each group in comparison to the vehicle (Fig. 2D–F) and basal groups (not shown). Interestingly, ACAID to the CE increased Fox-P3 expression to a greater extent than the other fractions (Fig. 2D–F).

The ability of cytosolic antigens to be recognized by the immune system of rats tolerized with the WE was evaluated by DTH tests. The results show that inoculation of the WE into the anterior chamber failed to attenuate systemic inflammation elicited by the CE, evidenced by similar ear inflammation as in the group inoculated in the anterior chamber with PBS (Suppl. Fig. S1C).

3.3. ACAID to the CE, induced prior to optic nerve injury, improved RGC survival

Three groups of rats were inoculated with each extract, injured and sacrificed at 7 dpi to evaluate the effect of ACAID compared to PBS, basal, puncture, PBS/CE intracameral delivery and injury-only groups. The retinas from these groups were dissected and immuno-stained for Brn-3a (Suppl. Fig. S2). The results show that all injured groups were statistically different from the basal group. However, rats where ACAID was induced by the CE showed the highest RGC survival at 7 dpi, compared to all other groups (although it was not statistically different from the injury-only group, Fig. 3A–B). The number of Brn-3a+ RGC did not show significant differences among the other groups (Fig. 3A–B). The basal, puncture and PBS or CE-anterior chamber inoculated groups showed a similar number of surviving RGC (Suppl. Fig. S3). The effect of the CE was maintained at 14 dpi compared to vehicle



AC inoculation	PBS	WE	PBS	CE	PBS	OME
Interscapular immunization	WE	WE	CE	CE	OME	OME
Ear challenge	WE	WE	CE	CE	OME	OME

Fig. 2. Neural tissue-derived extracts induced ACAID. DTH data showing ear swelling for rats inoculated in the anterior chamber with neural-tissue derived extracts (whole extract, WE; cytosolic extract, CE; or organelle-membrane extract, OME) compared to vehicle inoculated rats (A–C). Relative splenic Fox-P3 mRNA expression of rats inoculated in the anterior chamber with the WE, CE or OME or their corresponding vehicle (D–F). Vehicle groups were inoculated in the anterior chamber with PBS, but immunized and challenged with the corresponding neural tissue-derived extract for DTH tests. ** $p \leq .01$, *** $p \leq .001$.

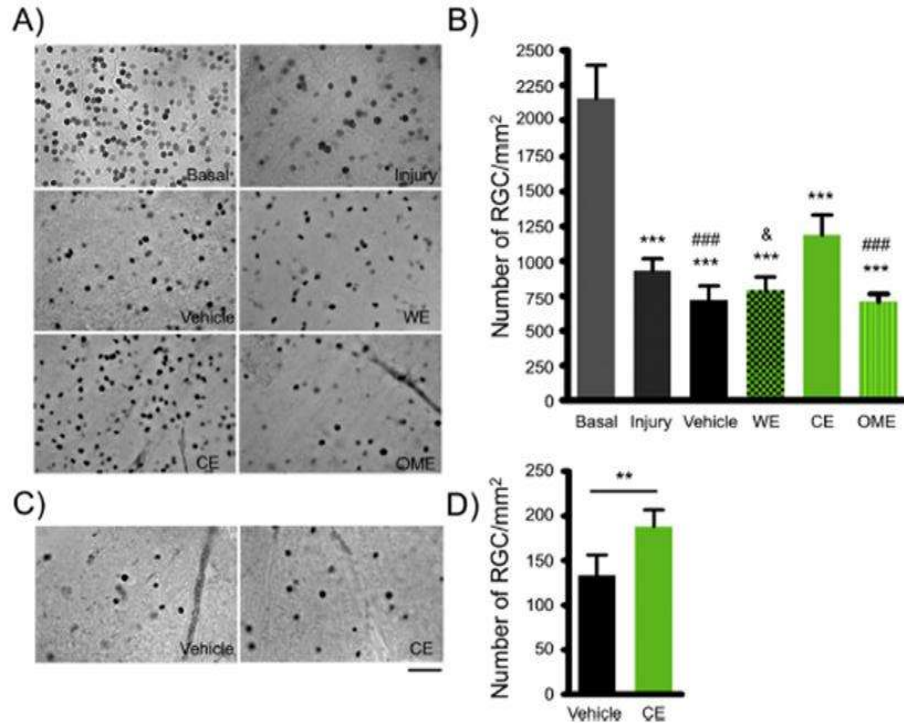


Fig. 3. ACAID to cytosolic antigens improved retinal ganglion cell survival after optic nerve crush injury. Representative photomicrographs showing Brn3a+ surviving retinal ganglion cells (RGC) at 7 (A) or 14 (C) days after optic nerve crush injury in animals inoculated with neural tissue derived extracts (whole extract, WE; cytosolic extract, CE; or organelle-membrane extract, OME) compared to vehicle inoculated and injury-only rats, as well to the basal group. Quantification of surviving RGC at 7 (B) and 14 (D) days after optic nerve crush in basal, injury, vehicle, WE, CE or OME groups. Scale bar = 50 μ m. Basal vs. all groups $***p \leq .001$; CE vs. vehicle and OME, $***p \leq .001$; CE vs. WE, $^{\#}p \leq .01$.

(Fig. 3C–D) and OME (data not shown).

3.4. ACAID to CE biased the retinal microenvironment to an anti-inflammatory profile

The retinal inflammatory profile was studied at 2 and 7 dpi by quantitative RT-qPCR in rats inoculated into the anterior chamber with the CE and injured (Suppl. Fig. S2). The results showed that ACAID to the CE increased expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and INF- γ and decreased iNOS expression at 2 dpi (Fig. 4A); while increasing TNF- α , INF- γ and iNOS at 7 dpi (Fig. 4B). Additionally, ACAID to the CE increased all anti-inflammatory cytokines at both dpi. Particularly notable was the highly increased IL-4 expression at both dpi and that of IL-6 at 7 dpi (Fig. 4).

The inflammatory profile induced by ACAID to the CE also differentially modified the retinal expression of neurotrophic and survival factors early after optic nerve injury, by increasing BDNF expression at 2 dpi and decreasing it at 7 dpi (Fig. 5A and B). ACAID to the CE also decreased Ocm and Casp-3 expression at 7 dpi, as well as increasing NT-4 expression, with no changes at 2 dpi. (Fig. 5C and D).

3.5. The effects of ACAID to the CE are mediated by regulatory T cells and M2 macrophages

To elucidate the cell types involved in the regulation of the anti-

inflammatory profile induced by ACAID to the CE in the retina, the expression of phenotypic markers for Tregs (Fox-P3), macrophages (CD68) and alternatively-activated macrophages (Arg-1; M2 type) were quantified. The results showed that the expression of the three markers significantly increased at 7 dpi, with no changes at 2 dpi. Most notable was the increase in Arg-1 expression (Fig. 5E and F).

4. Discussion

ACAID may be used to avoid self-reactivity to neural antigens and thus reduce secondary neuronal death after CNS traumatic injury and neurodegenerative diseases (Toscano-Tejeda et al., 2016). Previous studies on multiple sclerosis (Bhowmick et al., 2011; Farooq and Ashour, 2013) and spinal cord injury (Pineda-Rodríguez et al., 2017) suggest that this may be the case. However, the mechanisms by which secondary neurodegeneration is prevented have not been fully described. In this study, ACAID was induced to three neural tissue-derived extracts prior to optic nerve injury and its effect on retinal ganglion cell (RGC) survival was evaluated. The results show that only ACAID to the CE increased RGC survival by inducing a retinal micro-environment featuring upregulation of anti-inflammatory mediators and neurotrophic/survival signals. Moreover, this study shows that the anti-inflammatory effects of ACAID to the CE are mediated by other cell populations in addition to Tregs, as evidenced by increased expression of markers for macrophages and alternatively activated macrophages

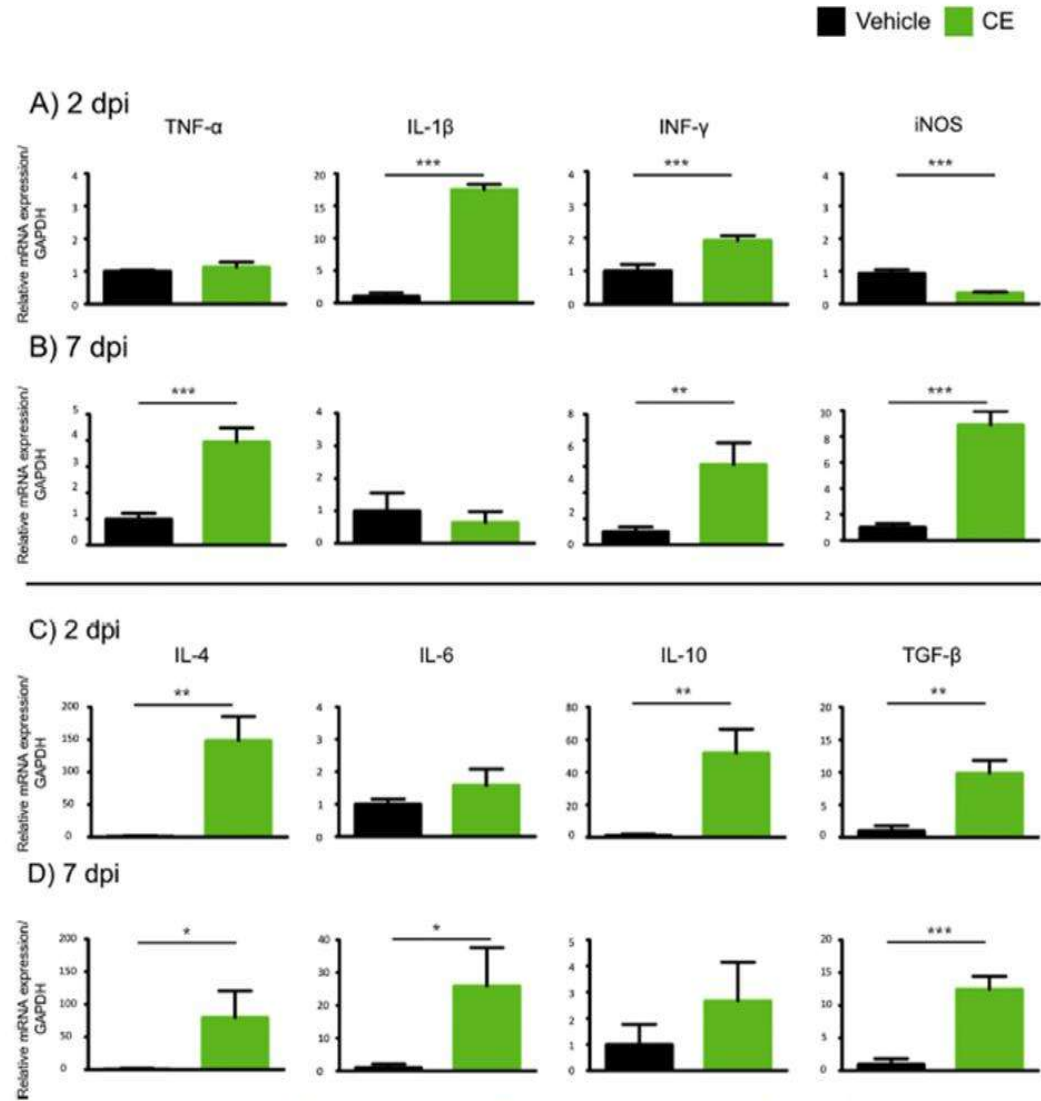
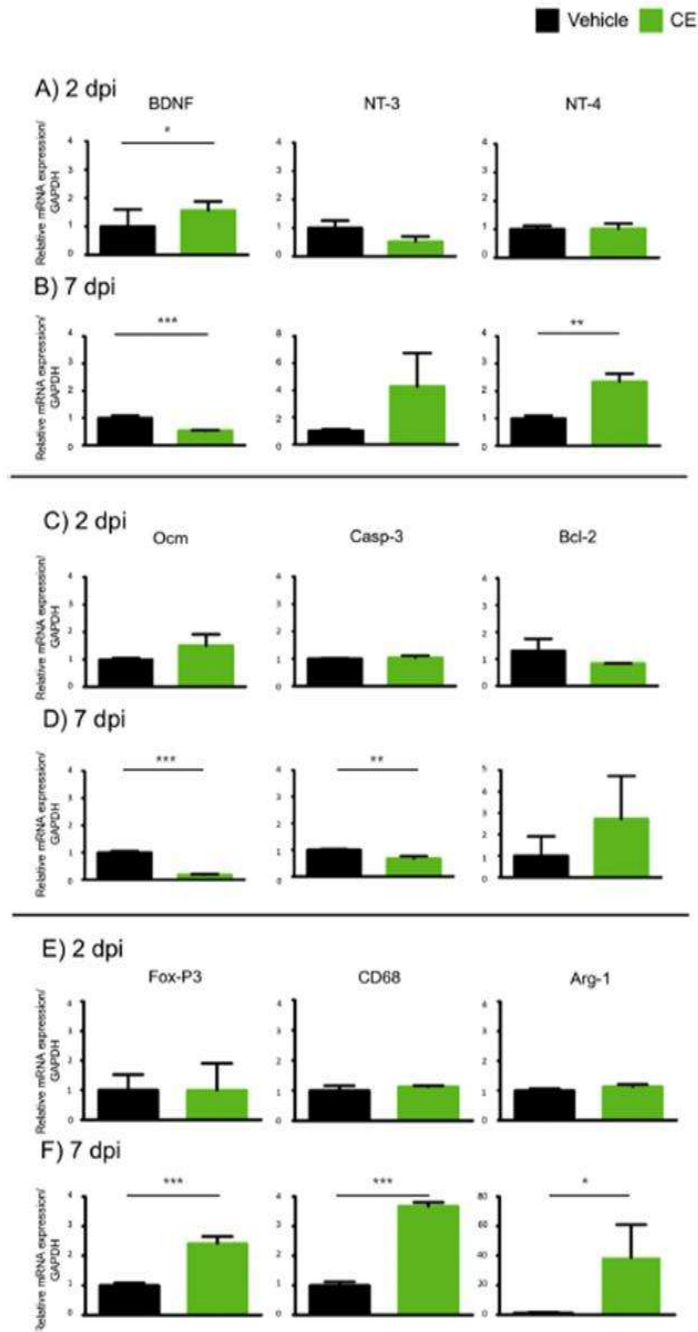


Fig. 4. ACAID to cytosolic antigens modified the retinal inflammatory profile early after optic nerve injury. Quantification of relative mRNA expression of pro-inflammatory (A-B) and anti-inflammatory mediators (C-D) in the retina at 2 and 7 days post-injury (dpi) in vehicle inoculated rats and in animals inoculated with the cytosolic extract (CE). Tumor necrosis factor, TNF; interleukin, IL; interferon, INF; inducible nitric oxide synthase, iNOS; transforming growth factor, TGF. * $p \leq .05$, ** $p \leq .01$, *** $p \leq .001$.

(M2) after optic nerve injury.

The data show that the CE was the most reliable source of immunotolerogenic neural antigens. Accordingly, the CE was the only neural tissue-derived fraction that significantly reduced secondary neuronal death after optic nerve injury compared to all rats inoculated in the anterior chamber and lesioned. This effect was presumably related to the increased ability of ACAID to the CE to induce Tregs, as shown by

increased splenic Fox-P3 expression. These actions were specific to the CE, since neither the WE nor the OME showed similar effects. Interestingly, although the WE contains both the CE and OME, tolerization with the WE did not avoid inflammation in rats sensitized and challenged with the CE. This fact suggests that cytosolic antigens are unrepresented in the WE and fail to be recognized by the immune system and to lessen the inflammatory response associated to RGC



(caption on next page)

Fig. 5. ACAID to cytosolic antigens modulated neurotrophic, survival and phenotypic marker expression after optic nerve injury. Quantification of relative mRNA expression of neurotrophic factors and survival signals (A-D) as well as phenotypic markers (E-F) in the retina at 2 and 7 days post-injury (dpi) in vehicle inoculated rats and animals inoculated with the cytosolic extract (CE). Brain derived neurotrophic factor, BDNF; neurotrophin, NT; oncomodulin, Ocm; caspase 3, Casp-3; B-cell lymphoma 2, Bcl-2; Forkhead Box P3, Fox-P3; cluster of differentiation, CD; arginase, Arg. *p < .05, **p < .01, ***p < .001.

death after optic nerve injury. Although a direct comparison with prior work (Pineda-Rodríguez et al., 2017) was not done, extractions protocols suggest that their SCE corresponds to our OME-WE. The effects associated with different spinal cord-derived extracts may be related to the concentration of neural antigenic determinants present in each fraction and to the injury site. Further studies should determine the proteins found in each extract and their concentration.

ACAID to the CE preserved approximately 55% of the RGC with respect to intact animals at 7 dpi (22% more cells than vehicle, 19% more than WE and 23% more than OME groups but only 12% more cells than the injury group). The injury-only group showed a higher RGC survival than the groups where ACAID was induced with the WH, OME or even inoculated with vehicle. Previous studies showed that a single (25 μ l; Benozzi et al., 2002) or chronic intracameral delivery of vehicle (20 μ l, once per week; Urcola et al., 2006) did not increase intraocular pressure (IOP; Benozzi et al., 2002; Urcola et al., 2006) or decrease RGC survival in rats (Urcola et al., 2006). Moreover, although a single intracameral delivery of hyaluronic acid can transiently increase IOP in rats, chronic injections are required to sustain an elevated IOP and to trigger RGC death (Benozzi et al., 2002; Moreno et al., 2005). Thus, it is unlikely that intracameral injection (10 μ l per eye) increased IOP. This evidence, together with the results presented in this study showing that a single intracameral puncture or injection of vehicle/CE in juvenile animals did not alter the number of surviving RGC in adults, suggests that although manipulation per se does not kill cells it sensitizes them to trauma. Further studies should evaluate the true impact of ACAID to the CE on RGC survival using adoptive cell transfer.

A remarkable result obtained in this work was that ACAID to the CE modulated the retinal inflammatory response. Indeed, overall ACAID to the CE promoted the expression of all anti-inflammatory cytokines while blunting or increasing the expression of some pro-inflammatory cytokines. This is not surprising since a balanced interplay of both pro- and anti-inflammatory cytokines is required to prevent secondary neuronal damage (Carlson et al., 1999; Leibinger et al., 2013; Raposo et al., 2014; Tyor et al., 2002; Wattananit et al., 2016). However, the notorious upregulation of anti-inflammatory cytokines since early post-injury stages suggests that ACAID to the CE polarized the inflammatory retinal environment towards a restorative profile. In this line, this work also evaluated the expression of some neurotrophic factors that have demonstrated neuroprotective effects in early stages after the injury.

The results showed that ACAID to the CE up-regulated the expression of neurotrophic/survival factors such as BDNF at 2 dpi and NT-4 at 7 dpi, while down-regulating the expression of BDNF and Casp-3 at 7 dpi. Together, these results suggest that ACAID to the CE modulates the expression of some proteins that promote neuronal survival after optic nerve injury, which likely supports RGC survival at 7 dpi (Cohen-Cory and Fraser, 1994; Peinado-Ramón et al., 1996; Sánchez-Migallón et al., 2016). However, given the limited RGC survival observed between 7 and 14 dpi, the results suggest that modulation of the inflammatory profile promoted by ACAID to the CE is not enough to guarantee RGC long-term survival, at least after optic nerve injury.

ACAID to the CE also decreased the expression of retinal Ocm at 7 dpi. Ocm is another neurotrophic factor that promotes axon regeneration and RGC survival; its action is closely associated to pro-inflammatory neurotrophins and macrophages recruited to the retina after lens injury (Yin et al., 2006; Kurimoto et al., 2013). Down-regulation of Ocm expression after CE-induced ACAID induction is congruent with its effects.

ACAID to the CE increased the expression of Fox-P3 (Treg specific marker) at 7 dpi. Previous work has shown that ACAID reduces antigen-

specific inflammatory responses mainly by inducing CD4+ and CD8+CD25+Fox-P3+ Tregs (Farooq and Ashour, 2013; Farooq et al., 2014; Saban et al., 2008; Pineda-Rodríguez et al., 2017). Since the Th1 response is triggered by neural antigens during acute inflammatory responses around 6–9 dpi, increased expression of Fox-P3 induced by ACAID to the CE was expected at 7 dpi. Our results support this hypothesis and show that ACAID to the CE accelerated Treg recruitment to the lesion site by at least a week, since it has been observed that Treg-mediated regulation starts around 14 dpi (unpublished data).

ACAID to the CE also increased CD68, Arg-1 and anti-inflammatory cytokine expression, suggesting that CE-specific Tregs induce the recruitment/differentiation of M2-type macrophages in the retina at 7 dpi. This result is supported by previous work showing that CD4+CD25+ Tregs induce the differentiation of M2 macrophages, which display Arg-1 activity and produce IL-10 (Liu et al., 2011). Since it has been shown that peripheral cells are the primary source of alternatively activated macrophages after optic nerve injury (Wahh et al., 2014), our results suggest that ACAID to the CE may modulate inflammation triggered by both adaptive and peripheral innate immune cells. The regulation of lymphoid lineage cells may be mediated by Treg recruitment at 7 dpi, while the effect on myeloid cells may occur by Arg-1 dependent (at 7 dpi) and independent mechanisms (at 2 dpi). To our knowledge, these findings have not been previously reported and have important implications to the mechanism of action of ACAID.

In conclusion, ACAID to the CE induced prior to optic nerve injury reduced self-reactivity and polarized the retina to an anti-inflammatory milieu promoted by Tregs and M2-type macrophages. However, since anterior chamber inoculation aggravated RGC death after optic nerve injury, the neuroprotective potential of ACAID to the CE after optic nerve injury was limited. Nonetheless the results presented in this paper contribute to elucidate the mechanisms triggered by ACAID to decrease secondary degeneration and highlight its potential to regulate inflammation mediated by innate and adaptive immunity.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.05.005>.

Acknowledgements

The authors thank M.C. David González Mendoza, M.V.Z. Madeline Hernández Rebollar and Biol. Edel Pineda López for their valuable technical assistance, as well as Dr. Alejandra Ochoa Zarzosa for her generous gift of GAPDH primers.

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT no. 180762 to EM-H and no. 258747 to AF-F). Additional funding was provided by grants from the Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH. LM-A and DKT-C are Ph.D. and M.S. fellows from CONACYT.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bai, J., Qiu, S.J., Zhong, X.N., Huang, Q.P., He, Z.Y., Zhang, J.Q., Liu, G.N., Li, M.H., Deng, J.M., 2012. Erythromycin enhances CD4+Foxp3+ regulatory T cell responses in a rat model of smoke-induced lung inflammation. *Mol. Cell. Immunol.* 2012, 1–9.
- Benozzi, J., Nahum, L.P., Campanelli, J.J., Rosenstein, R.E., 2002. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 2196–2200.
- Bhowmik, S., Clark, R.B., Brocke, S., Coon, R.E., 2011. Antigen-specific splenic CD4+ and CD8+ regulatory T cells generated via the eye, suppress experimental autoimmune encephalomyelitis either at the priming or at the effector phase. *Int.*

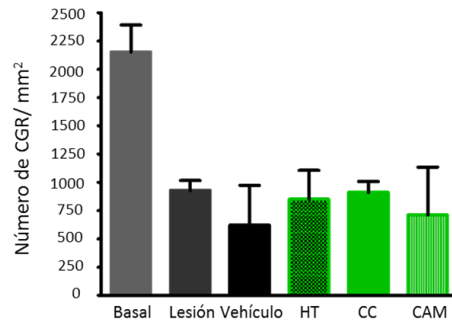
- Immunol. 23 (2), 119–128.
- Carlson, N.G., Wiegand, W.A., Chen, J., Bacchi, A., Rogers, S.W., Gahring, L.C., 1999. Inflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and TNF- α impart neuroprotection to an excitotoxic through distinct pathways. *J. Immunol.* 163 (7), 3963–3968.
- Chaudhary, P., Ahmed, F., Qureshi, P., Sharma, S.C., 1999. Caspase inhibitors block the retinal ganglion cell death following optic nerve transection. *Mol. Brain Res.* 67 (1), 36–45.
- Gohen-Gory, S., Fraser, S.F., 1994. BDNF in the development of the visual system of *Xenopus*. *Neuron* 12 (4), 747–761.
- Farooq, S.M., Ashour, H.M., 2013. Eye-mediated induction of specific immune tolerance to encephalitogenic antigens. *CNS Neurosci. Ther.* 19 (7), 503–510.
- Farooq, S.M., Kumar, A., Ashour, H.M., 2014. Eye-mediated immune tolerance to type II collagen in arthritis-prone strains of mice. *J. Cell. Mol. Med.* 18 (12), 2512–2518.
- Fitch, M.T., Doller, C., Combs, C.K., Landreth, G.E., Silver, J., 1999. Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. *J. Neurosci.* 19 (19), 8182–8198.
- Gil-Dones, F., Alonso-Orgaz, S., Avila, G., Martín-Rojas, T., Moral-Darde, V., Barroso, G., Barbeiras, M.G., 2009. An optimal protocol to analyze the rat spinal cord proteome. *Biomark. Insights* 4, 135–164.
- Gu, W., Xu, W., Ding, T., Guo, X., 2012. Fringe controls naive CD4(+) T cells differentiation through modulating notch signaling in asthmatic rat models. *PLoS One* 7 (10), e47288.
- Han, Z.M., Jiang, Y.L., Duan, Y.Y., Wang, X.Y., Huang, Y., Fang, T.Z., 2015. Protective effects of hydrogen sulfide inhalation on oxidative stress in rats with corticosterone-induced lung injury. *Exp. Ther. Med.* 10 (1), 164–168.
- Hauk, T.G., Müller, A., Lee, J., Schwendener, R., Fischer, D., 2008. Neuroprotective and axon growth promoting effects of intraocular inflammation do not depend on oncomodulin or the presence of large numbers of activated macrophages. *Exp. Neurol.* 209 (2), 469–482.
- Huang, Y., Shan, J., Zhang, C., Zhang, J., Feng, L., Li, S., Li, Y., 2010. Peripheral blood T regulatory cell counts may not predict transplant rejection. *BMC Immunol.* 11, 40.
- Hwang, S.A., Actor, J.K., 2001. Hypersensitivity: T lymphocyte mediated (Type IV). *eLS* Jones, T.B., Rasso, D.M., Sodhi, A., Pan, J.Z., Hart, R.P., MacCallum, R.C., Lee, S., Whitmore, C.C., Popovich, P.G., 2002. Pathological CNS autoimmune disease triggered by traumatic spinal cord injury: implications for autoimmune vaccine therapy. *J. Neurosci.* 22 (7), 2690–2700.
- Jones, T.B., Hart, R.P., Popovich, P.G., 2005. Molecular control of physiological and pathological T-cell recruitment after mouse spinal cord injury. *J. Neurosci.* 25 (28), 6576–6583.
- Knaeu, S., Hammermann, R., Fuhrmann, M., Lindemann, D., Beck, K.F., Pfeilschifter, J., Racké, K., 2001. Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 132 (6), 1349–1357.
- Kudamoto, T., Yin, Y., Habboub, G., Gilbert, H.Y., Li, Y., Nakao, S., Benowitz, L.L., 2013. Neutrophils express oncomodulin and promote optic nerve regeneration. *J. Neurosci.* 33 (37), 14816–14824.
- Le Luduec, J.B., Coudamine, T., Louvet, C., Thebaud, P., Heslan, J.M., Heslan, M., Chiffolleau, E., Cunier, M.C., 2008. An immunomodulatory role for follicle-stimulating hormone in heart allograft transplantation. *Am. J. Transplant.* 8, 2297–2306.
- Leibinger, M., Andreadaki, A., Diekmann, H., Fischer, D., 2013. Neuronal STAT3 activation is essential for CNTF and inflammatory stimulation-induced CNS axon regeneration. *Cell Death Dis.* 4 (9), e805.
- Liu, G., Mi, H., Qiu, L., Li, L., Cao, Y., Ma, J., Zhao, Y., 2011. Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4+ CD25+ T cells in mice. *Immunol. Cell Biol.* 89 (1), 130–142.
- Ming, Y., Bergman, E., Edström, E., Ulfhake, R., 1999. Reciprocal changes in the expression of neurotrophin mRNAs in target tissues and peripheral nerves of aged rats. *Neurosci. Lett.* 273 (3), 187–190.
- Moreno, M.C., Aldana Marcos, H.J., Cruzato, J.O., Sando, P.H., Campaodelli, J., Jallifa, C.O., Benozzi, J., Rosenstein, R.F., 2005. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injection of hyaluronic acid. *Exp. Eye Res.* 81 (1), 71–80.
- Nadal-Nicolás, F.M., Jiménez-López, M., Salinas Navarro, M., Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M., Agudo, M., 2017. Microglial dynamics after axotomy-induced retinal ganglion cell death. *J. Neuroinflammation* 14 (218), 1–15.
- Niederkrorn, J.Y., 2006. See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nat. Immunol.* 7 (4), 354–359.
- Peinado-Ramón, P., Salvador, M., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 1996. Effects of axotomy and intracocular administration of NT-4, NT-3, and BDNF on the survival of adult rat retinal ganglion cells: a quantitative in vivo study. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 489–500.
- Pineda-Rodríguez, R., Toscano-Tejeda, D., García-Barra, E., Rodríguez-Barraza, R., Flores-Romero, A., Castellanos-Canales, D., Barra, A., 2017. Anterior chamber associated immune deviation used as a neuroprotective strategy in rats with spinal cord injury. *PLoS One* 12 (11), e0188506.
- Raposo, C., Grunhardt, N., Göbel, M., Elma, C., Loudon, A., Berkutski, T., Schwann, M., 2014. CNS repair requires both effector and regulatory T cells with distinct temporal and spatial profiles. *J. Neurosci.* 34 (31), 10141–10152.
- Roque, A., Ochoa-Zamora, A., Turner, I., 2016. 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 Behav. Immun.* 55, 39–48.
- 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. *Mol. Vis.* 14 (December), 2435–2442.
- Sánchez-Migallón, M.C., Valiente-Soriano, F.J., Nadal-Nicolás, F.M., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriso, 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. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57 (1), 81–93.
- Sewell, W.A., Scurr, L.L., Orphanides, H., Kinder, S., Indowkye, R.L., 1998. Induction of interleukin-4 and interleukin-5 expression in mast cells is inhibited by glucocorticoids. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5 (1), 18–23.
- Toscano-Tejeda, D., Barra, A., Phillips-Farfán, R.V., Fuentes-Farfán, A.I., Méndez-Herrera, E., 2016. ACAID as a potential therapeutic approach to modulate inflammation in neurodegenerative diseases. *Med. Hypotheses* 88, 38–45.
- Tytor, W.R., Avgeropoulos, N., Ohlandt, G., Hogan, E.L., 2002. Treatment of spinal cord impact injury in the rat with transforming growth factor- β . *J. Neurosci.* 200 (1), 33–41.
- Urcola, J.H., Hernández, M., Vecino, E., 2006. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp. Eye Res.* 83, 429–437.
- Walsh, J.T., Zheng, J., Smirnov, I., Lomax, U., Tung, K., Kipnis, J., 2014. Regulatory T cells in central nervous system injury: a double-edged sword. *J. Immunol.* 193 (10), 5013–5022.
- Watanashi, S., Tornese, D., Grunhardt, N., Memanishvili, T., Monni, E., Tatarishvili, J., Schwartz, M., 2016. Monocyte-derived macrophages contribute to spontaneous long-term functional recovery after stroke in mice. *J. Neurosci.* 36 (5), 4182–4195.
- Wu, J., Gorman, A., Zhou, X., Sandra, C., Chen, E., 2002. Involvement of caspase-3 in photoreceptor cell apoptosis induced by in vivo blue light exposure. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43 (10), 3349–3354.
- Yin, Y., Heud, M.T., Lorber, B., Nakazawa, T., Thomas, T.J., Jiang, F., Benowitz, L.L., 2006. Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells. *Nat. Neurosci.* 9 (6), 843–852.
- Zorn, P., Aplin, A.C., Smith, K.D., Nicolls, R.F., 2010. Technical advance: the rat aorta contains resident mononuclear phagocytes with proliferative capacity and proangiogenic properties. *J. Leukoc. Biol.* 88 (5), 1051–1059.

9.- Resultados adicionales

9.1.- Efecto de la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior del ojo inducida posterior a la lesión en el nervio óptico sobre la supervivencia de las células ganglionares de la retina.

De acuerdo con nuestros resultados la inducción de DIACA favorece la supervivencia de las CGR, cuando la inducción de la tolerancia es previa a la lesión del NO. Por lo tanto, se decidió evaluar el efecto que tiene la inducción de DIACA posterior a la lesión. Cinco minutos después de la lesión se inocularon las fracciones en la cámara anterior y las ratas fueron sacrificadas a los 7 días posteriores a la lesión y la retina fue disecada para su análisis. Los resultados muestran que los grupos inoculados con las diferentes fracciones (HT, CC y CAM) no presentaron diferencias en el número de CGR sobrevivientes al trauma comparado con el grupo inoculado con el vehículo, como se puede observar en la figura 6A. Así mismo, con el objetivo de evaluar si la inducción de la tolerancia podría reducir la pérdida de las CGR de forma particular para cada región de la retina se cuantificaron las CGR Brn3a+ en cada una de las diferentes áreas (central, media y periférica); sin embargo los resultados mostraron que no hay cambios en el número de CGR supervivientes en las diferentes áreas de la retina (figura 6B).

A) Cuantificación global de CGR en la retina



A) Cuantificación de CGR por áreas de la retina

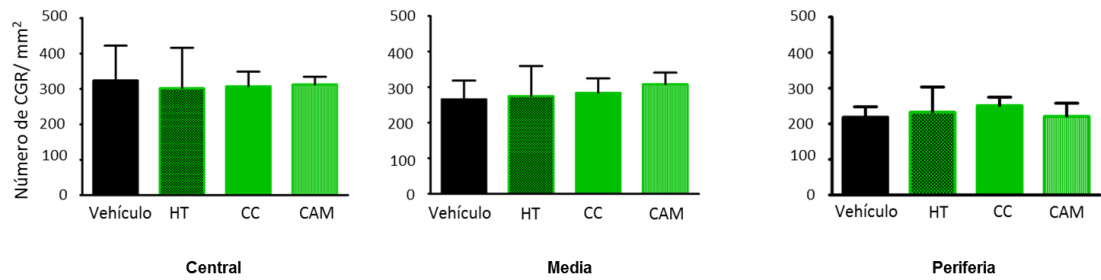


Figura 6. Efecto de la inducción post-lesión de DIACA (HT, CCE y CAM) sobre la supervivencia de CGR. A) La gráfica muestra el conteo total de CGR en animales control e inmunotolerantes evaluado a los 7 días post-lesión. B) Las gráficas muestran el conteo realizado en las diferentes áreas de la retina (central, media y periferia). Se grafican promedios \pm SD, n=5 animales por grupo.

10.- Discusión general

El presente proyecto tuvo como objetivo central diseñar una estrategia capaz de proteger estructuralmente el tejido nervioso después de una lesión traumática con el propósito final de preservar su función después del daño. La propuesta consiste en inducir inmunotolerancia a antígenos neurales a través de DIACA. Los resultados obtenidos muestran que la inducción de DIACA genera un microambiente antiinflamatorio que favorece la supervivencia de las CGR después de una lesión en el nervio óptico en ratas de la cepa Wistar.

El homogenado de médula espinal contiene múltiples componentes que son ricos en mielina y contienen algunos proteoglicanos inhibidores del crecimiento axonal. Las diferentes fracciones enriquecidas en componentes asociados a la membrana (CAM), en componentes citosólicos (CC) o bien donde están todos los posibles antígenos presentes de la médula espinal (HT), fueron evaluadas para determinar la capacidad de estos para actuar como antígenos. Las pruebas de DTH utilizando las diferentes fracciones nos permitieron observar que todos los componentes neuronales de la médula espinal de ratas sanas tienen la capacidad de ser reconocidos como antígenos, siendo la fracción CC la que presentó mayor antigenicidad; incluso ligeramente más que HT, esto debido quizás a que CC contiene componentes (solubles) que son más rápidamente procesados por las CPA y por ende son prontamente reconocidos por los linfocitos T (Odoardi *et al.*, 2007). Este resultado fue contrario a lo que se esperaba, ya que de acuerdo a la ubicación celular (membrana) y por ende la asociación con lípidos, y a la

presencia de proteínas como MBP, MOG, PLP, MAG de la fracción CAM se pensaba que ésta sería la que presentaría mayor antigenicidad (Quarles *et al.*, 2006).

La inyección de antígenos en la CA del ojo genera tolerancia inmunológica sistémica hacia dichos antígenos. La inducción de tolerancia inmunológica inducida a través de DIACA fue evaluada mediante la prueba DTH. Esta prueba genera una respuesta de inflamación específica de antígeno mediada por linfocitos Th1 (Farooq y Hossam, 2013). Se ha reportado que DIACA suprime la respuesta Th1 específica de antígeno (Streilen, 2003). Los resultados mostraron que la inducción de DIACA con inóculos sumamente complejos en su composición como lo son el homogenado de componentes medulares (HT) y las fracciones enriquecidas en proteínas (CC y CAM) se realizó de forma eficaz. Una amplia variedad de antígenos han sido usados para inducir DIACA, muchos de ellos comparten la propiedad de ser moléculas de superficie celular o de estar covalentemente unidos a la célula (Niederkon *et al.*, 1981; Streilen *et al.*, 1980; Waldrep y Kaplan, 1983; Whittum *et al.*, 1983); también han sido documentada la inducción de DIACA con antígenos solubles (Cui *et al.*, 2009; Farooq *et al.*, 2014; Mizuno *et al.*, 1989) indicando que la solubilidad de los antígenos no es una característica crítica para la inducción (Mizuno *et al.*, 1989) . Un estudio previo ha reportado la inducción de tolerancia a dos proteínas derivadas de la mielina: MOG y MBP utilizando los antígenos solos o en co-inyección en la CA (Bhowmick *et al.*, 2011). Sin embargo, en el contexto de la patología secundaria a una lesión se consideró que es más eficiente generar inmunotolerancia a múltiples

autoantígenos que pueden estar presentes en el sitio del daño. El estado de inmunotolerancia generado a través de DIACA origina dos poblaciones de células iTregs específicas de antígeno: CD4⁺ y CD8⁺ (Nieder Korn, 2006). Dado que en el modelo diversos componentes del parénquima son reconocidos como antígenos, las Tregs específicas de antígeno pueden llevar a cabo la supresión directa de la función efectora de células T CD4⁺ y CD8⁺.

La inducción de DIACA favoreció la supervivencia de CGR a los 7 y 14 días en animales con lesión del nervio óptico. A los 7 días después de la lesión, los animales inoculados en la CA con la fracción CC mostraron mayor número de CGR sobrevivientes, Brn3a⁺. Se ha reportado que la muerte de CGR no es instantánea, es un proceso dinámico que dura varios días (Peinado *et al.*, 1996, Chidlow *et al.*, 2005). Se sabe que Brn3a estimula la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x y protege a las células neuronales de la apoptosis, y solo se expresa en la célula vivas (Sugars *et al.*, 2001; Nadal-Nicolás *et al.*, 2009). Un estudio realizado por Sánchez y colaboradores en el 2015 (Sánchez-Migallón *et al.*, 2016) indica que la expresión de Brn3a declina cuando las CGR expresan caspasa 3 activa; sugiriendo que mientras las células expresen ese factor de transcripción aún están viables. A los 14 días después de la lesión las retinas de los animales inmunotolerantes a CC también presentaron mayor número de CGR supervivientes. Si bien la terapia neuroprotectora propuesta no impide que un gran porcentaje de CGR sean pérdidas, permite que exista una ventana de tiempo que puede ser aprovechada. Los animales inmunotolerantes a HT y CAM no favorecieron la supervivencia de CGR después de la lesión; esto puede ser debido

a que la fracción de CC tiene la capacidad de inducir mayor expresión del factor de transcripción Foxp3. Se sabe que Foxp3 es indispensable para la diferenciación y función de las células T reguladoras, lo cual puede sugerir que los animales inmunotolerantes a CC tienen un mayor número de células Treg (Hori *et al.*, 2003) o bien, que esta mayor expresión de Foxp3 estimula la producción de citocinas antiinflamatorias (Fontenot *et al.*, 2003). Se sabe que la degeneración en la retina inicia con la muerte de las CGR del área periférica (Parrila-Reverte *et al.*, 2009). El análisis de supervivencia de CGR por áreas (datos no mostrados) indicó que la inducción de DIACA-CC favoreció la supervivencia en la áreas central y media que se sabe son sitios donde reside la agudeza visual. A los 7 días post-lesión, mientras que a los 14 las tres áreas presentaron un número mayor de CGR sobrevivientes; de esta forma se puede pensar que hay un retraso espacio-temporal en la muerte de CGR en los animales inmunotolerantes.

Diversos estudios han reportado que el efecto neuroprotector de las terapias depende ampliamente del período en el cual son aplicadas (Lowestein *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2014; Scheter *et al.*, 2009). En el caso de los resultados obtenidos en la inducción post-lesión de DIACA podemos inferir que la inducción posterior a la lesión retarda la generación de Tregs y de las citocinas antiinflamatorias que producen, sin embargo más estudios son necesarios. Alrededor de 48 h después de la inoculación se generan las células Treg (Wang *et al.*, 1997) tiempo en el cual, cuantiosos mediadores proinflamatorios ya ha alcanzado su pico máximo (figura 3 A), sin que aun halla efecto del ambiente inmunoregulador promovido por DIACA. Más estudios son necesarios para

concluir el efecto de la inducción de DIACA (antígenos neurales) posterior a una lesión en el SNC.

Adamus y colaboradores en el 2011 realizaron un estudio en 209 pacientes donde determinaron que el repertorio de autoanticuerpos contra el nervio óptico difería de los anticuerpos antirretinales. Encontrando además, que un número mayor de pacientes con retinopatías autoinmunes presentan anticuerpos contra proteínas de la vía glucolítica (enolasa, aldolasa), GAPDH, y la proteína citosólica CRMP5 (Adamus *et al.*, 2011); lo cual puede sugerir que la neuroprotección observada en la retina está relacionada con la especificidad de los anticuerpos generados a partir de DIACA. Lo cual sugiere que estudios adicionales deben ser realizados a nivel de nervio óptico en animales inmunotolerantes a la fracción CAM.

Las citocinas son un grupo de polipéptidos que están generalmente asociados con la inflamación, la activación inmunológica y la diferenciación o muerte celular, e incluye interleucinas, interferones, factores de necrosis tumoral, quimiocinas y factores de crecimiento (Barone y Feuerstein, 1999; Del Zoppo *et al.*, 2000). Numerosas citocinas proinflamatorias son inducidas de forma rápida después de un daño en el SNC, y son expresadas en un patrón espacio-temporal consistente con su participación en la subsecuente muerte neuronal.

Los resultados obtenidos muestran que la inducción de DIACA con CC generó un ambiente predominantemente antiinflamatorio en la retina en animales con lesión del nervio óptico; tanto a los 2 como a los 7 días post-lesión se

observaron incrementos importantes de las citocinas IL-4, IL-10, y TGF-B. Está documentado que dichas citocinas actúan como reguladores y moduladores de la respuesta inmunológica después de un daño, lo que favorece la sobrevivencia celular (Sawada *et al.*, 1995; Bethea *et al.*, 1999; Doherty *et al.*, 1999; Sholl-Franco *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2010). Así mismo también se observó un incremento de IL-6 en los animales con DIACA a los 7 días después de la lesión. La IL-6 a menudo se induce junto con las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1, sin embargo, cabe destacar que también puede ser considerada una citocina antiinflamatoria ya que tiene un papel crítico controlando la extensión de las respuestas inflamatorias agudas locales o sistémicas (Xing *et al.*, 1998). Además, existen algunos reportes de que la presencia de IL-6 es necesaria para la diferenciación de varias subpoblaciones de células T CD4+; inhibe la diferenciación hacia un fenotipo Th1, vía SOCS1. IL-6 promueve también la producción de IL-4, polarizando el ambiente hacia un fenotipo Th2 (Rincon *et al.*, 1997). En macrófagos humano, IL-6 induce un perfil de citocinas antiinflamatorio por un aumento en la reducción de IL-4 e IL-10 (Frisdal *et al.*, 2001). Además existen algunos reportes de que la presencia de IL-6 tiene efectos neuroprotectores, ya que en lesiones cerebrales juega un papel importante en la protección de las neuronas colinérgicas y es un importante inhibidor de la muerte neuronal durante la isquemia (Toulmond *et al.*, 1992; Loddick *et al.*, 1998; Carlson *et al.*, 1999; Ali *et al.*, 2000). En el caso de la expresión de las citocinas proinflamatorias se observó un incremento de TNF- α a los 7 días post-lesión y de IL-1 β a los 2 días post-lesión. TNF- α es una citocina proinflamatoria, sin embargo,

varios estudios *in vitro* reportan acciones neuroprotectoras en cultivos de neuronas y en cortes de cerebro (Carlson *et al.*, 1999; Bruce *et al.*, 1996); IL-1 β es rápidamente liberada por la microglía en respuesta a un daño. Las acciones de IL-1 β en el SNC son diversas e incluyen la inducción de factores de crecimiento, reducción de neurodegeneración inducida por aminoácidos excitatorios (Strijbos *et al.*, 1995). La expresión de INF- γ se vio incrementada a los 2 y 7 días post-lesión; se sabe que esta citocina activa a los macrófagos y estimula su capacidad fagocitaria, favoreciendo de esta forma la eliminación de células muertas y restos celulares; además el incremento de INF- γ también puede estar relacionado a que es necesario para que las células Treg CD8+ generadas en DIACA ejerzan su función reguladora (Paunicka *et al.*, 2011).

Otras moléculas que mostraron una expresión diferencial por la inducción de DIACA con CC, fueron los factores neurotróficos. La expresión de BDNF se incrementó a los 2 días después de la lesión y disminuyó su expresión a los 7 días, postlesión. Se sabe que BDNF es una neurotrofina esencial para la sobrevivencia neuronal; la sobreexpresión de BDNF protege a las CGR después de una lesión en el nervio óptico (Feng *et al.*, 2017). Por otro lado, BDNF puede tener también efectos proapoptóticos a través de la unión con el receptor p75, así como efectos indirectos con otras neuronas o sobre la glía (Greenberg *et al.*, 2009). De esta forma la expresión de BDNF puede estar promoviendo la sobrevivencia de las CGR durante los primeros días después del daño y en los días posteriores regular la muerte celular por apoptosis, lo cual es congruente con la regulación a la baja de la expresión de caspasa 3 obtenida también en este

trabajo. Otra neurotrofina que presentó un incremento en la expresión al día 7 postlesión en animales inmutolerantes a CC fue NT4. Se sabe que la administración intraocular de NT4 tiene un efecto neuroprotector en la supervivencia de las CGR después de la axotomía del nervio óptico (*Peinado et al.*, 1996). Otro resultado obtenido es la expresión de la oncomodulina (un factor de crecimiento atípico producto de los neutrófilos), la cual disminuyó a los 7 días post-lesión en el grupo de animales inmutolerantes a CC. La oncomodulina es un factor potente que promueve el crecimiento axonal y también es producida por macrófagos inflamatorios (M1) después de la lesión del SNC (*Yin et al.*, 2006). Dado que la oncomodulina promueve el recrecimiento de axones *in vitro* e *in vivo*, parece imperativo medir los niveles de expresión directamente en el nervio óptico en futuros estudios.

La expresión de caspasa 3 y Bcl2 también fue estudiada con la finalidad de saber si la terapia con DIACA, es capaz de retardar la muerte celular por apoptosis. Los resultados obtenidos indican que DIACA disminuyó la expresión de caspasa 3 a los 7 días postlesión del nervio óptico, sin embargo, la expresión de Bcl2 no se vio modificada en este período de tiempo. Dado que Bcl2 es una molécula que participa en la vía intrínseca de la apoptosis, es posible que alguna molécula reguladora de la vía extrínseca de la apoptosis como la caspasa iniciadora 8 si se vea regulada a la baja con el tratamiento.

La inducción de DIACA generó un incremento en la expresión del factor de transcripción Foxp3 en la retina a los 7 días después de la lesión en el nervio

óptico, mientras que en el día dos después del daño, no se presentó este incremento. El aumento de Foxp3 como se sugirió anteriormente puede ser debido a un incremento en la población de células Treg, inducidas a partir de DIACA. Dado que en DIACA se generan dos poblaciones de células T CD25+ Foxp3: CD4+ y CD8+, la población de Tregs CD25+CD8+ Foxp3+ es factible que sea la se encuentra incrementada, esto debido a estas células son las que se encuentra suprimiendo la actividad de las células efectoras de la inmunidad adaptativa ya presentes en el sitio del daño (Golshayan *et al.*, 2007). El incremento de Foxp3 al día 7 post- trauma, correlaciona bien con los aumentos en la expresión de las citocinas antiinflamatorias encontrados en este mismo lapso de tiempo, sin embargo, la presencia de estas citocinas durante la fase temprana de la lesión y el no incremento de Foxp3, sugieren que células de la inmunidad innata o células de la glía son las que se encuentran secretando IL-4, TGF- β e IL-6.

Una población de células del sistema inmunológico que ha adquirido gran relevancia en las patologías relacionada con el SNC son los macrófagos (Shchter *et al.*, 2009; Shchter y Schwartz 2013; Raposo *et al.*, 2014). En general, se cree que los macrófagos desempeñan funciones benéficas, como la orquestación de las respuestas de cicatrización de heridas y la eliminación de restos celulares, la correcta resolución de la respuesta inflamatoria, la promoción de la angiogénesis, la formación de cicatrices y la secreción de factores de crecimiento (Brancato y Albina, 2011; Koh y DiPietro, 2011; Werner y Grose, 2003). Por lo tanto, se decidió medir la expresión de CD68 un marcador específico de esta población de células. La expresión de CD68 se incrementó hasta el día 7 post-lesión en la retina de

animales inmunotolerantes, mientras que al día 2 no se presentaron cambios considerables en cuanto a su expresión. Esto indica que la población de macrófagos se ve incrementada de forma conjunta con las células Treg Foxp3. Para determinar el fenotipo de los macrófagos presentes en la retina, se midió la expresión del marcador de macrófagos M2 (antiinflamatorios), Arginasa 1. La expresión de este marcador se vio incrementada de igual forma hasta el día 7 después de la lesión en el nervio óptico, lo que indica que la población de macrófagos presentes en este período de tiempo corresponde al tipo M2, los cuales tienen como función principal favorecer la resolución de la respuesta inflamatoria. Al igual que las células Treg Foxp3, estos macrófagos M2 también pueden estar promoviendo el predominio del ambiente antiinflamatorio. Sin embargo al no presentarse incrementos en CD68 y arginasa 1 al día 2 post-lesión, aún queda por dilucidar qué tipo de células son las responsables de generar el ambiente antiinflamatorio presente en esta etapa.

En conjunto los resultados obtenidos indican que la inducción de DIACA promueve un ambiente antiinflamatorio después de una lesión traumática en el nervio óptico, lo que favorece la supervivencia de la CGR en la retina; el mecanismo y el tipo de células que participan para favorecer la neuroprotección de las CGR aún debe de ser elucidado por completo; sin embargo, varias moléculas y su posible relación con este fenómeno han sido aportados en este proyecto.

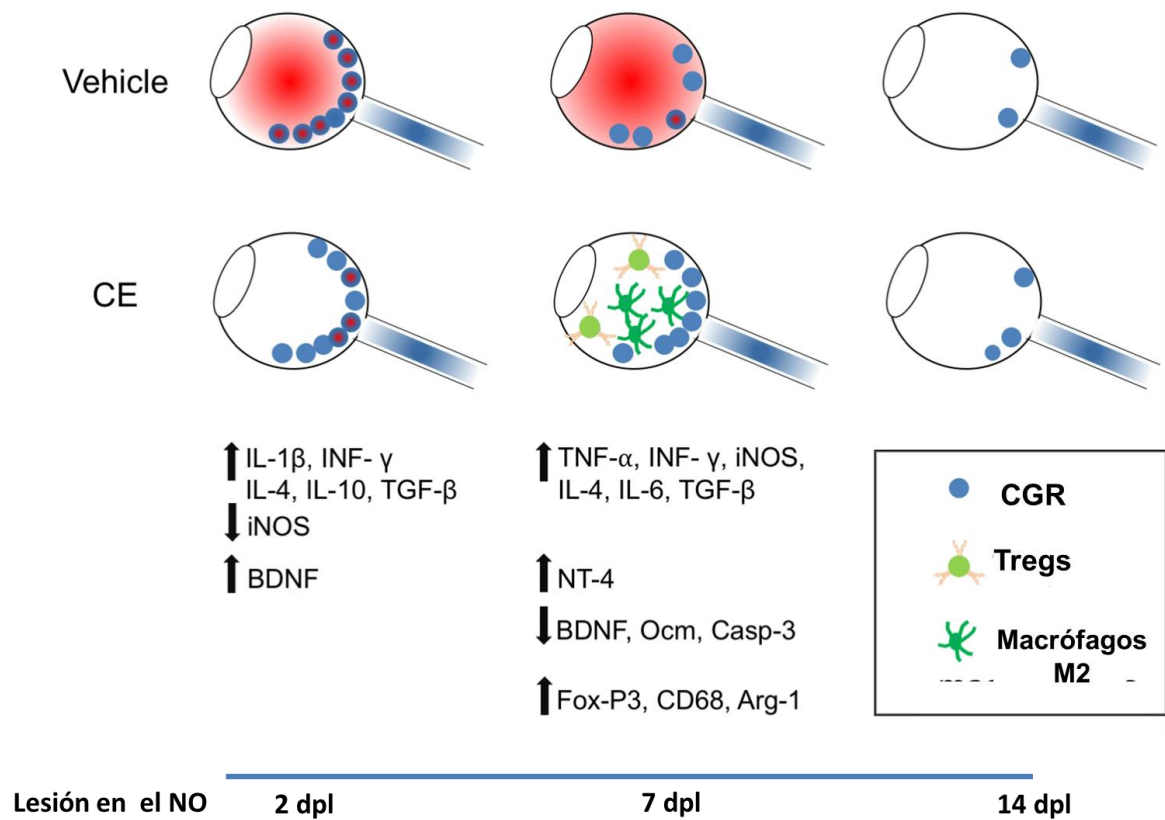


Figura 7. Representación esquemática de los mecanismos de acción de la tolerancia inmunológica y su efecto protector a los 2, 7 y 14 días después de una lesión del nervio óptico. Se muestra el microambiente, el tipo celular y las biomoléculas presentes de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

11.- Conclusión

La inducción de la Desviación Inmunitaria Asociada a la Cámara anterior del ojo tiene un efecto neuroprotector sobre la supervivencia de las CGR de la retina, esto debido a que DIACA promueve la generación de un ambiente antiinflamatorio y favorece la generación de células Treg Foxp3 y de macrófagos M2.

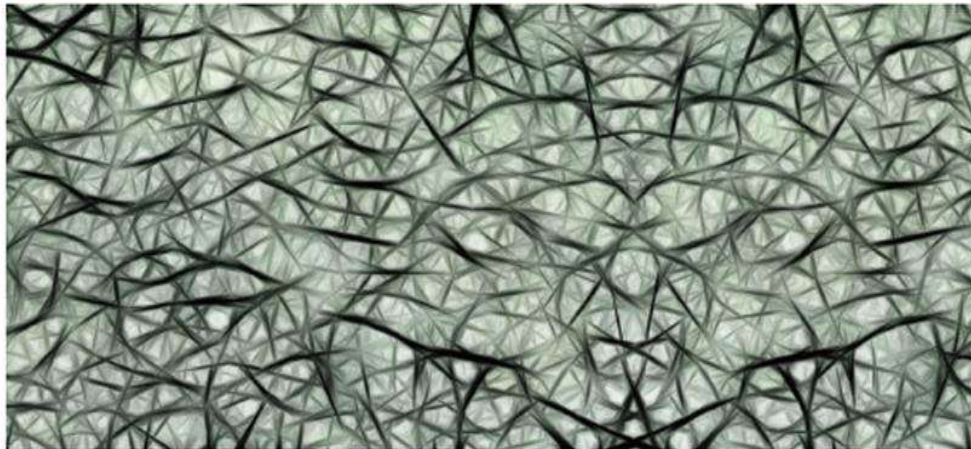
12.- Anexo

12.1 ¿Qué nos protege de nuestro sistema inmunológico?

ARTÍCULO

¿Quién nos protege de nuestro sistema inmunológico?

Lorena Martínez Alcantar y Esperanza Meléndez Herrera



*Nuestro sistema inmunológico nos protege de los que nos rodea a diario
-¿Pero, quién nos protege de él?-*

La M.C Lorena Martínez Alcantar es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas.

La D.C Esperanza Meléndez Herrera es Profesora e Investigadora, ambas realizan sus investigaciones en el Laboratorio de Eco-Fisiología Animal, del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

El sistema inmunológico y su tarea diaria

La existencia del ser humano está condicionada a una guerra constante contra enemigos microscópicos como hongos, bacterias, virus y parásitos que pueden causar enfermedades (patógenos). Para contender contra estos invasores, nuestro organismo está equipado con un sistema de defensas compuesto por una red de moléculas, células y tejidos que interactúan entre sí para reconocer, neutralizar y eliminar cualquier amenaza que ponga en peligro nuestra integridad.

-Este conjunto de defensas es denominado sistema inmunológico-

Aspectos generales de la respuesta inmunológica

La respuesta inmunológica se puede dividir en dos grandes tipos: la innata, que actúa inmediatamente y posee especificidad limitada y la adaptativa, que depende del tipo de antígeno, es extremadamente específica y tiene memoria.

La respuesta innata se activa cuando las células encargadas de realizar el patrullaje diario en busca de amenazas (células fagocíticas) detectan un microorganismo invasor en alguno de sus frentes. Una vez que esto ocurre, las células secuestran



al invasor y lo degradan en porciones de tamaño variables. Ejemplos de estas células fagocíticas son los neutrófilos, células sanguíneas que monitorean todo nuestro organismo en búsqueda de microorganismos invasores y los "neutralizan" mediante compuestos tóxicos; los monocitos, que viajan al sitio de invasión cuando detectan a un patógeno, y entonces se convierten en macrófagos.

-Si estos mecanismos destruyen eficientemente al patógeno, la respuesta inmunológica se detiene. Si por el contrario, los microorganismos patógenos llegan a sobrevivir a los mecanismos antes descritos, las células macrófagas se encargan de pedir refuerzos y activan la inmunorreacción adaptativa-

La respuesta adaptativa se inicia cuando los macrófagos presentan los fragmentos del patógeno degradado (denominados antígenos) en su superficie celular a otras células denominadas linfocitos T y linfocitos B. Estos linfocitos actúan en conjunto para garantizar la destrucción y eliminación del agente patógeno. Sin embargo, su actividad debe ser rigurosamente regulada para evitar daños colaterales como la destrucción masiva de células sanas o el ataque a moléculas y células propias.

Tolerancia inmunológica, un mecanismo protector

La misión principal del sistema inmunológico es defender a nuestro organismo frente a las agresiones externas. Para desarrollar adecuadamente esta función, el sistema inmunológico debe ser capaz de diferenciar perfectamente entre las moléculas propias (autoantígenos) y las extrañas. El reconocimiento de las moléculas propias ocurre durante el desarrollo de los linfocitos, proceso que tiene lugar en los órganos linfoides (p. ej. timo, médula ósea, bazo).

Bajo diferentes circunstancias, el sistema inmunológico puede desencadenar una respuesta indistinguible de la activada por el patógeno, conduciendo a una enfermedad autoinmune que puede ser incompatible con la vida.

Con el fin de mantener la autotolerancia y evitar el daño tisular, el sistema inmunológico desencadena una compleja red de mecanismos celulares y moleculares de regulación. Entre los mecanismos principales utilizados por esta respuesta tolerogénica se encuentran: 1) la muerte o inactivación de células autorreactivas; 2) la discriminación entre lo propio y lo ajeno en base a concentraciones constantes del componente en los tejidos; y 3) la au-

sencia de señales estimuladoras que favorezcan la interacción de los autoantígenos con las células del sistema inmunológico.

Estos mecanismos de tolerancia inmunológica pueden considerarse como una sucesión de puntos de verificación. Cada uno de estos puntos es eficaz para prevenir respuestas contra lo propio y todos ellos en conjunto tienen una acción sinérgica que nos protege de la autoinmunidad. Sin embargo, es conveniente saber que la activación de los linfocitos autorreactivos no necesariamente equivale a enfermedad.

Únicamente se presenta una enfermedad autoinmune cuando todos los mecanismos de tolerancia son superados y esto provoca una reacción persistente a los componentes propios que incluye la generación de células y moléculas efectoras que destruyen tejidos. Si bien no se conocen por completo los mecanismos mediante los cuales ocurre esto, se considera que la autoinmunidad se debe a una combinación de susceptibilidad genética, degradación de los mecanismos de tolerancia naturales, y detonantes ambientales como las infecciones. Pero, ¿qué ocurre si una respuesta contra algún autoantígeno ya ha comenzado a desarrollarse? ¿hay algo que puede hacerse para evitar el daño a la parte de nuestro cuerpo que presenta al antígeno?.

Células T reguladoras al rescate

Las células autorreactivas que han evadido los mecanismos de inducción de tolerancia antes descritos todavía pueden ser reguladas de manera

que no ocasionen enfermedad. Entre los diversos mecanismos propios de la tolerancia inmunológica, la función de los linfocitos T reguladores, podría decirse que es el más importante.

Se considera que los linfocitos T reguladores son un grupo heterogéneo de células que participan en el mantenimiento de la tolerancia a lo propio y la homeostasis del sistema inmunológico. Estas poblaciones de células se especializan en suprimir la respuesta inmunológica cuando ésta represente una amenaza para el organismo, tal es el caso de la autoinmunidad, en enfermedades alérgicas y otras enfermedades inflamatorias. Una vez activadas pueden mediar sus efectos de manera dependiente del contacto y /o mediante la secreción de moléculas que inhiben la proliferación de células autorreactivas. Estos linfocitos son capaces de suprimir respuestas antígeno-específicas y de transferir esa tolerancia entre individuos.

Muchos investigadores plantean la hipótesis de que los linfocitos T reguladores pueden tener un potencial terapéutico para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes. Así mismo se ha demostrado que los linfocitos T reguladores, previenen o mitigan otros síndromes inmunopatológicos, como el rechazo de injertos o trasplantes.

La inducción de linfocitos T reguladores es uno de los objetivos más importante en la terapia dirigida a la autoinmunidad ya que esto confiere especificidad al tratamiento y, por tanto, anular el uso actual de los fármacos no específicos.



* Berrueta y Salmen. 2010. La tolerancia inmunológica a 50 años del Premio Nobel en Medicina y Fisiología: Una perspectiva como mecanismo de respuesta inmune. *Invest. Clín.*, 51(2):159-192.
<http://www.redalyc.org/html/3729/372937680003/>

* Heber et al. 2013. Tolerancia inmunológica, un recorrido en el tiempo: ¿ cómo discriminar entre lo propio y lo extraño?. *Revista Colombiana de Reumatología*, 20(4):237-249.

<http://www.elsevier.es/es-revista-revista-colombiana-reumatologia-374-articulo-tolerancia-inmunologica-un-recomido-el-50121812313701385>

* Blasco-Patiño. 2002. La infección como origen y desencadenante de enfermedades autoinmunes. *Anales de Medicina Interna*, 19(1):44-48.
http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=50212-71992002000100011

13.- Referencias

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología Celular y Molecular*. Editorial Elsevier; 7ª Ed. 2012.
- Abbas, A. K., Benoist, C., Bluestone, J. A., Campbell, D. J., Ghosh, S., Hori, S., Jiang, S., Jiang, S., Kuchroo, V.K., Mathis D., Rocanolo, M.G., Rudensky, A. & Sakaguchi, S. (2013). Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nature immunology*, 14(4), 307.
- Adamus, G., Brown, L., Schiffman, J., & Iannaccone, A. (2011). Diversity in autoimmunity against retinal, neuronal, and axonal antigens in acquired neuro-retinopathy. *Journal of ophthalmic inflammation and infection*, 1(3), 111.
- Agudo-Barriuso, M., Nadal-Nicolás, F. M., Parrilla-Reverter, G., Villegas-Pérez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (2011). Anatomical and Molecular Responses Triggered in the Retina by Axonal Injury. In *The Mystery of Glaucoma*. IntechOpen.
- Agudo-Barriuso, M., Villegas-Perez, M. P., de Imperial, J. M., & Vidal-Sanz, M. (2013). Anatomical and functional damage in experimental glaucoma. *Current opinion in pharmacology*, 13(1), 5-11.
- Aktas, O., Smorodchenko, A., Brocke, S., Infante-Duarte, C., Topphoff, U. S., Voigt, J., & Bechmann, I. (2005). Neuronal damage in autoimmune neuroinflammation mediated by the death ligand TRAIL. *Neuron*, 46(3), 421-432.
- Ali, C., Nicole, O., Docagne, F., Lesne, S., MacKenzie, E. T., Nouvelot, A., BouSSION, A. & Vivien, D. (2000). Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 20(6), 956-966.
- Ankeny, D. P., & Popovich, P. G. (2010). B cells and autoantibodies: complex roles in CNS injury. *Trends in immunology*, 31(9), 332-338.
- 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*, 99(4), 1073-1087.
- Avilés-Trigueros, M., Mayor-Torroglosa, S., Garcia-Avilés, A., Lafuente, M. P., Rodriguez, M. E., de Imperial, J. M., & Vidal-Sanz, M. (2003). Transient

ischemia of the retina results in massive degeneration of the retinotectal projection: long-term neuroprotection with brimonidine. *Experimental neurology*, 184(2), 767-777.

- Avilés-Trigueros, M., Sauvé, Y., Lund, R. D., & Vidal-Sanz, M. (2000). Selective innervation of retinorecipient brainstem nuclei by retinal ganglion cell axons regenerating through peripheral nerve grafts in adult rats. *Journal of Neuroscience*, 20(1), 361-374.
- 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*, 61(6), 852-864.
- Balatoni, B., Storch, M. K., Swoboda, E. M., Schönborn, V., Koziel, A., Lambrou, G. N., Hiestand, P.C., Weissert, R. & Foster, C. A. (2007). FTY720 sustains and restores neuronal function in the DA rat model of MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain research bulletin*, 74(5), 307-316.
- Barone, F. C., & Feuerstein, G. Z. (1999). Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 19(8), 819-834.
- 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.
- Benowitz, L., & Yin, Y. (2008). Rewiring the injured CNS: lessons from the optic nerve. *Experimental neurology*, 209(2), 389-398.
- Berry, M., Ahmed, Z., Lorber, B., Douglas, M., & Logan, A. (2008). Regeneration of axons in the visual system. *Restorative neurology and neuroscience*, 26(2, 3), 147-174.
- Bethea, J. R., Nagashima, H., Acosta, M. C., Briceno, C., Gomez, F., MARCILLO, A. E., & Dietrich, W. D. (1999). Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *Journal of neurotrauma*, 16(10), 851-863.
- Bettelli, E., Pagany, M., Weiner, H. L., Linington, C., Sobel, R. A., & Kuchroo, V. K. (2003). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *Journal of Experimental Medicine*, 197(9), 1073-1081.

- Bhowmick, S., Clark, R. B., Brocke, S., & Cone, R. E. (2011). Antigen-specific splenic CD4⁺ and CD8⁺ 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.
- Brancato, S. K., & Albina, J. E. (2011). Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *The American journal of pathology*, 178(1), 19-25.
- Bruce, A. J., Boling, W., Kindy, M. S., Peschon, J., Kraemer, P. J., Carpenter, M. K., Frederick W. Holtsberg, F.W. & Mattson, M. P. (1996). Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nature medicine*, 2(7), 788.
- Carbone, F., De Rosa, V., Carrieri, P. B., Montella, S., Bruzzese, D., Porcellini, A., Procaccini, C., La-Cava, A. & Matarese, G. (2014). Regulatory T cell proliferative potential is impaired in human autoimmune disease. *Nature medicine*, 20(1), 69.
- Carlson, N. G., Wieggl, W. A., Chen, J., Bacchi, A., Rogers, S. W., & Gahring, L. C. (1999). Inflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and TNF- α impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *The Journal of Immunology*, 163(7), 3963-3968.
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S3-S23.
- 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.
- Chidlow, G., Casson, R., Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M., & Osborne, N. N. (2005). Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve transection: an RT-PCR study. *Mol Vis*, 11, 387-396.
- Claudio, L., Raine, C. S., & Brosnan, C. F. (1995). Evidence of persistent blood-brain barrier abnormalities in chronic-progressive multiple sclerosis. *Acta neuropathologica*, 90(3), 228-238.
- Cross, A. H., Tuohy, V. K., & Raine, C. S. (1993). Development of reactivity to new myelin antigens during chronic relapsing autoimmune demyelination. *Cellular immunology*, 146(2), 261-269.
- Crowe, M. J., Bresnahan, J. C., Shuman, S. L., Masters, J. N., & Beattie, M. S. (1997). Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nature medicine*, 3(1), 73.

- Cui, Y., Shao, H., Sun, D., & Kaplan, H. J. (2009). Regulation of interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)-specific Th1 and Th17 cells in anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(12), 5811-5817.
- D'Orazio, T. J., Mayhew, E., & Niederkorn, J. Y. (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.
- De Groot, A. S., Goldberg, M., Moise, L., & Martin, W. (2006). Evolutionary deimmunization: an ancillary mechanism for self-tolerance?. *Cellular immunology*, 244(2), 148-153.
- Del Zoppo, G., Ginis, I., Hallenbeck, J. M., Iadecola, C., Wang, X., & Feuerstein, G. Z. (2000). Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain pathology*, 10(1), 95-112.
- Doherty, A. M. (1999). Phosphodiesterase 4 inhibitors as novel anti-inflammatory agents. *Current opinion in chemical biology*, 3(4), 466-473.
- Donnelly, D. J., & Popovich, P. G. (2008). Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Experimental neurology*, 209(2), 378-388.
- Dowling, J. E. (1987). *The retina: an approachable part of the brain*. Harvard University Press.
- Dowling, J. E. in *Encyclopedia of the Human Brain*, Vol. 4 (ed. Ramachandran, V.) 217–235 (Academic Press, San Diego, 2002).
- Dyson, P. J., Knight, A. M., Fairchild, S., Simpson, E., & Tomonari, K. (1991). Genes encoding ligands for deletion of V β 11 T cells cosegregate with mammary tumour virus genomes. *Nature*, 349(6309), 531.
- Eigenbrod, T., Park, J. H., Harder, J., Iwakura, Y., & Núñez, G. (2008). Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 α released from dying cells. *The Journal of Immunology*, 181(12), 8194-8198.
- Eugenin, E. A., Gamss, R., Buckner, C., Bueno, D., Klein, R. S., Schoenbaum, E. E., Calderon T.M & Berman, J. W. (2006). Shedding of

- PECAM-1 during HIV infection: a potential role for soluble PECAM-1 in the pathogenesis of NeuroAIDS. *Journal of leukocyte biology*, 79(3), 444-452.
- Faden, A.I., (1993). Experimental neurobiology of central nervous system. *Crit. Rev. Neurobiol.* 7, 175–186.
 - Fainboim, L., & Geffner, J. (2005). *Introducción a la inmunología humana*. Ed. Médica Panamericana.
 - 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., Kumar, A., & Ashour, H. M. (2014). Eye-mediated immune tolerance to Type II collagen in arthritis-prone strains of mice. *Journal of cellular and molecular medicine*, 18(12), 2512-2518.
 - Faunce, D. E., & Stein-Streilein, J. (2002). NKT cell-derived RANTES recruits APCs and CD8+ T cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance. *The Journal of Immunology*, 169(1), 31-38.
 - Faunce, D. E., Sonoda, K. H., & Stein-Streilein, J. (2001). MIP-2 recruits NKT cells to the spleen during tolerance induction. *The Journal of Immunology*, 166(1), 313-321.
 - Feng, L., Puyang, Z., Chen, H., Liang, P., Troy, J. B., & Liu, X. (2017). Overexpression of brain-derived neurotrophic factor protects large retinal ganglion cells after optic nerve crush in mice. *eNeuro*, 4(1).
 - Ferrandon, D., Imler, J. L., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (2007). The Drosophila systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 7(11), 862.
 - Fisher, J., Levkovitch-Verbin, H., Schori, H., Yoles, E., Butovsky, O., Kaye, J. F., & Schwartz, M. (2001). Vaccination for neuroprotection in the mouse optic nerve: implications for optic neuropathies. *Journal of Neuroscience*, 21(1), 136-142.
 - Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*, 4(4), 330.
 - Frank, M., & Wolburg, H. (1996). Cellular reactions at the lesion site after crushing of the rat optic nerve. *Glia*, 16(3), 227-240.
 - Frisdal, E., Lesnik, P., Olivier, M., Robillard, P., Chapman, M. J., Huby, T., Guerin M., & Le Goff, W. (2011). Interleukin-6 protects human macrophages

from cellular cholesterol accumulation and attenuates the proinflammatory response. *Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 30926-30936.

- Fujio, K., Okamura, T., & Yamamoto, K. (2010). The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells. In *Advances in immunology* (Vol. 105, pp. 99-130). Academic Press.
- 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*, 87(1), 47-62.
- Galindo-Romero, C., Aviles-Triqueros, M., Jimenez-Lopez, M., Valiente-Soriano, F. J., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolas, F., & Agudo-Barriuso, M. (2011). Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Experimental eye research*, 92(5), 377-387.
- García-Ayuso, D., Ortín-Martínez, A., Jiménez-López, M., Galindo-Romero, C., Cuenca, N., Pinilla, I., & Villegas-Pérez, M. P. (2013). Changes in the photoreceptor mosaic of P23H-1 rats during retinal degeneration: implications for rod-cone dependent survival. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(8), 5888-5900.
- Gershon, R. K., & Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 18(5), 723.
- Gimsa, U., Øren, A., Pandiyan, P., Teichmann, D., Bechmann, I., Nitsch, R., & Brunner-Weinzierl, M. C. (2004). Astrocytes protect the CNS: antigen-specific T helper cell responses are inhibited by astrocyte-induced upregulation of CTLA-4 (CD152). *Journal of Molecular Medicine*, 82(6), 364-372.
- Gimsa, U., Peter, S. V., Lehmann, K., Bechmann, I., & Nitsch, R. (2000). Axonal damage induced by invading T cells in organotypic central nervous system tissue in vitro: involvement of microglial cells. *Brain Pathology*, 10(3), 365-377.
- Giuliani, F., Goodyer, C. G., Antel, J. P., & Yong, V. W. (2003). Vulnerability of human neurons to T cell-mediated cytotoxicity. *The Journal of Immunology*, 171(1), 368-379.
- Golshayan, D., Jiang, S., Tsang, J., Garin, M. I., Mottet, C., & Lechler, R. I. (2007). In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+ CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood*, 109(2), 827-835.

- Greenberg, M. E., Xu, B., Lu, B., & Hempstead, B. L. (2009). New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *Journal of Neuroscience*, 29(41), 12764-12767.
- Guadarrama-Ortiz, P., Guerra, X. R., Castillo-Rangel, C., & Ángeles-Castellanos, M. (2014). Esclerosis múltiple: enfermedad neurológica de alto impacto social: de vuelta al antiguo tratamiento. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 57(6), 5-10.
- Ha, D., Stone, D. K., Moslev, R. L., & Gendelman, H. E. (2012). Immunization strategies for Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 18, S218-S221.
- Hoquist, K. A., Baldwin, T. A., & Jameson, S. C. (2005). Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature Reviews Immunology*, 5(10), 772.
- Hori, S., Takahashi, T., & Sakauchi, S. (2003). Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Advances in immunology*, 81, 331-371.
- Horstmann, L., Kuehn, S., Pedreiturria, X., Haak, K., Pfarrer, C., Dick, H. B., ... & Joachim, S. C. (2016). Microglia response in retina and optic nerve in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*, 298, 32-41.
- Hovda, D. A., Yoshino, A., Kawamata, T., Katayama, Y., & Becker, D. P. (1991). Diffuse prolonged depression of cerebral oxidative metabolism following concussive brain injury in the rat: a cytochrome oxidase histochemistry study. *Brain research*, 567(1), 1-10.
- Iikuni, N., Lourenço, E. V., Hahn, B. H., & La Cava, A. (2009). Cutting edge: regulatory T cells directly suppress B cells in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*, 183(3), 1518-1522.
- Ivanova, E. A., & Orekhov, A. N. (2015). T helper lymphocyte subsets and plasticity in autoimmunity and cancer: an overview. *BioMed research international*, 2015.
- Jones, L. L., Margolis, R. U., & Tuszynski, M. H. (2003). The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Experimental neurology*, 182(2), 399-411.
- Jones, T. B., Hart, R. P., & Popovich, P. G. (2005). Molecular control of physiological and pathological T-cell recruitment after mouse spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 25(28), 6576-6583.

- Kappler, J. W., Roehm, N., & Marrack, P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*, 49(2), 273-280.
- Karpus, W. J., & Ransohoff, R. M. (1998). Chemokine regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: temporal and spatial expression patterns govern disease pathogenesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 161(6), 2667-267.
- 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. *Journal of Experimental Medicine*, 201(11), 1805-1814.
- Kipnis, J., & Schwartz, M. (2005). Controlled autoimmunity in CNS maintenance and repair. *Neuromolecular medicine*, 7(3), 197-206.
- Koh, T. J., & DiPietro, L. A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, 13
- Laquersindez Denis, N., Oviedo Gálvez, M. E., & Martínez Sánchez, G. (2009). Esclerosis múltiple: aspectos generales y abordaje farmacológico. *Revista Cubana de Farmacia*, 43(2), 0-0.
- Laspas, P., Gramlich, O. W., Müller, H. D., Cuny, C. S., Gottschling, P. F., Pfeiffer, N., Burkhard, D., & Grus, F. H. (2011). Autoreactive antibodies and loss of retinal ganglion cells in rats induced by immunization with ocular antigens. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(12), 8835-8848.
- Lassmann, H., & Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta neuropathologica*, 133(2), 223-244.
- Lee, S. I., Jeong, S. R., Kang, Y. M., Han, D. H., Jin, B. K., Namqunq, U., & Kim, B. G. (2010). Endogenous expression of interleukin-4 regulates macrophage activation and confines cavity formation after traumatic spinal cord injury. *Journal of neuroscience research*, 88(11), 2409-2419.
- 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*, 14, 327.
- Levkovitch-Verbin, H., Quigley, H. A., Martin, K. R., Zack, D. J., Pease, M. E., & Valenta, D. F. (2003). A model to study differences between primary and secondary degeneration of retinal ganglion cells in rats by partial optic nerve transection. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(8), 3388-3393.

- Lewkowicz, N., Klink, M., Mycko, M. P., & Lewkowicz, P. (2013). Neutrophil-CD4+ CD25+ T regulatory cell interactions: a possible new mechanism of infectious tolerance. *Immunobiology*, 218(4), 455-464.
- Li, M., Shibata, A., Li, C., Braun, P. E., McKerracher, L., Roder, J., Kater, S.B & David, S. (1996). Myelin-associated glycoprotein inhibits neurite/axon growth and causes growth cone collapse. *Journal of neuroscience research*, 46(4), 404-414.
- Liesz, A., Suri-Payer, E., Veltkamp, C., Doerr, H., Sommer, C., Rivest, S., Giese T & Veltkamp, R. (2009). Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nature medicine*, 15(2), 192.
- Lin, H. H., Faunce, D. E., Stacey, M., Terajewicz, A., Nakamura, T., Zhang-Hoover, J., Kerley, M., Mucenski, M.L., Siamon Gordon, S., & Stein-Streilein, 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), 1615-1625.
- Liu, C. Y., Guo, S. D., Yu, J. Z., Li, Y. H., Zhang, H., Feng, L., Chai, Z., Yuan, H.J., Yang W.F., Feng, Q.J. & Xiao, B. G. (2015). Fasudil mediates cell therapy of EAE by immunomodulating encephalomyelitic T cells and macrophages. *European journal of immunology*, 45(1), 142-152.
- Liu, Y., Teige, I., Birnir, B., & Issazadeh-Navikas, S. (2006). Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nature medicine*, 12(5), 518.
- Loddick, S. A., Turnbull, A. V., & Rothwell, N. J. (1998). Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 18(2), 176-179.
- Louveau, A., Herz, J., Alme, M. N., Salvador, A. F., Dong, M. Q., Viar, K. E., Herod, S.G., Knopp, J., Setliff J.C., Lupi, A.L., Da-Mesquita, S., Frost, E.L., Gaultier A., Harris H.T., Hu, S., Smirnov, I., Overall, G. Kipnis K (2018). CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature. *Nature neuroscience*, 21(10), 1380.
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. J., Eccles, J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D. & Harris, T. H. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, 523(7560), 337.

- Lowenstein, P. R., & Castro, M. G. (2003). Inflammation and adaptive immune responses to adenoviral vectors injected into the brain: peculiarities, mechanisms, and consequences. *Gene therapy*, 10(11), 946.
- Lowther, D. E., & Hafler, D. A. (2012). Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunological reviews*, 248(1), 156-169.
- Lynch, D. R., & Dawson, T. M. (1994). Secondary mechanisms in neuronal trauma. *Current opinion in neurology*, 7(6), 510-516.
- MacDonald, K. G., Hoeppli, R. E., Huang, Q., Gillies, J., Luciani, D. S., Orban, P. C., & Levings, M. K. (2016). Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor. *The Journal of clinical investigation*, 126(4), 1413-1424.
- Martín, A. P., Escudero, J. B., Rodríguez, H. B., & Martín, D. D. (2013). Funciones de los linfocitos B. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(28), 1752-1759.
- Martin, M., Hiltner, T. D., Wood, J. C., Fraser, S. E., Jacobs, R. E., & Readhead, C. (2006). Myelin deficiencies visualized in vivo: Visually evoked potentials and T2-weighted magnetic resonance images of shiverer mutant and wild-type mice. *Journal of neuroscience research*, 84(8), 1716-1726.
- Masland, R. H. (2012). The neuronal organization of the retina. *Neuron*, 76(2), 266-280.
- Mayor-Torroglosa, S., De la Villa, P., Rodríguez, M. E., López-Herrera, M. P. L., Avilés-Trigueros, M., García-Avilés, A., ... & Vidal-Sanz, M. (2005). Ischemia results 3 months later in altered ERG, degeneration of inner layers, and deafferented tectum: neuroprotection with brimonidine. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(10), 3825-3835.
- McKeon, R. J., Jurynek, M. J., & Buck, C. R. (1999). The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *Journal of Neuroscience*, 19(24), 10778-10788.
- Mizuno, K., Clark, A. F., & Streilein, J. W. (1989). Anterior chamber-associated immune deviation induced by soluble antigens. *Investigative ophthalmology & visual science*, 30(6), 1112-1119.
- Moalem, G., Gdalyahu, A., Shani, Y., Otten, U., Lazarovici, P., Cohen, I. R., & Schwartz, M. (2000). Production of neurotrophins by activated T cells:

implications for neuroprotective autoimmunity. *Journal of autoimmunity*, 15(3), 331-345.

- Montalbán-Soler, L., Alarcón-Martínez, L., Jiménez-López, M., Salinas-Navarro, M., Galindo-Romero, C., de Sá, F. B., & Villegas-Pérez, M. P. (2012). Retinal compensatory changes after light damage in albino mice. *Molecular vision*, 18, 675.
- Morell P, Quarles RH. Characteristic Composition of Myelin. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28221/>
- Nadal-Nicolás FM, Jimenez-Lopez M, Sobrado-Calvo P, Nieto-Lopez L, Canovas-Martinez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M. 2009. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 (8): 3860-8.
- Nakamura, T., Sonoda, K. H., Faunce, D. E., Gumperz, J., Yamamura, T., Miyake, S., & Stein-Streilein, J. (2003). CD4+ NKT cells, but not conventional CD4+ T cells, are required to generate efferent CD8+ T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site. *The Journal of Immunology*, 171(3), 1266-1271.
- Nave, K.-A. Myelination and the trophic support of long axons. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 275–283 (2010).
- Nicholson, L. B. (2016). The immune system. *Essays in biochemistry*, 60(3), 275-301.
- Niederkorn, J. Y. (2006). See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nature immunology*, 7(4), 354.
- Niederkorn, J. Y. (2009). Role of NKT cells in anterior chamber-associated immune deviation. *Expert review of clinical immunology*, 5(2), 137-144.
- Niederkorn, J., Streilein, J. W., & Shaddock, J. A. (1981). Deviant immune responses to allogeneic tumors injected intracamerally and subcutaneously in mice. *Investigative ophthalmology & visual science*, 20(3), 355-363.
- Niederöst, B., Oertle, T., Fritsche, J., McKinney, R. A., & Bandtlow, C. E. (2002). Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth

inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *Journal of Neuroscience*, 22(23), 10368-10376.

- Odoardi, F., Kawakami, N., Li, Z., Cordiglieri, C., Streyl, K., Nosov, M. & Wekerle, H. (2007). Instant effect of soluble antigen on effector T cells in peripheral immune organs during immunotherapy of autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3), 920-925.
- Ohashi, T., Yamamura, T., Inobe, J. I., Kondo, T., Kunishita, T., & Tabira, T. (1995). Analysis of proteolipid protein (PLP)-specific T cells in multiple sclerosis: identification of PLP 95–116 as an HLA-DR2, w15-associated determinant. *International immunology*, 7(11), 1771-1778.
- Ono, K., Yasui, Y., Rutishauser, U., & Miller, R. H. (1997). Focal ventricular origin and migration of oligodendrocyte precursors into the chick optic nerve. *Neuron*, 19(2), 283-292.
- Onofri, M., Gambi, D., Bazzano, S., Colamartino, P., Fulgente, T., Malatesta, G., & Ferracci, F. (1992). Evoked potentials (EPs) in experimental allergic encephalomyelitis: a study of EP modifications during the course of a controlled disease. *Electromyography and clinical neurophysiology*, 32(3), 125-135.
- Pais, R., Bhowmick, S., Chattopadhyay, S., Lemire, Y., Sharafieh, R., Yadav, R. & Cone, R. E. (2012). An intracameral injection of antigen induces in situ chemokines and cytokines required for the generation of circulating immunoregulatory monocytes. *PloS one*, 7(8), e43182.
- Parrilla-Reverter, G., Agudo, M., Nadal-Nicolás, F., Alarcón-Martínez, L., Jiménez-López, M., Salinas-Navarro, M., Sobrado-Calvo, P., Bernal-Garro, J.M., Villegas-Pérez M.P. & Vidal-Sanz, M. (2009). Time-course of the retinal nerve fibre layer degeneration after complete intra-orbital optic nerve transection or crush: a comparative study. *Vision research*, 49(23), 2808-2825.
- Paunicka, K., Niederkorn, J. Y., & Chen, P. W. (2011). CD8+ T Regulatory Cells Require IFN- γ to Mediate Anterior Chamber-Associated Immune Deviation (ACAID) Suppression. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(14), 2261-2261.
- Peinado-Ramon, P., Salvador, M., Villegas-Perez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (1996). Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Investigative ophthalmology & visual science*, 37(4), 489-500.

- Pineau, I., & Lacroix, S. (2007). Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *Journal of Comparative Neurology*, 500(2), 267-285.
- Pineda-Rodriguez, B., Toscano-Tejeida, D., García-Vences, E., Rodriguez-Barrera, R., Flores-Romero, A., Castellanos-Canales, D., Gutierrez-Ospina, G., Castillo-Carvajal, L., Melendez-Herrera, E., & Ibarra, A. (2017). Anterior chamber associated immune deviation used as a neuroprotective strategy in rats with spinal cord injury. *PLoS one*, 12(11), e0188506.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton B., Beutler, B., & Freudenberg, M. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282(5396), 2085-2088.
- Popovich, P. G., & Jones, T. B. (2003). Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics. *Trends in pharmacological sciences*, 24(1), 13-17.
- Popovich, P. G., Stokes, B. T., & Whitacre, C. C. (1996). Concept of autoimmunity following spinal cord injury: possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system. *Journal of neuroscience research*, 45(4), 349-363.
- Popovich, P., & McTigue, D. (2009). Damage control in the nervous system: beware the immune system in spinal cord injury. *Nature medicine*, 15(7), 736.
- Popovich, P., & McTigue, D. (2009). Damage control in the nervous system: beware the immune system in spinal cord injury. *Nature medicine*, 15(7), 736.
- Putnam, A. L., Brusko, T. M., Lee, M. R., Liu, W., Szot, G. L., Ghosh, T., Atkinson M.A. & Bluestone, J. A. (2009). Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 58(3), 652-662.
- Quarles, R. H., Macklin, W. B., & Morell, P. (2006). Myelin formation, structure and biochemistry. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*, 7, 51-71.
- Ramírez, A. I., Salazar, J. J., de Hoz, R., Rojas, B., Gallego, B. I., Salinas-Navarro, M., & Trivino, A. (2010). Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to

experimental glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(11), 5690-5696.

- Ramon y Cajal, S., 1991. *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. Oxford University Press, New York.
- Raposo, C., Graubardt, N., Cohen, M., Eitan, C., London, A., Berkutski, T., & Schwartz, M. (2014). CNS repair requires both effector and regulatory T cells with distinct temporal and spatial profiles. *Journal of Neuroscience*, 34(31), 10141-10155.
- Reese, B. E. (2011). Development of the retina and optic pathway. *Vision research*, 51(7), 613-632.
- Remington, L. A., & Goodwin, D. (2011). *Clinical anatomy of the visual system E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Renz, H., & Herz, U. (1998). Immune mechanisms of peripheral tolerance. *Nutrition Research*, 18(8), 1327-1333.
- Richards, H., Williams, A., Jones, E., Hindley, J., Godkin, A., Simon, A. K., & Gallimore, A. (2010). Novel role of regulatory T cells in limiting early neutrophil responses in skin. *Immunology*, 131(4), 583-592.
- Rincón, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., & Flavell, R. A. (1997). Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 185(3), 461-470.
- Robinson, A. P., Harp, C. T., Noronha, A., & Miller, S. D. (2014). The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. In *Handbook of clinical neurology* (Vol. 122, pp. 173-189). Elsevier.
- Romano, M., Fanelli, G., Albany, C. J., Giganti, G., & Lombardi, G. (2019). Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity. *Frontiers in immunology*, 10.
- Rossetti, M., Spreafico, R., Saidin, S., Chua, C., Moshref, M., Leong, J. Y., & Albani, S. (2015). Ex Vivo-Expanded but Not In Vitro-Induced Human Regulatory T Cells Are Candidates for Cell Therapy in Autoimmune Diseases Thanks to Stable Demethylation of the FOXP3 Regulatory T Cell-Specific Demethylated Region. *The Journal of Immunology*, 194(1), 113-124.

- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu J., Takeshi T & Nomura, T. (2006). Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological reviews*, 212(1), 8-27.
- Sakaquchi, S., Yamaquchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133(5), 775.
- Sakata, L. M., DeLeon-Ortega, J., Sakata, V., & Girkin, C. A. (2009). Optical coherence tomography of the retina and optic nerve—a review. *Clinical & experimental ophthalmology*, 37(1), 90-99.
- Sánchez-Migallón, M. C., Valiente-Soriano, F. J., Nadal-Nicolás, F. M., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, 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 science*, 57(1), 81-93.
- Sawada, M., Suzumura, A., & Marunouchi, T. (1995). Cytokine network in the central nervous system and its roles in growth and differentiation of dial and neuronal cells. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 13(3-4), 253-264.
- Scaffidi, P., Misteli, T., & Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 418(6894), 191.
- Schmetterer, K. G., Neunkirchner, A., & Pickl, W. F. (2012). Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *The FASEB Journal*, 26(6), 2253-2276.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T. K., & Gorman, D. M. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*, 23(5), 479-490.
- Schwab, J. M., Brechtel, K., Mueller, C. A., Failli, V., Kaps, H. P., Tuli, S. K., & Schluesener, H. J. (2006). Experimental strategies to promote spinal cord regeneration—an integrative perspective. *Progress in neurobiology*, 78(2), 91-116.
- Shechter, R., & Schwartz, M. (2013). Harnessing monocyte-derived macrophages to control central nervous system pathologies: no longer 'if' but 'how'. *The Journal of pathology*, 229(2), 332-346.

- Shechter, R., London, A., Varol, C., Raposo, C., Cusimano, M., Yovel, G., ... & Jung, S. (2009). Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS medicine*, 6(7), e1000113.
- Sholl-Franco, A., Figueiredo, K. G. A., & de Araujo, E. G. (2001). Interleukin-2 and interleukin-4 increase the survival of retinal ganglion cells in culture. *Neuroreport*, 12(1), 109-112.
- Skelsev, M. E., Mellon, J., & Niederkorn, J. Y. (2001). $\gamma\delta$ T cells are needed for ocular immune privilege and corneal graft survival. *The Journal of Immunology*, 166(7), 4327-4333.
- Soika, D. K., Huang, Y. H., & Fowell, D. J. (2008). Mechanisms of regulatory T-cell suppression—a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*, 124(1), 13-22.
- Sonoda, K. H., Exley, M., Snapper, S., Balk, S. P., & Stein-Streilein, J. (1999). CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *Journal of Experimental Medicine*, 190(9), 1215-1226.
- Streilein, J. W. (2003). Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nature Reviews Immunology*, 3(11), 879
- Streilein, J. W., Niederkorn, J. Y., & Shadduck, J. A. (1980). Systemic immune unresponsiveness induced in adult mice by anterior chamber presentation of minor histocompatibility antigens. *Journal of Experimental Medicine*, 152(4), 1121-1125.
- Strijbos, P. J., & Rothwell, N. J. (1995). Interleukin-1 beta attenuates excitatory amino acid-induced neurodegeneration in vitro: involvement of nerve growth factor. *Journal of Neuroscience*, 15(5), 3468-3474.
- Sugars, K. L., Budhram-Mahadeo, V., Packham, G., & Latchman, D. S. (2001). A minimal Bcl-x promoter is activated by Brn-3a and repressed by p53. *Nucleic acids research*, 29(22), 4530-4540.
- Sun, J., Link, H., Olsson, T., Xiao, B. G., Andersson, G., Ekre, H. P., & Diener, P. (1991). T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *The Journal of immunology*, 146(5), 1490-1495.
- Tang, X., Davies, J. E., & Davies, S. J. (2003). Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan,

brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. *Journal of neuroscience research*, 71(3), 427-444.

- Tao, X., & Xu, A. (2016). Basic Knowledge of Immunology. In *Amphioxus Immunity* (pp. 15-42). Academic Press.
- Tiemessen, M. M., Jagger, A. L., Evans, H. G., van Herwijnen, M. J., John, S., & Taams, L. S. (2007). CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19446-19451.
- Toma, J. S., McPhail, L. T., & Ramer, M. S. (2007). Differential RIP antigen (CNPase) expression in peripheral ensheathing glia. *Brain research*, 1137, 1-10.
- Toulmond, S., Vige, X., Fage, D., & Benavides, J. (1992). Local infusion of interleukin-6 attenuates the neurotoxic effects of NMDA on rat striatal cholinergic neurons. *Neuroscience letters*, 144(1-2), 49-52.
- Vendomèle, J., Khebizi, Q., & Fisson, S. (2017). Cellular and Molecular Mechanisms of Anterior Chamber-Associated Immune Deviation (ACAID): What We Have Learned from Knockout Mice. *Frontiers in Immunology*, 8, 1686.
- Vidal, P. M., Lemmens, E., Dooley, D., & Hendrix, S. (2013). The role of “anti-inflammatory” cytokines in axon regeneration. *Cytokine & growth factor reviews*, 24(1), 1-12.
- Vidal-Sanz, M., Avilés-Trigueros, M., Whiteley, S. J., Sauvé, Y., & Lund, R. D. (2002). Reinnervation of the pretectum in adult rats by regenerated retinal ganglion cell axons: anatomical and functional studies. In *Progress in brain research* (Vol. 137, pp. 443-452). Elsevier.
- Vidal-Sanz, M., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, F. M., Alarcón-Martínez, L., Valiente-Soriano, F. J., de Imperial, J. M., Avilés-Trigueros, M., Agudo-Barriuso, M., & Villegas-Pérez, M. P. (2012). Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Progress in retinal and eye research*, 31(1), 1-27.
- Vivier, E., & Malissen, B. (2005). Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nature immunology*, 6(1), 17.
- Waldrep, J. C., & Kaplan, H. J. (1983). Anterior chamber associated immune deviation induced by TNP-splenocytes (TNP-ACAID). I. Systemic tolerance mediated by suppressor T-cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 24(8), 1086-1092.

- Walsh, J. T., & Kipnis, J. (2011). Regulatory T cells in CNS injury: the simple, the complex and the confused. *Trends in molecular medicine*, 17(10), 541-547.
- Wang, K. C., Koprivica, V., Kim, J. A., Sivasankaran, R., Guo, Y., Neve, R. L., & He, Z. (2002). Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature*, 417(6892), 941.
- Wang, Y., Goldschneider, I., Foss, D., Wu, D. Y., O'Rourke, J., & Cone, R. E. (1997). Direct thymic involvement in anterior chamber-associated immune deviation: evidence for a nondeletional mechanism of centrally induced tolerance to extrathymic antigens in adult mice. *The Journal of Immunology*, 158(5), 2150-2155.
- Werner, S., & Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*, 83(3), 835-870.
- Whittum, J., Niederkorn, J., McCulley, J. P., & Streilein, J. W. (1983). Suppressor T-Cell Induction by Intracameral Presentation of HSV-I. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 24, 213.
- Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X. F., & Achong, M. K. (1998). IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *The Journal of clinical investigation*, 101(2), 311-320.
- Xu, A., Liu, Y., Chen, W., Wang, J., Xue, Y., Huang, F., Rong, L., Lin, J., Liu, D., Yan, M., Li, B., Song, J., Olsen N. & Li, Q. Z. (2016). TGF- β -induced regulatory T cells directly suppress B cell responses through a noncytotoxic mechanism. *The Journal of Immunology*, 196(9), 3631-3641.
- Yang, L., Blumbergs, P. C., Jones, N. R., Manavis, J., Sarvestani, G. T., & Ghabriel, M. N. (2004). Early expression and cellular localization of proinflammatory cytokines interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in human traumatic spinal cord injury. *Spine*, 29(9), 966-971.
- Yin, Y., Cui, Q., Gilbert, H. Y., Yang, Y., Yang, Z., Berlinicke, C. & Zack, D. J. (2009). Oncomodulin links inflammation to optic nerve regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(46), 19587-19592.

- Yoles, E., & Schwartz, M. (1998). Degeneration of spared axons following partial white matter lesion: implications for optic nerve neuropathies. *Experimental neurology*, 153(1), 1-7.
- Yoles, E., Zalish, M., Lavie, V., Duvdevani, R., Ben-Bassat, S. N. E. J. A. N. A., & Schwartz, M. (1992). GM1 reduces injury-induced metabolic deficits and degeneration in the rat optic nerve. *Investigative ophthalmology & visual science*, 33(13), 3586-3591.
- Yoshino, A., Hovda, D.A., Kawamata, T., Katayama, Y., Becker, D.P., Dynamic changes in local cerebral glucose utilization following cerebral concussion in rats: evidence of a hyper- and subsequent hypometabolic state. *Brain Res.* 561, 106–119.
- Yu, W. R., & Fehlings, M. G. (2011). Fas/FasL-mediated apoptosis and inflammation are key features of acute human spinal cord injury: implications for translational, clinical application. *Acta neuropathologica*, 122(6), 747-761.
- Zamvil, S. S., Mitchell, D. J., Moore, A. C., Kitamura, K., Steinman, L., & Rothbard, J. B. (1986). T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis. *Nature*, 324(6094), 258.
- Zhao, D. M., Thornton, A. M., DiPaolo, R. J., & Shevach, E. M. (2006). Activated CD4+ CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*, 107(10), 3925-3932.
- Zitvogel, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2010). Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell*, 140(6), 798-804.